

Univerzitet u Nišu

Prirodno-matematički fakultet

Departman za hemiju

Milan N. Mitić

KINETIKA DEGRADACIJE FENOLNIH JEDINJENJA

HIDROKSIL RADIKALIMA

Doktorska disertacija

Niš, 2011.



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
NIŠ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj, RBR:	
Identifikacioni broj, IBR:	
Tip dokumentacije, TD:	monografska
Tip zapisa, TZ:	tekstualni
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija
Autor, AU:	Milan Mitić
Mentor, MN:	Dr Mirjana Obradović
Naslov rada, NR:	Kinetika degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima
Jezik publikacije, JP:	srpski
Jezik izvoda, JI:	srpski i engleski
Zemlja publikovanja, ZP:	Srbija
Uže geografsko područje, UGP:	Srbija
Godina, GO:	2011.
Izdavač, IZ:	autorski reprint
Mesto i adresa, MA:	Niš, Višegradska 33
Fizički opis rada, FO: (poglavlja/ strana/ citata/ tabela/ slika/	10 poglavlja, 308 strana, 167 citata, 71 tabela, 172 slike
Naučna oblast, NO:	hemija
Naučna disciplina, ND:	Fizička hemija i analitička hemija
Predmetna odrednica/Ključne reči, PO:	Kinetika degradacije, polifenoli, metali, antioksidativna aktivnost, UV-Vis spektrofotometrija, HPLC metoda, ICP-OES analiza
UDK	543.23 : 547.562 + 54.024
Čuva se, ČU:	biblioteka
Važna napomena, VN:	Disertacija je urađena u laboratorijama PMF-a Univerziteta u Nišu

Izvod, IZ:

Sedam sorti grožđa, tri sorte višnje, crvena ribizla i malina gajena na različitim područjima, 15 vrsta crvenih vina, 10 vrsta belih vina, 9 vrsta komercijalnih crvenih sokova i 12 vrsta komercijalnih i domaćih crvenih voćnih vina je analizirano na sastav polifenolnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost.

Proučena je kinetika degradacije malvidin-3-glukozida, malvidin-3-acetil-glukozida, katehina i epikatehina crvenih vina hidroksil radikalima pri pH=3,5. Pri validaciji HPLC metode određeni su sledeći parametri: linearost, limit detekcije, limit kvantifikacije, tačnost i preciznost. Izračunati su termodinamički parametri. Predložen je mehanizam reakcije degradacije.

Proučena je kinetika i razrađene su kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje ukupnih monomernih antocijana crvenih vina, ukupnih polifenola belih vina i ukupnih monomernih antocijana sokova višnje, crvene ribizle i maline, na osnovu reakcije njihove degradacije hidroksil radikalima. Izračunati su termodinamički parametri. Predložen je mehanizam reakcije degradacije. Određeni su optimalni uslovi odigravanja reakcije. Izračunata je tačnost, preciznost, limit detekcije i limit kvantifikacije. Metode su primenjene za određivanje ukupnih monomernih antocijana u crvenim vinima i sokovima od višanja, crvenih ribizli i malina i za određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u belim vinima.

Datum prihvatanja teme, DP:

19.09.2011.

Datum odbrane, DO:

}

Članovi komisije,

Predsednik:

Član:

Član, mentor:



PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
NIŠ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monography
Type of record, TR:	Textual
Contents code, CC:	Ph.D.dissertation
Author, AU:	Milan Mitić
Mentor, MN:	Mirjana Obradović PhD
Title, TI:	Kinetics degradation of phenolic compounds by hydroxyl radicals
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:	2011.
Publisher, PB:	Autor's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33
Physical description, PD: (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs)	10 chapters, 308 pages, 167 references, 71 tables, 172 pictures
Scientific field, SF:	Chemistry
Scientific discipline, SD:	Physical Chemistry and Analytical Chemistry
Subject/Key words, S/KW:	Kinetics degradation, polyphenols, metals, antioxidant activity, UV-Vis spectrophotometry, HPLC method, ICP-OES analysis
UC	543.23 : 547.562 + 54.024
Holding data, HD:	Library
Note, N:	The dissertation work was done at PMF, University of Niš laboratories

Abstract, AB:	<p>Seven cultivars of grapes, three cultivars of sour cherry, red currant and raspberry from different geographical regions, 15 varieties of red wines, 10 varieties of white wines, 9 varieties of commercial red juices and 12 varieties of commercial and domestic red fruit wines were analyzed for their phenolic compounds and antioxidant activity.</p> <p>The kinetics of the degradation of malvidin-3-glucoside, malvidin-3-acetyl-glucoside, catechin and epicatechin in red wines by hydroxyl radicals in aqueous solution ($\text{pH}=3.5$) was investigated. HPLC methods were validated for linearity, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. The thermodynamic parameters were obtained. The mechanism of degradation was discussed.</p> <p>The kinetics was investigated and the kinetic-spectrophotometric methods for determining the amounts of total monomeric anthocyanins in red wines, of total polyphenols in white wines and total monomeric anthocyanins in sour cherry, red currant and raspberry juices, based on the reaction of their degradation by hydroxyl radicals. The thermodynamic parameters were obtained. The mechanism of degradation was discussed. The optimal working conditions were determined. Limit detection, limit quantification, accuracy and precision were calculated. The methods were applied to determine the total monomeric anthocyanins in red wines, sour cherry juices, red currant juice and raspberry juices, and the total polyphenols in white wines.</p>						
Accepted by the Scientific Board on, ASB:	19.09.2011.						
Defended on, DE:							
Defended Board,	<table border="0"> <tr> <td>President:</td><td></td></tr> <tr> <td>Member:</td><td></td></tr> <tr> <td>Member,</td><td></td></tr> </table>	President:		Member:		Member,	
President:							
Member:							
Member,							

Mojoj čerki Milici

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

Izradom doktorske disertacije rukovodila je dr Mirjana Obradović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, koja je predložila temu za doktorsku disertaciju i ovom prilikom joj se zahvaljujem na svestranoj pomoći i sugestijama tokom izrade rada.

Zahvaljujem se dr Zori Grahovac, redovnom profesoru PMF-a u Nišu i dr Predragu Đurđeviću, redovnom profesoru PMF-a u Kragujevcu sto su se prihvatili ocene ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se Jean-Marc Souquet-u, istraživaču na National Institute for Agricultural Research, Montpellier, INRA, France, koji me je uveo u oblast hemijske analize grožđa i vina HPLC metodom.

Nastavno-naučnom timu Katedre za Analitičku i Fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu zahvaljujem na saradnji tokom proteklih godina.

Zahvaljujem se svojoj supruzi Jeleni na strpljenju, pomoći u tehničkoj obradi ilustrovanih eksperimentalnih rezultata i podršci tokom izrade doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj majci prof. dr Snežani Mitić na stručnim savetima, podršci i razumevanju.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	7
2.1. Brzina hemijskih reakcija	9
2.1.1. Teorija brzine hemijskih reakcija	10
2.1.1.1. Teorija prelaznog stanja. Aktivirani kompleks molekula	13
2.1.2. Osnovi katalize.....	19
2.1.3. Mehanizmi homogeno-katalitičkih reakcija.....	23
2.1.3.1. Reakcije katalizovane jonom koji menja svoje oksidaciono stanje tokom reakcije.....	29
2.1.3.2. Redoks reakcije sa organskim supstratima.....	29
2.1.4. Kinetičke metode analize.....	30
2.1.4.1. Vrste kinetičkih metoda.....	31
2.1.4.2. Karakteristike kinetičkih metoda analize.....	33
2.2. Fenolna jedinjenja.....	37
2.2.1. Flavonoidi.....	40
2.2.2. Antocijani.....	43
2.2.3. Flavan-3-oli.....	48
2.2.4. Flavonoli.....	49
2.2.5. Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture.....	49
2.3. Slobodni radikali i oksidativni procesi.....	51
2.3.1. Definicija i podela slobodnih radikala.....	51
2.3.2. Antioksidanti.....	53
2.3.3. Oksidacija fenolnih jedinjenja.....	54
2.4. Hromatografija.....	64
2.4.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).....	65
2.4.1.1. HPLC parametri.....	67
2.4.1.2. Razvoj i validacija HPLC metode.....	70
2.5. UV/Vis spektrofotometrija.....	73
2.5.1. Apsorpcija UV/Vis zračenja.....	73
2.5.2. Snimanje UV/Vis spektra.....	75
2.5.3. Tačnost i preciznost merenja.....	76
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	79
3.1. Materijal.....	81

3.2. Aparati i reagensi.....	81
3.2.1. Aparati.....	80
3.2.2. Reagensi.....	83
3.3. Metode.....	85
3.3.1. Priprema uzoraka.....	85
3.3.1.1. Postupak ekstrakcije.....	85
3.3.1.2. Postupak mineralizacije.....	85
3.3.2. UV/Vis spektrofotometrijske metode.....	85
3.3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja.....	86
3.3.2.2. Odredjivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	86
3.3.2.3. Odredjivanje sadržaja antocijana (“sing” pH i pH diferenci-jalnom metodom.....	87
3.3.2.4. Određivanje procenta polimerne boje.....	89
3.3.2.5. Određivanje radikal „skevendžer“ kapaciteta, ukupne antioksidativne aktivnosti i antioksidativnog potencijala.....	90
3.3.3. HPLC metoda.....	91
3.3.4. ICP-OES metoda.....	92
3.3.5. Metode za određivanje brzine reakcije.....	93
3.3.5.1. Kinetičko-spektrofotometrijska metoda.....	93
3.3.5.2. HPLC metoda.....	94
3.3.6. Statistička obrada podataka.....	94
4. REZULTATI	95
4.1. Određivanje sadržaja polifenola, metala i antioksidativne aktivnosti.....	97
4.1.1. Određivanje sadržaja polifenola, metala i antioksidativne aktivnosti grožđa.....	97
4.1.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti grožđa.....	98
4.1.1.2. HPLC određivanje antocijana, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina u grožđu.....	103
4.1.1.3. ICP-OES određivanje metala u grožđu.....	109
4.1.2. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti crvenih vina.....	114
4.1.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti crvenih vina.....	115
4.1.2.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina crvenih vina.....	121
4.1.3. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti belih vina.....	126
4.1.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti belih vina.....	126

4.1.3.2. HPLC određivanje hidroksicimetnih kiselina u belom vinu.....	130
4.1.4. Određivanje sadržaja polifenola, metala i antioksidativne aktivnosti višnje.....	132
4.1.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti višnje.....	132
4.1.4.2. HPLC određivanje antocijana i hidroksicimetnih kiselina u višnji.....	134
4.1.4.3. Promene sadržaja fenolnih jedinjenja u višnji tokom zrenja.....	136
4.1.4.4. ICP-OES određivanje metala u višnji.....	140
4.1.5. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti komercijalnih sokova.....	144
4.1.5.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti komercijalnih sokova.....	144
4.1.5.2. HPLC određivanje antocijana i hidroksicimetnih kiselina u komercijalnim sokovima.....	147
4.1.6. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti voćnih vina.....	153
4.1.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti voćnih vina.....	153
4.1.6.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u voćnim vinima.....	157
4.1.7. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti crvene ribizle.....	164
4.1.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti crvene ribizle.....	164
4.1.7.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina u crvenoj ribizli.....	166
4.1.8. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti maline.....	172
4.1.8.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antoksidativne aktivnosti maline.....	172
4.1.8.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u malini.....	173
4.2. Ispitivanje kinetike degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima.....	178
4.2.1. Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije antocijana crvenih vina.....	178

4.2.1.1.	Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema.....	179
4.2.1.2.	Validacija kinetičko-spektroforometrijske metode za određivanje antocijana crvenih vina.....	185
4.2.2.	Ispitivanje kinetike reakcije degradacije antocijana crvenih vina HPLC metodom.....	190
4.2.2.1.	Validacija HPLC metode za određivanje Mv-3-G.....	190
4.2.2.2.	Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema.....	192
4.2.3.	Ispitivanje kinetike reakcije degradacije flavan-3-ola crvenih vina HPLC metodom.....	199
4.2.3.1.	Validacija HPLC metode za određivanje catehina i epikatehina.....	199
4.2.3.2.	Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema.....	201
4.2.4.	Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije fenolnih jedinjenja belih vina.....	206
4.2.4.1.	Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema.....	207
4.2.4.2.	Validacija kinetičko-spektroforometrijske metode za određivanje ukupnih fenola belih vina.....	211
4.2.5.	Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije antocijana soka višnje.....	215
4.2.5.1.	Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema.....	216
4.2.5.2.	Validacija kinetičko-spektroforometrijske metode za određivanje antocijana soka višnje.....	221
4.2.6.	Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije antocijana soka crvene ribizle.....	225
4.2.6.1.	Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema.....	226
4.2.6.2.	Uticaj rastvarača na brzinu reakcije degradacije antocijana hidroksil radikalima.....	231
4.2.6.3.	Validacija kinetičko-spektroforometrijske metode za određivanje antocijana u soku crvene ribizle i maline.....	235
5.	DISKUSIJA REZULTATA.....	239
5.1.	Kinetika i mehanizam degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima....	241
5.1.1.	Mehanizam degradacije fenolnih jedinjenja belih vina.....	244
5.1.2.	Mehanizam degradacije antocijana crvenih vina.....	248
5.1.3.	Mehanizam degradacije antocijana ceđenih sokova od višanja, crvene ribizle i maline.....	251
5.1.4.	Mehanizam degradacije flavan-3-ola.....	253

6.	IZVOD.....	257
7.	SUMMARY.....	263
8.	LITERATURA.....	269
9.	PRILOG.....	285
10.	BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM.....	301

Skraćenice

AP – Antioksidativni potencijal

C - Katehin

CE – Katehin ekvivalent

C_L – Limit detekcije

C_Q – Limit kvantifikacije

Cy – Cijanidin

Cy-3-G – Cijanidin-3-glukozid

C3GE – Ekvivalent cijanidin-3-glukozida

Dp – Delfnidin

Dp-3-G – Delfnidin-3-glukozid

EC - Epikatehin

GAE – Ekvivalent galne kiseline

HPLC – Tečna hromatografija visokih performansi

ICP-OES – Optički emisioni spektrofotometar sa induktivno kuplovanom plazmom

IUPAC – Međunarodno udruženje za čistu i primenjenu hemiju (International Union of Pure and Applied Chemistry)

MA – Monomerni antocijani

MeOH – metanol

Mv – Malvidin

Mv-3-G – Malvidin-3-glukozid

Mv-3-AG – Malvidin-3-acetil-glukozid

M3GE – ekvivalent malvidin-3-glukozida

nd – nije nađeno

Pn - Peonidin

Pn-3-G – Peonidin-3-glukozid

Pt – Petunidin

Pt-3-G – Petunidin-3-glukozid

RSC – radikal „skevindžer” kapacitet

RSD – Relativna standardna devijacija

RG – Relativna greška

TA – Ukupni antocijani

TAA – Ukupna antioksidativna aktivnost

TE – Troloks ekvivalent

TF – Ukupni flavonoidi

TP – Ukupni fenoli

t_R – Retencione vreme

1. UVOD

Fenolna jedinjenja (polifenoli) 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 kondenzovanih jedinjenja kao što su tanini. U biljkama se ova jedinjenja pretežno nalaze u konjugovanom obliku, sa jednim ili više molekula šećera, te pokazuju aktivnost kako u hidrofobnim, tako i u liofilnim sistemima. Najzastupljenija fenolna jedinjenja su: fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetne kiseline), flavanoli, flavonoidi i dihidrohalkoni.

Smatra se da je antioksidativna aktivnost fenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala. Brojne *in vitro* studije potvrdile su da sekundarni metaboliti imaju pozitivne efekte na procese u ćelijama sisara, npr. na ekspresiju gena, zgrušavanje krvi, oksidaciju LDL, dilataciju krvnih sudova, signalizaciju između ćelija, modulaciju enzimske aktivnosti, deaktivaciju kancerogena i detoksifikaciju i da, na osnovu toga, mogu *in vivo* ispoljiti antikancerogeno dejstvo. Bobičasto voće poput maline, jagode, ribizle, višnje i crnog grožđa bogato je polifenolnim jedinjenjima, usled čega ono predstavlja značajan izvor antioksidanata u svakodnevnoj ishrani.

Održivost kvaliteta voća i proizvoda od voća od velikog je interesa, zbog njihove široke upotrebe, što podrazumeva sačuvati njihova antioksidativna svojstva i sačuvati ih od procesa oksidacije. Smatra se da antioksidativna svojstva variraju u zavisnosti od kompleksnih interakcija između različitih faktora, uključujući tip i koncentraciju aktivnih komponenti potencijalnog antioksidanta i prirodu ispitivanog matriksa voća, odnosno proizvoda od voća. Takođe se mora uzeti u obzir i termički tretman primjenjen u proizvodnji. Neki metalni joni, organske kiseline, etanol i fenolna jedinjenja prisutna u voću, grožđu i vinu, podložna su oksidaciji. Među njima fenolna jedinjenja se smatraju supstancama koje su najpogodnije za oksidaciju, a pogotovo orto-difenoli. Direktna oksidacija između kiseonika i fenola se ne može odigrati ili je ekstremno spora u kiselim sredinama, uglavnom zbog nepovoljnih termodinamičkih uslova. Međutim, pojedini prelazni metali, naročito gvožđe i bakar mogu promeniti reakcione mehanizme, smanjujući slobodnu energiju reakcije i povećavajući brzinu reakcije. Stoga Fe i Cu mogu odigrati važnu ulogu u prevazilaženju nepovoljnih termodinamičkih uslova i doprineti oksidaciji voća, vina, sokova (Danilewicz, 2003). U voću i vinu, joni prelaznih metala su široko zastupljeni. Njihova koncentracija u vinu najviše zavisi od zemljишta na kojem je gajena vinova loza odnosno voće i opreme za proizvodnju vina. Vino uobičajeno sadrži 0-5 mg/L gvožđa i 0,1-0,3 mg/L bakra (Li i sar., 2005). Međutim, i pri ovako niskim koncentracijama ovih metala može doći do oksidativnog

kvarenja vina. Osim njihovih koncentracija važan je i oblik u kome se nalaze joni. Ovi joni su najčešće prisutni u formi kompleksa sa drugim jedinjenjima prisutnih u voću i vinu. Kompleksiranje smanjuje potencijal para $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, stabilzuje oksidaciono stanje Fe^{3+} jona i povećava redukcionu stabilnost Fe^{2+} jona, što ukazuje da organski ligandi prisutni u voću i vinu osiguravaju brzu oksidaciju Fe^{2+} (*Li i sar.*, 2008). Osim toga, kada je uz jon gvožđa u obliku svojih kompleksnih jedinjenja prisutan H_2O_2 , Fentonovom reakcijom nastaje moćan oksidans $\cdot\text{OH}$. Bakar takođe može reagovati sa H_2O_2 i proizvoditi $\cdot\text{OH}$, i pri tome je mnogo reaktivniji od gvožđa. Hidroksil radikal, $(\cdot\text{OH})$ sa kratkim vremenom života od oko 10^{-6}s u vodi, je trenutno najmoćniji oksidans od reaktivnih kiseoničnih vrsta i u mogućnosti je da brzo oksiduje većinu organskih jedinjenja. Neki autori smatraju da $\cdot\text{OH}$ može da oksiduje u potpunosti gotovo svako jedinjenje u vinu (*Laurie i Waterhouse*, 2006).

Procesi oksidacije fenolnih jedinjenja u vinu, voću i proizvodima od voća su ozbiljan problem koji se odražava na njihov kvalitet. To je razlog da ovi procesi budu predmet mnogih istraživanja.

Brovingovanje belih vina nastaje kao posledica oksidativnih procesa u njemu. Proces brovingovanja belih vina, testom ubrzanog brovingovanja zagrevanjem belih vina na temperaturi od 55°C tokom 10 dana, ispitali su mnogi autori (*Salacha i sar.*, 2008; *Sioumis i sar.*, 2005; *Sioumis i sar.*, 2006), dok su *Perez-Zuniga i sar.* (2000) primenili test ubrzanog bruniranja vina tako što su ih zagrevali na 45°C tokom 40 dana.

Mnogi autori su pratili stabilnost monomernih antocijana u crvenim vinima sa vremenom starenja u boci. Pri tome su došli do zaključka da se procenat monomernih antocijana znatno smanjuje, dok se u istom vremenskom periodu procenat polimernih antocijana povećava, zbog reakcije antocijana sa taninima ali i zbog njihovog razlaganja pod uticajem kiseonika (*Poiana i sar.*, 2008; *Luoana*, 2005). Kinetika termičke degradacije antocijana predmet je izučavanja mnogih autora. *Kechinski i sar.* (2010) su proučavali kinetiku degradacije antocijana u soku borovnice, i pri tome su našli da ovoj proces prati kinetiku reakcije prvog reda i odredili njene termodinamičke parametre. *Verbeyst i sar.* (2010) su proučili kinetiku degradacije antocijana u jagodi na temperaturama od 95°C , 100°C , 110°C , 120°C i 130°C i pri tome odredili i energije aktivacije na ovim temperaturama. *Cisse i sar.* (2009) su pratili kinetiku degradacije antocijana u ekstraktu crvene narandže, kupine i ekstraktima četiri vrste ruža na povišenim temperaturama u intervalu od $50^\circ\text{C} - 90^\circ\text{C}$. Pored energije aktivacije odredili su i entropiju i entalpiju aktiviranja, i pri tome utvrdili da najveću vrednost energije aktivacije pokazuje reakcija termičke degradacije ekstrakta crvene narandže. Procesi termalne degradacije antocijana su proučavani i u model rastvorima (*Harbourne i sar.*, 2008).

Uticaj vodonik peroksida na kinetiku degradacije antocijana u sokovima od višanja, nara i jagoda ispitali su *Özkan i sar.* (2002). Reakcija degradacije je prvog reda u odnosu na koncentraciju H_2O_2 . *Özkan i sar.* (2004) su takođe proučavali uticaj vodonik peroksida na stabilnost askorbinske kiseline u voćnim sokovima.

Uticaj bakra i gvožđa na reakciju degradacije fenolnih jedinjenja je uglavnom proučavan u model sistemima. Tako je utvrđeno da reakcijom između cijanidin-3-glukozida i Cu(II)-jona dolazi do obrazovanja kompleksa (*Smyk i sar.*, 2008). Međutim, u model sistemu doći će do oksidacije (+)-catehina u prisustvu Cu(II)-jona (*Clark i Scollary*, 2002), odnosno Fe(II)-jona (*Oszmianski i sar.*, 1996).

Istovremeni uticaj vodonik peroksida i bakra, odnosno vodonik peroksida i gvožđa je, takođe proučavan u model sistemima (*De Heredia i sar.*, 2001; *Karakhanov i sar.*, 2010). Više podataka o oksidaciji fenolnih jedinjenja prisutnih u vinu Fentonovim reagensom mogu se naći u revijalnim radovima (*Li i sar.*, 2008; *Karbowiak i sar.*, 2010). Međutim, kinetika degradacije fenolnih jedinjenja prisutnih u voću i proizvodima od voća hidroksil radikalima, koja nastaje u sistemu Cu(II)/H₂O₂ nije dovoljno proučena.

Hidroksil radikali i druge kiseonične reaktivne vrste, uz veoma važnu ulogu bakra i gvožđa u inicijaciji neenzimske oksidacije, mogu biti osnova za razumevanje oksidacije fenolnih jedinjenja, što dovodi do velike potrebe za dalja istraživanja i nove podatke na ovu temu. Uzimajući u obzir sve napred navedene relevantne faktore u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- da se najpre izvrši hemijska analiza na sadržaj organskih komponenti i metalnih jona ekstrakata grožđa, višanja, crvene ribizle i maline, kao i crvenih, belih i voćnih vina i komercijalnih sokova, a potom
- da se spektrofotometrijskom metodom prouči kinetika degradacije ukupnih fenolnih komponenata u belom vinu i ukupnih monomernih antocijana u crvenom vinu i ceđenim sokovima od višnje i crvene ribizle testom ubrzane oksidacije, tj. u prisustvu sistema Cu(II)/H₂O₂. Da bi se ovaj cilj ostvario neophodno je:
 - pokazati na koji način, na osnovu kinetičkih ispitivanja reakcija oksidacije fenolnih komponenti u belom i crvenom vinu, kao i u ceđenim sokovima višnje i crvene ribizle mogu da se odrede redovi reakcija u odnosu na svaki reaktant i da se na osnovu toga postave kinetičke jednačine odgovarajućih procesa,
 - izračunati konstante brzine odgovarajućih procesa uz pomoć kinetičkih jednačina,
 - odrediti termodinamičke parametre (E_a, ΔH^{*}, ΔS^{*} i ΔG^{*}) za procese oksidacije ukupnih fenola (za bela vina), odnosno ukupnih monomernih antocijana (za crvena vina, sokove višnje i crvene ribizle),
 - na osnovu eksperimentalnih rezultata i literaturnih podataka predložiti najverovatniji mehanizam degradacije fenolnih jedinjenja i antocijana hidroksil radikalima,

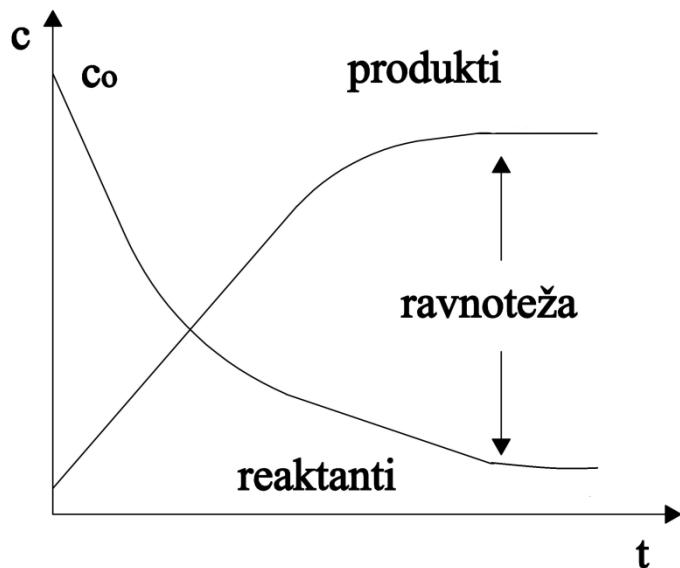
- izvršiti validaciju kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za određivanje ukupnih fenola belih vina i ukupnih monomernih antocijana crvenih vina i ceđenih sokova višnje, crvene ribizle i maline
 - ispitati mogućnost primene razrađenih kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za određivanje ukupnih fenola i ukupnih monomernih antocijana u većem broju različitih uzoraka.
 - potrvrditi tačnost i preciznost rezultata kinetičkog određivanja pomenutih komponenti u različitim uzorcima paralelnim određivanjem u istim uzorcima referentnim metodama.
- da se HPLC metodom ispita kinetika degradacije malvidin-3-glukozida i malvidin-3-acetil-glukozida, kao i katehina i epikatehina prisutnih u crvenim vinima testom ubrzane oksidacije, tj. u prisustvu sistema Cu(II)/H₂O₂. Da bi se ovaj cilj ostvario neophodno je:
 - izvršiti validaciju HPLC metoda za određivanje malvidin-3-glukozida, katehina i epikatehina
 - ispitati uticaj reaktanata na brzinu reakcije degradacije i postaviti odgovarajuće kinetičke jednačine
 - izračunati konstante brzine a potom odrediti termodinamičke parametre (E_a , ΔH^* , ΔS^* i ΔG^*) za procese degradacije malvidin-3-glukozida, malvidin-3-acetil-glukozida, katehina i epikatehina
 - na osnovu eksperimentalnih rezultata i literaturnih podataka predložiti najverovatniji mehanizam degradacije malvidin-3-glukozida, malvidin-3-acetil-glukozida, katehina i epikatehina hidroksil radikalima.

2. OPŠTI DEO

2.1. BRZINA HEMIJSKIH REAKCIJA

Hemijska promena je proces u kome iz jednih hemijskih vrsta, reaktanata, nastaju druge hemijske vrste, proizvodi reakcije. Može se posmatrati kao proces koji se odvija na molekulskom nivou u kome molekul A u interakciji sa molekulom B daje hemijski novu vrstu – proizvod reakcije, ali i kao makroskopska pojava koja predstavlja proces sastavljen od n događaja, n – elementarnih hemijskih promena. Broj elementarnih događaja u kojima se desila hemijska promena makroskopski je merljiva veličina.

Odigravanje hemijske reakcije karakteriše se određenim pravcem promene reaktanata u proizvode reakcije kao i brzinom te promene. Koncentracije reaktanata i produkata menjaju se tokom odigravanja hemijske reakcije (sl. 2.1.) i to tako da koncentracije reaktanata opadaju, a proizvoda rastu, sve dok se ne postigne ravnotežno stanje.

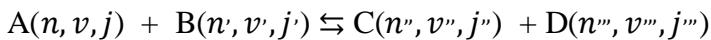


Slika 2.1. Promena koncentracije reaktanata i produkata tokom reakcije.

Na ravnoteži koncentracije svih učesnika u reakciji su konstantne. Termodinamičke karakteristike neke hemijske reakcije obuhvataju promene termodinamičkih funkcija: Gibsove energije, entropije i entalpije pod određenim uslovima pritiska i temperature, kao i vrednosti konstante ravnoteže. Na osnovu ovih veličina može se doći do zaključka u kom pravcu će se reakcija spontano odigravati i kolike će biti koncentracije reakcionih učesnika u ravnoteži. Međutim, da li će se reakcija, koja je termodinamički moguća, odigrati i kojom brzinom će se dostići ravnotežno stanje nemoguće je odrediti iz termodinamičkih podataka. Osim toga, većina hemijskih reakcija odvija se preko niza stupnjeva, pri čemu *najsporiji* od

njih određuje brzinu reakcije u celini. Brzina svakog stupnja ponaosob, određena je strukturom i prirodom hemijske veze molekula reaktanata (*Durđević i sar., 1997*). Deo fizičke hemije koji se bavi vremenskim tokovima hemijskih reakcija naziva se: *hemijska kinetika*, gde je osnovni pojam brzina hemijske reakcije, koja se definiše kao promena koncentracije reaktanata u jedinici vremena. Metode analize koje se zasnivaju na merenju brzine reakcije nazivaju se *kinetičke metode*.

Da bi se bolje razumelo odigravanje hemijske reakcije, može se posmatrati reakcioni sistem kao skup čestica koje se nalaze u određenim energetskim stanjima, a hemijska promena kao proces u kome dolazi do promene energije. Molekuli reaktanti A i B, kao i proizvodi C i D, nalaze se u energetskim stanjima koja su definisana odgovarajućim elektronskim, vibracionim i rotacionim kvantnim brojevima. Da bi reagovali, molekuli reaktanti A i B se moraju naći u određenim energetskim stanjima sa njima svojstvenim elektronskim, vibracionim i rotacionim kvantnim brojevima $A(n, \nu, j)$ i $B(n', \nu', j')$. Na isti način će i molekuli C i D, nastali prilikom ove hemijske promene, takođe biti u određenim energetskim stanjima koja definišu njihovi kvantni brojevi $C(n'', \nu'', j'')$ i $D(n''', \nu''', j''')$. Posmatrana na ovaj način, hemijska promena, odnosno elementarna hemijska reakcija se može prikazati na sledeći način:



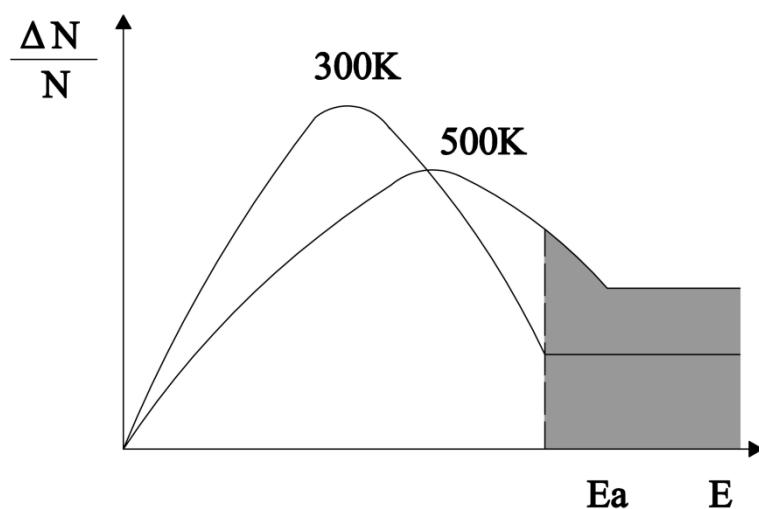
Ovako zapisana hemijska promena se može shvatiti kao proces u kome reakcioni sistem menja svoja energetska stanja od energetskih stanja u kojima se nalaze reaktanti do energetskih stanja u kojima se nalaze proizvodi. Može se zamisliti da će se prilikom hemijske promene sistem menjati duž jedne nove koordinate koja bi se u ovom slučaju nazvala reakciona koordinata. Duž te reakcione koordinate doći će do raspodele energije, preraspodele hemijskih veza i određenog rearražmana unutar molekula reaktanata, tj. formiraće se molekul ili molekuli produkta (*Veljković, 1967; Laidler, 1981; Frost, 1961*).

2.1.1. Teorije brzine hemijskih reakcija

Kao što je već rečeno, većina hemijskih reakcija odvija se preko niza elementarnih reakcija, odnosno, može se prikazati kao određeni skup elementarnih reakcija, čijim sabiranjem se dobija steheometrija ukupne reakcije. Skup elementarnih reakcija preko kojih se odigrava posmatrana reakcija određuje *mehanizmom* hemijske reakcije. Osnovni problem u razjašnjenju mehanizma jedne reakcije satoji se u nalaženju relacije kojom su povezani konstanta brzine i red ukupne reakcije sa konstantom brzine i molekularnošću elementarnih reakcija koje čine mehanizam. Polazeći od činjenice da se produkti ne mogu formirati većom brzinom neo što je brzina najsporije reakcije u mehanizmu, može se zaključiti da će brzina ukupne reakcije biti jednak brzini najsporije elementarne reakcije. Drugačije rečeno brzina najsporije elementarne reakcije određuje brzinu reakcije u celini.

Brzina hemijske reakcije zavisi od koncentracije reagujućih supstanci i od spoljašnjih parametara stanja – pritiska i temperature. Na reakcije u tečnoj i čvrstoj fazi promena pritiska utiče veoma malo. Eksperimentalni podaci pokazuju da se brzina svake reakcije menja prilikom promene temperature. Pri tome za svakih 10°C povećanja temperature reakcija se ubrzava za 1,5 -3 puta. Objasnjenje ovih eksperimentalnih činjenica daju teorije brzine hemijskih reakcija. Osnovni princip teorijskog objasnjenja mehanizma odigravanja jedne hemijske reakcije polazi od toga da je neophodan uslov za odigravanje hemijske reakcije sudsar između molekula. Pri tome molekuli dolaze na rastojanje, jedan od drugoga, koje je približno jednak njihovom radijusu. Ako bi svaki sudsar dovodio do hemijske reakcije, reakcija bi se završila za $\sim 10^{-9}$ s. Međutim, većina reakcija odvija se mnogo manjim brzinama reda veličine 10^{-2} - 10^{-3} mol/dm 3 s. S druge strane pošto je $v \sim T^{1/2}$ onda bi povećanje broja sudara, kada se temperatura povisi za 10°C bilo mnogo manje od eksperimentalno dobijenih vrednosti. Na taj način dolazi se do zaključka da ne dovodi svaki sudsar do reakcije, i drugo, da je brzina hemijske reakcije mnogo osetljivija na promene temperature nego što to predviđa teorija sudara.

Objasnjenje za eksperimentalno dobijene brzine reakcija može se dati razmatranjem Makvelove distribucije molekula po energijama. Broj molekula, koji na datoј temperaturi imaju energiju veću od neke energije E_a , srazmeran je površini ispod distribucionе krive (sl. 2.2). Samo molekuli koji prilikom sudsara imaju srednju energiju jednaku ili veću od E_a mogu da reaguju međusobno. Ova minimalna energija koju molekuli moraju da poseduju, iznad njihove srednje termalne energije, da bi stupili u hemijsku reakciju, naziva se *energija aktivacije*. Ovu energiju ima samo mali broj od ukupnog broja molekula, približno 10%, tako da će u reakciju stupiti mnogo manji broj molekula nego što predviđa teorija sudara. Prilikom porasta temperature, površina ispod distribucionе krive raste brže od $T^{1/2}$, tako da sa porastom temperature broj reakciono sposobnih molekula raste brže nego po teoriji sudara.



Slika 2.2. Maksvelove raspodele molekula po energijama.

Zavisnost konstante brzine reakcije od temperature, prvi je empirijski dobio Arenijus. S toga se jednačina

$$k = A \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad 2.1$$

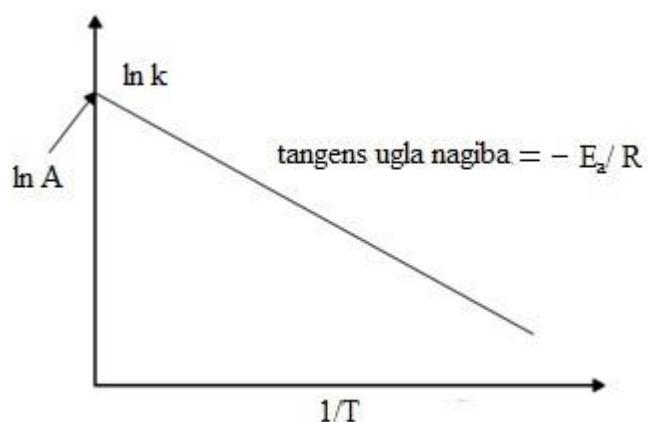
zove Arenijusova jednačina, a konstanta A u jednačini zove se Arenijusova konstanta, predeksponencijalni faktor ili faktor učestalosti.

Mereći konstantu brzine reakcije na više temperatura moguće je odrediti Arenijusovu konstantu i energiju aktivacije molekula. Naime, iz Arenijusove jednačine (2.1) se dobija, nakon logaritmovanja:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad 2.2$$

pa se nanošenjem vrednosti $\ln k$ u funkciji $1/T$ dobija prava linija čiji je nagib jednak $-E_a/R$, a odsečak na ordinati jednak je $\ln A$ (sl. 2.3).

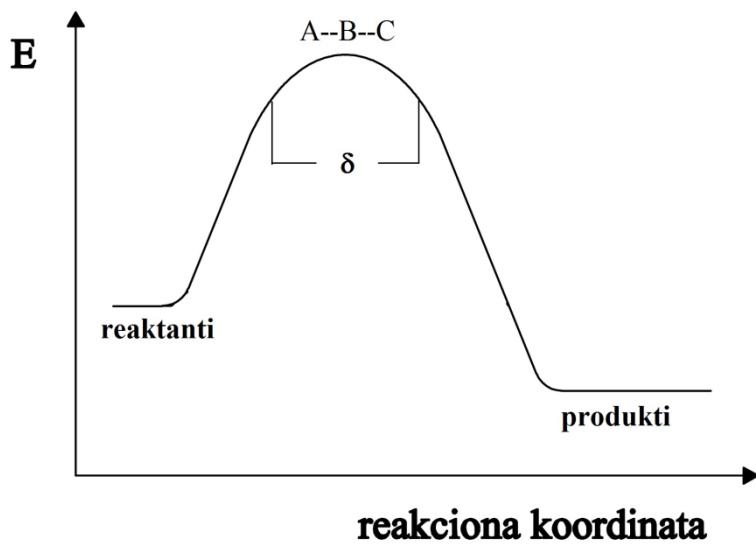
Teorija sudara ne može da objasni eksperimentalno dobijene vrednosti Arenijusove kostante, kao ni zavisnost energije aktivacije od termodinamičkih karakteristika reakcije. Jedno potpunije tumačenje Arenijusove jednačine kao i mehanizma odvijanja hemijskih reakcija daje *teorija prelaznog ili aktiviranog stanja*.



Slika 2.3. Grafičko određivanje energije aktivacije.

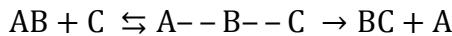
2.1.1.1. Teorija prelaznog stanja. Aktivirani kompleks molekula

Teoriju o prelaznom stanju razradili su oko 1940. godine Polanyi, London, Pelzer, Wigner i Laidler. Po ovim autorima, reagujući sistem se menja postupno duž reakcione koordinate. To je neki promenljivi parametar hemijske reakcije: vreme, atomsko rastojanje itd. Pri tome se kod polaznih jedinjenja javljaju promene u rastojanju i rasporedu atoma i atomskih grupa. Kombinacijom tako modifikovanih molekula dolazi do pojave aktiviranog kompleksa. U njemu su samo slabo izraženi polazni oblici molekula. U isto vreme već se mogu nazreti i odnosi koji odgovaraju krajnjim proizvodima reakcije. Onaj deo reakcione koordinate duž koga postoji prelazno stanje, odnosno aktivirani kompleks, obeležava se posebno sa δ . Na kraju tog dela, kompleks ima konfiguraciju pogodnu za direktni prelaz u proizvode reakcije. Samo formiranje prelaznog kompleksa je povratan proces, pa postoji odredena verovatnoća i za povratak u polazno stanje. Kao osnovni uslov za postojanje kompleksa je višak energije u reagujućem sistemu u iznosu energije aktiviranja (ili više od toga) za posmatranu hemijsku promenu – do stvaranja krajnjih proizvoda. Šematski prikaz ovih odnosa dat je na slici 2.4. Pošto je ceo reakcioni sistem izmenjen, smatramo da se nalazi u posebnom prelaznom stanju.



Slika 2.4. Šematski prikaz sadržaja potencijalne energije kod molekula koji se menjaju u toku reakcije.

Promene u sadržaju potencijalne energije sistema zavisi od promene rasporeda i rastojanja atoma u molekulima tokom reakcije. Najjednostavniji sistem za proučavanje je sistem od jednog diatomnog molekula i jednog atoma. Reakcija razmene atoma u tom sistemu se može prikazati šemom na sledeći način:



Kada se atom C približava duž linije centra molekula počinje da se menja i rastojanje AB, tako da počinje da raste potencijalna energija molekula. Priraštaj je najveći u momentu uspostavljanja aktiviranog kompleksa, A–B–C. Ceo sistem se tada nalazi u prelaznom stanju: iz polazne u krajnju konfiguraciju. Pošto kompleks pređe u proizvode reakcije, oslobođeni atom A, počinje da se udaljava. U isto vreme umanjuje se i rastojanje B–C sve do svog ravnotežnog rastojanja na minimumu potencijalne krive.

Sistemi atoma i molekula, koji se ovde posmatraju, mogu se najbolje predstaviti određenim funkcijama stanja, koje reflektuju energetski sadržaj molekula i moguću raspodelu te energije na odrežene stepene slobode unutar molekula.

Na osnovu statičke mehanike, moguće je za neki molekul odrediti verovatnoću da se on nalazi u određenom energetskom stanju. Verovatnoća stanja koje odgovara sadržaju energije ε_i data je izrazom:

$$p(\varepsilon_i) = g_i e^{-\varepsilon_i/kT}$$

Svaki molekul može imati razna energetski obogaćena stanja, aktivirana stanja, i ukoliko sadrži dovoljno veliku količinu energije, ε , postoji verovatnoća da se sva ona jave u njemu. Zbir verovatnoća za sva moguća energetska stanja molekula je dat jednačinom:

$$Q = \sum_i g_i e^{-\varepsilon_i/kT}$$

Q se naziva funkcija stanja molekula ili molekulska funkcija raspodele stanja, a često se naziva i particiona funkcija molekula.

Pri tome treba uzeti u obzir sve moguće vrste kretanja molekula koja odgovaraju pojedinačnim vrednostima ε_i . Kao aproksimacija, to se može prikazati raspodelom ukupno sadržane energije ε , na energiju translatornog, vibracionog i rotacionog kretanja, i na energiju elektronske aktivacije:

$$\varepsilon = \varepsilon_{\text{tr}} + \varepsilon_{\text{rot}} + \varepsilon_v + \varepsilon_{\text{elektron}}$$

(svaki član sadrži zbir odgovarajućih vrednosti ε_i). Ogovarajuće particione funkcije bi bile: Q_t , Q_r , Q_v , Q_{el} .

Ukupna particiona funkcija Q , za sva stanja u molekulu je jednaka proizvodu pojedinačnih (zbog zbira u eksponentu):

$$Q = Q_t \cdot Q_r \cdot Q_v \cdot Q_{\text{el}}$$

Svaka od ovih funkcija dalje odgovara proizvodu pojedinačnih funkcija raspodele za svaki stepen slobode te vrste kretanja: f_t , f_r , itd. One su takođe molekulske funkcije kao i Q .

$Q_t = f_t^3$ (3 stepena slobode); $Q_r = f_r^3$ (za nelinearan molekul 3 stepena slobode). $Q_v = f_v^{3n-6}$, a odgovarajući sadržaj energije je:

$$\varepsilon_v = \sum_i \varepsilon_{i_v}$$

Svako f se može izraziti pomoću odgovarajućih izraza za energetski sadržaj molekula, i mera je verovatnoće određene raspodele energije.

Za translaciju se daje verovatnoća određene kinetičke energije pri kretanju molekula duž puta l , koji je deo ose x , y ili z . Za jedan stepen slobode:

$$f_t = \frac{(2\pi mkT)^{1/2}}{h} l_1 \quad 2.3$$

(m je masa molekula).

Za sva tri stepena slobode, Q_t je:

$$Q_t = \frac{(2\pi kTm)^{3/2}}{h^3} V$$

$V = l_1 \cdot l_2 \cdot l_3$, odnosno V = zapremina.

Za rotaciono kretanje linearног molekula postoje dva stepena slobode kretanja, pa je:

$$Q_r = f_r^2 = \frac{8\pi^2 I k T}{h^2 \sigma} \quad 2.4$$

σ je broj simetrije, odnosno broj ekvivalentnih orijentacija u prostoru, I je moment inercije.

Za nelinearni višeatomni molekul:

$$Q_r = f_r^2 = \frac{8\pi^2 (8\pi^3 I_x I_y I_z)^{1/2} (kT)^{3/2}}{h^3 \sigma}$$

Gde su I_x , I_y i I_z momenti inercije molekula duž tri pravca u prostoru x , y i z .

Kod vibracija dvoatomnog molekula, za jedan stepen slobode:

$$f_v = (1 - e^{-hv/kT})^{-1} \quad 2.5$$

v je osnovna frekvencija vibracija.

Za višeatomni molekul, za s vibracionih stepena slobode:

$$Q_v = f_v^s = \prod_{i=1}^s (1 - e^{hv_i/kT})^{-1}$$

v_i su osnovne frekvencije vibracija.

Za elektronsku aktivaciju, ukoliko se molekul nalazi u osnovnom elektronском stanju:

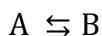
$$Q_{el} = 1$$

Ove funkcije imaju različite vrednosti, u zavisnosti od vrste kretanja koje predstavljaju. Pošto svaka od njih sadrži temperaturski član, njihove vrednosti će se menjati sa promenom temperature.

Particione funkcije za translatorno kretanje u jednom pravcu, l , su reda veličine 10^8 do 10^9 , a zavise od $T^{1/2}$, kako se može videti iz jednačine 2.3. Particione funkcije za rotaciju linearnog molekula su reda veličine 10 do 10^2 , i zavise od $T^{1/2}$, prema jednačini 2.4. Particione funkcije za vibraciono kretanje, za jedan stepen slobode, su reda veličine 1 do 10 i zavise eksponencijalno od T , po jednačini 2.5.

Najlakše je izazivati translaciju molekula, a najteže vibraciju. Poznato je da se najveći broj vibracionih stepena slobode aktivira tek na temperaturama iznad 100°C .

Pošto particione funkcije (odnosno funkcije stanja) predstavljaju verovatnoću pojavljivanja određenih ravnotežnih stanja molekula, mogu se iskoristiti za prikazaivanje hemijske ravnoteže, što se može prikazati na primeru reakcije:



Ravnoteža ove reakcije može se prikazati konstantom ravnoteže:

$$K = \frac{[B]}{[A]}$$

Neka je prisutno N identičnih čestica u reagujućem sistemu. Opšta particiona funkcija za ceo sistem sadrži sve molekulske particione funkcije. Opšta particiona funkcija se često zove i molarna funkcija stanja:

$$Q_{\text{mol}} = \frac{1}{N!} (Q)^N \quad 2.6$$

Gibbsova slobodna energija može se prikazati pomoću Q_{mol} :

$$G = -kT \ln Q_{\text{mol}} + NkT$$

Uz aproksimaciju: $\ln N! = N \ln N - N$ i zamenom Q_{mol} iz jednačine 2.6 dobija se:

$$-G = NkT \ln(Q/N) \quad 2.7$$

Upoređujući ovu jednačinu sa jednačinom:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

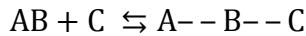
i uzimajući osnovno stanje molekula A za referentno, i da će particione funkcije za B imati dodatni član za energetsku razliku između osnovnih nivoa A i B (E_0), i da je $Nk=R$, dobija se konstanta ravnoteže izražena preko parcijalnih funkcija stanja:

$$K = \frac{Q_B^0}{Q_A^0} e^{-E_0/RT} \quad 2.8$$

Gde su Q_A^0 i Q_B^0 particione funkcije za molekule A i B koje se odnose po jedinici zapremine.

Određivanje brzine hemijskih reakcija metodom prelaznih stanja

Brzina hemijskih reakcija zavisi, po teoriji prelaznih stanja, od dve stvari. Prvo, od uspostavljanja ravnoteže između polaznih jedinjenja i aktiviranog kompleksa:



a drugo od brzine prelaska $A\text{--}B\text{--}C \rightarrow BC + A$

Ako je ravnoteža uspostavljena u celom sistemu može se predpostaviti da polovina prisutne količine kompleksa učestvuje u ravnoteži sa polaznim komponentama, a druga polovina služi za građenje proizvoda reakcije. Sa $[ABC^*]$ obeležena je koncentracija kompleksa.

Brzina hemijske reakcije odgovaraće brzini prelaska aktiviranog kompleksa u proizvode reakcije. To bi odgovaralo srednjoj brzini promene, \bar{v} , sistema duž dela reakcione koordinate δ . Taj prelaz je spontana reakcija.

Na osnovu zakona o raspodeli brzina čestica, u sistemu od više čestica, moguće je proceniti \bar{v} :

$$\bar{v} = \left(\frac{2kT}{\pi m^*} \right)^{1/2}$$

gde je m^* masa aktiviranog kompleksa. Srednje vreme promene sistema duž puta δ je:

$$\Delta t = \delta / \bar{v} = \delta \left(\frac{\pi m^*}{2kT} \right)^{1/2}$$

Brzina reakcije zavisi i od prisutne, raspoložive koncentracije aktiviranog kompleksa $[ABC^*]/2$:

$$v = \frac{\Delta [ABC^*]}{\Delta t} = \frac{[ABC^*]/2}{\delta(\pi m^*/2kT)^{1/2}} = \frac{[ABC^*]}{\delta} \left(\frac{kT}{2\pi m^*} \right)^{1/2} \quad 2.9$$

Ravnošćena konstanta koja se odnosi na proces formiranja aktiviranog kompleksa, po jednačini $AB + C \rightleftharpoons A\text{--}B\text{--}C$ je:

$$K = \frac{[ABC^*]}{[AB] \cdot [C]}$$

Zamenom u predhodnom izrazu, dobija se brzina reakcije:

$$v = \frac{\Delta [ABC^*]}{\Delta t} = \frac{K}{\delta} \left(\frac{kT}{2\pi m^*} \right)^{1/2} [AB] \cdot [C] \quad 2.10$$

a odgovarajuća konstanta brzine reakcije je:

$$k_r = \frac{k}{\delta} \left(\frac{kT}{2\pi m^*} \right)^{1/2} \quad 2.11$$

Ravnotežna konstanta se može izraziti pomoću partacionih funkcija polaznih jedinjenja i aktiviranog kompleksa. Particiona funkcija kompleksa $Q_{ABC^*}^0$ sadrži onoliko stepena slobode koliko iznosi zbir stepena slobode polaznih jedinjenja, uz izdvajanje jednog vibracionog stepena slobode za vibraciju u pravcu reakcione koordinate. Taj stepen slobode odgovara jednoj vrsti kretanja celog sistema u pravcu dobijanja proizvoda reakcije. Zato je Eyring sugerisao da se taj stepen može prikazati jednom partacionom funkcijom za translaciju aktiviranog kompleksa, mase m^* , duž određenog dela reakcione koordinate, δ . Koristeći jednačine 2.3 i 2.8 može se napisati:

$$K = \frac{Q_{ABC^*}^0 (2\pi m^* kT)^{1/2}}{Q_{AB}^0 Q_c^0} \frac{\delta}{h} e^{-E_0/RT} \quad 2.12$$

E_0 je toplosta reakcije za stvaranje aktiviranog kompleksa. Ta energija je u stvari energija neophodna za uspostavljanje prelaznog stanja molekula i zato odgovara energiji aktiviranja za tu reakciju. Na osnovu jednačine 2.8 uzima se E_0 kao razlika energija osnovnih nivoa AB i C i aktiviranog kompleksa.

Zamenom vrednosti iz jednačine 2.12 u jednačinu 2.11, posle skraćivanja, dobija se:

$$k_r = \frac{kT}{h} \frac{Q_{ABC^*}^0}{Q_{AB}^0 Q_c^0} e^{-E_0/RT} \quad 2.13$$

odnosno, dobija se *Ajrinogova jednačina*, koja povezuje konstantu brzine reakcije sa konstantom ravnoteže stvaranja aktiviranog kompleksa K_c^* :

$$k_r = \frac{kT}{h} K_c^* \quad 2.14$$

Termodinamičko tumačenje prelaznog stanja

Prelazno stanje reagujućih molekula može se definisati termodinamičkim funkcijama stanja, što je poželjno za svaki sistem sa velikim brojem partacionih funkcija. Ako postoji ravnoteža između polaznih jedinjenja i aktiviranog kompleksa, važna je konstanta ravnoteže K^* . Termodinamičke funkcije ΔG^* i ΔH^* odnose se na odgovarajuću konstantu ravnoteže, saglasno opštim zakonima termodinamike:

$$\Delta G^* = -RT \ln K^* \quad 2.15$$

$$\Delta H^* = RT^2 \frac{d \ln K_p^*}{dT} \quad 2.15a$$

Sve veličine se odnose na proces aktiviranja molekula i građenja kompleksa. Zato se naziva: slobodna energija aktiviranja i entalpija aktiviranja. Ako je:

$$K_p^* = K^*(RT)^{1-n} \quad 2.15b$$

gde je n molekularnost procesa. Zamenom K_p iz jednačine 2.15b u jednačinu 2.15a dobija se:

$$\Delta H^* = RT^2 \frac{d \ln K^*}{dT} - (n - 1)RT \quad 2.16$$

koristeći jednačinu

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$$

Može se pomoću entropije aktiviranja i slobodne entalpije aktiviranja predstaviti K^* ;

$$K^* = e^{-\Delta G^*/RT} = e^{\Delta S^*/R} e^{-\Delta H^*/RT} \quad 2.17$$

Na osnovu svega rečenog, jednačina za k_r glasi:

$$k_r = \frac{kT}{h} e^{\Delta S^*/R} e^{-\Delta H^*/RT} \quad 2.18$$

Termodinamičko tumačenje principa teorije prelaznog stanja pomaže boljem razumevanju hemijskih reakcija. To se posebno vidi iz člana koji odgovara Arenijusovoj konstanti A. Ako u članu $(kT/h) e^{\Delta S^*/R}$ raste entropija aktiviranja, to ukazuje na veću nesređenost aktiviranog prelaznog stanja, a samim tim i veću verovatnoću za promene u pravcu formiranja proizvoda reakcije. Smanjena entropija aktiviranja ukazuje na sređenost u prelaznom stanju, a samim tim znači i manju verovatnoću dobijanja novih jedinjenja (Veljković, 1969).

2.1.2. Osnovi katalize

»Mnoge supstance pokazuju afinitet prema drugim supstancama različit od hemijskog aktiviteta. One izazivaju promene delujući na supstance a da se pritom same ne menjaju. Ovu novu moć, do sada nepoznatu, zajedničku kako za organsku tako i za neorgansku materiju ja bih nazvao katalitička moć. Takođe mogu reći da je kataliza razlaganje pod dejstvom te moći« Bercelijus 1836, u časopisu Edinburgh New Philosophical Journal.

»Katalizator je supstanca koja dovodi do ubrzanja hemijske reakcije ali tako da ukupna promena standardne Gibbsove energije ostaje nepromenjena«. Definicija katalize usvojena od strane Internacionale unije za čistu i primenjenu hemiju (IUPAC) 1981. godine.

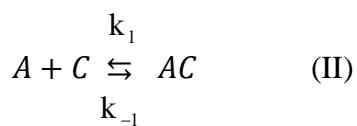
Hemijski proces se najčešće odvija preko više reakcionih stupnjeva, a svi stupnjevi u nekom mehanizmu određuju put kojom reakcija teče. Međutim, gotovo uvek postoji više načina da se od posmatranih reaktanata nagrade proizvodi, pa samim tim reakcioni put za

neku reakciju nije jednoznačno određen. Reakcija od reaktanata prema proizvodima može ići različitim reakcionim putevima, a da se pri tom početno i krajnje stanje sistema ne promene.

Do razlaganja neke supstance A može doći u jednom stupnju:



Ali pored ovog, postoji još niz načina da dođe do razlaganja supstance A. Reakcija može ići i nekim drugim reakcionim putevima. Jedan od mogućih puteva reakcije razlaganja hipotetičke supstance A bio bi prikazan sledećim mehanizmom:



U ovom slučaju supstanca A gradi sa supstancom C intermedijer AC koji se u narednom stupnju transformiše u produkt, P.

Brzina nastajanja produkta razlaganjem supstance A u reakciji direktnе transformacije (I) će biti:

$$v = k[A] \quad 2.19$$

i razlikovaće se od brzine nastajanja produkta u ciklусном procesu (II i III) u kome, pored A, učestvuje i supstanca C. Brzina nastanka produkta tada će biti izražena sledećom jednačinom:

$$v = k_2[AC] \quad 2.20$$

u slučaju kada se između reaktanata A i C i novonastale vrste intermedijera AC uspostavlja brza ravnoteža, odnosno kada je $k_1 \gg k_{-1}$, tada će ravnotežna koncentracija intermedijarne vrste AC biti :

$$K = \frac{[AC]}{[A] \cdot [C]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

$$[AC] = \frac{k_1}{k_{-1}} [A] \cdot [C] \quad 2.21$$

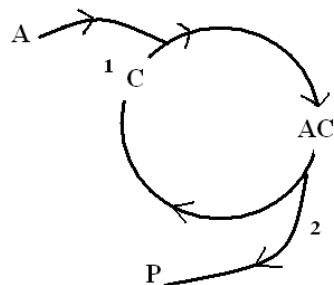
Ravnotežna koncentracija data ovim izrazom će u slučaju navedenog uslova biti jednakа trenutnoj koncentraciji $[AC]$, pa je brzina reakcije jednaka:

$$v = k_2 \frac{k_1}{k_{-1}} [A] \cdot [C] \quad 2.22$$

Odnos konstanti k_1 i k_{-1} je konstanta ravnoteže, tako da je brzina obrazovanja produkta jednaka:

$$v = k_2 K[A] \cdot [C] = k_C [A] \cdot [C] \quad 2.23$$

Iz izraza (2.23) postaje očigledno da će brzina razlaganja supstance A u prisustvu supstance C biti veća od brzine direktnе transformacije A u produkte, ako je $k_2 \cdot K > k$. Budući da je $k_1 \gg k_{-1}$ i $K \gg 1$ sledi da navedeni uslov znači da će, u slučaju brze ravnoteže, proces u kome učestvuje supstanca C biti brži od direktnog formiranja produkta iz reaktanta A. Proces u kome se brzina povećava zato što u njemu učestvuje supstanca C naziva se *katalizovani proces*. Supstanca C koja ubrzava datu reakciju u posmatranom kružnom ciklusu (sl. 2.5) zove se *katalizator* (*Perez-Bendito i Silva, 1988; Avery, 1974*).



Slika 2.5. Hipotetički reakcioni putevi reagovanja supstance A u reakcijama u kojima reaktant C ima ciklični način reagovanja.

Katalitičko dejstvo je uslovljeno međusobnim dejstvom elektronskog sistema katalizatora i reagensa. Ovo dovodi do hemijskog vezivanja molekula katalizatora, tj. do građenja proizvoda, u čiji sastav ulazi katalizator i jedan, ili više reaktanta. Kao rezultat takvog dejstva, elektronska struktura reaktanta se menja na takav način, da među njima može proticati znatno brža reakcija, a kao rezultat te reakcije katalizator se oslobađa u početnom obliku.

Na ovaj način katalizator uzima učešće u reakciji, menja njen mehanizam i samim tim smanjuje i slobodnu entalpiju aktivacije hemijske reakcije..

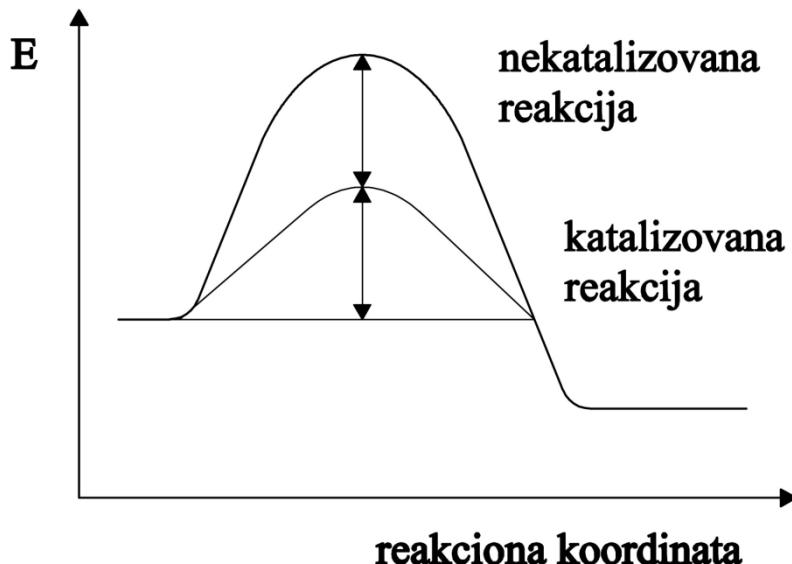
Konstanta brzine katalitičke reakcije k_C ima znatno veću vrednost nego odgovarajuća konstanta brzine nekatalitičke reakcije k . Ona se naziva se *konstantom katalize* ili *katalitičkom konstantom*, i karakteriše efikasnost katalizatora.

Katalitičke reakcije se često karakterišu i *cikličnim brojem* N_C . Ciklični broj označava broj reakcionih ciklusa u kojima jedna čestica katalizatora uzima učešće u jedinici vremena. N_C se određuje iz odnosa promene koncentracije indikatorske supstance, $[X]$ za vreme Δt i poznate koncentracije katalizatora (jednačina 2.24):

$$N_C = \frac{\Delta \cdot [X]}{\Delta t \cdot [C]_0} \quad 2.24$$

Što je veći ciklični broj katalitičke reakcije, to je ona više osetljiva na dejstvo katalizatora C.

Razlika između brzina katalitičke i nekatalitičke reakcije uslovljene su time što je slobodna entalpija aktivacije za katalitičku reakciju manja nego za nekatalitičku, zato takve reakcije protiču brže (sl. 2.6).



Slika 2.6. Energetski put katalizovane i nekatalizovane reakcije

Za kinetičko-katalitičku analizu fundamentalni značaj ima uticaj katalizatora na brzinu reakcije. Iz jednačine (I) vidi se da je brzina reakcije proporcionalna koncentraciji katalizatora, i ovo je u osnovi kinetičko-katalitičke metode analize.

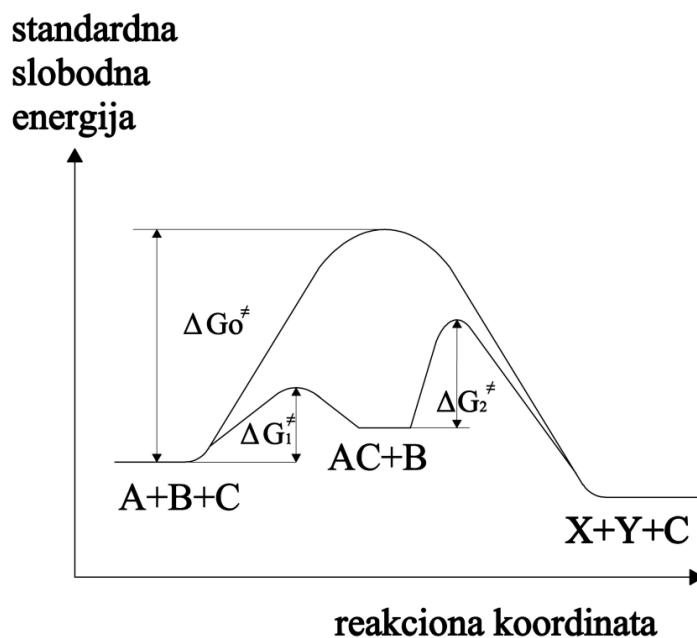
2.1.3. Mehanizmi homogeno-katalitičkih reakcija

Jedan od najvažnijih zadataka hemijske kinetike je postavljanje kinetičke jednačine složene hemijske reakcije na osnovu njenog mehanizma. Pri rešavanju ovih problema koriste se osnovni postulati hemijske kinetike, princip nezavisnosti i princip stacionarnih koncentracija.

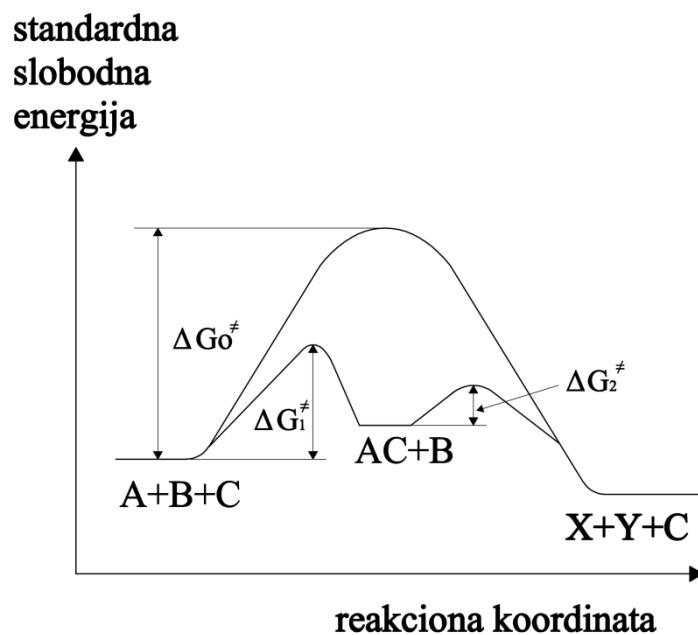
Koncentracija c_i se naziva stacionarnom, ako se u datom reakcionom sistemu tokom trajanja hemijske reakcije ne menja sa vremenom, tako da je brzina definisana po reaktantu $v_i = 0$. Ako su koncentracije svih supstanci koje učestvuju u reakciji konstantne, i ne menjaju se sa vremenom, govori se o potpuno stacionarnom stanju. Ako su stacionarne samo koncentracije intermedijera onda se govori o stacionarnom stanju datog intermedijera.

Ako se posmatra reakcija koja se najčešće odigrava uz učešće dva reaktanta pri čemu nastaju dva prelazna jedinjenja, nastala prelazna jedinjenja mogu posedovati osobine prelaznih jedinjenja Arenijusa ili Vant-Hoffa. Ukoliko se prelazno jedinjenje raspada na proizvode reakcije veoma sporo, i ako između reaktanata, katalizatora i prelaznog jedinjenja postoji ravnoteža (prelazna ravnoteža) tada je za dalje promene potrebna izvesna energija aktivacije, takvo prelazno jedinjenje naziva se *prelazno jedinjenje Arenijusa*. U drugom slučaju, prelazno jedinjenje je toliko nestabilno da se po obrazovanju odmah raspada. Prelazno jedinjenje sa ovakvim osobinama nazivamo *prelazno jedinjenje Vant-Hoffa*.

Na slikama 2.7 i 2.8 prikazan je reakcioni put katalizovane reakcije sa obrazovanjem prelaznih jedinjenja Vant-Hoffa i Arenijusa.



Slika 2.7. Reakcioni put katalizovane reakcije sa prelaznim jedinjenjem Vant-Hoffa i Arenijusa, $k_1 \gg k_2$



Slika 2.8. Reakcioni put katalizovane reakcije sa prelaznim jedinjenjem Arenijusa i Vant-Hoffa, $k_1 \gg k_2 \gg k_{-1}$

Moguća su četiri tipa reakcija koje protiču uz obrazovanje prelaznih jedinjenja X_1 i X_2 :

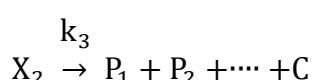
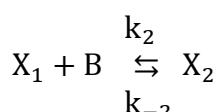
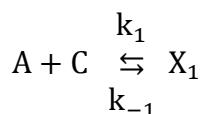
Prelazno jedinjenje X_1

1. prelazno jedinjenje Arenijusa
2. prelazno jedinjenje Arenijusa
3. prelazno jedinjenje Vant-Hoffa
4. prelazno jedinjenje Vant-Hoffa

Prelazno jedinjenje X_2

- prelazno jedinjenje Arenijusa
- prelazno jedinjenje Vant-Hoffa (slika 2.8)
- prelazno jedinjenje Arenijusa (slika 2.7)
- prelazno jedinjenje Vant-Hoffa

U prvom slučaju:



Brzina reakcije biće jednaka:

$$v = k_3 \cdot [X_2]$$

Ovde imamo dve prelazne ravnoteže. Koncentracije prelaznih supstanci izračunavamo iz konstanti ravnoteža su:

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[X_1]}{[A]\{[C] - [X_1] - [X_2]\}} \quad 2.25$$

$$K_2 = \frac{[X_2]}{[X_1] \cdot [B]}$$

Uzmemo li pri tome da je količina X_1 uporediva sa količinom C , i da je X_2 uporediva po veličini sa X_1 , iz jednačine 2.25 nalazi se:

$$X_1 = \frac{K_1[A] \cdot [C]}{1 + K_1[A](1 + K_2[B])}$$

$$X_2 = \frac{K_1 K_2 [A] \cdot [B] \cdot [C]}{1 + K_1[A](1 + K_2[B])}$$

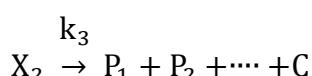
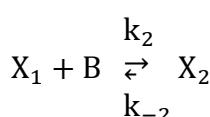
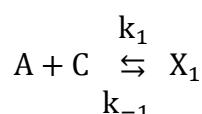
Odavde je brzina reakcije jednaka:

$$v = k_3[X_2] = \frac{k_3 K_1 K_2 [A] \cdot [B] \cdot [C]}{1 + K_1[A](1 + K_2[B])} \quad 2.26$$

Shodno jednačini 2.26, red reakcije u odnosu na reaktante A i B nije ceo broj. Međutim, ako je $K_1[A] \ll 1$ i $K_2[B] \ll 1$, brzina reakcije definisana je izrazom:

$$v = k_3 K_1 K_2 [A] \cdot [B] \cdot [C] \quad 2.27$$

U drugom slučaju:



Manja strelica označava da se promena X_2 u X_1 i B odvija ali veoma sporo ($k_2 \ll k_{-2}$), tako da se ravnoteža ne može uspostaviti. Koncentraciju X_1 određujemo u uslovima ravnoteže, predpostavljajući da je $[X_2] \ll [X_1]$:

$$k_1[A]([C] - [X_1]) = k_{-1}[X_1]$$

Odakle je:

$$X_1 = \frac{K_1[A] \cdot [C]}{1 + K_1[X_1]}$$

Koncentraciju X_2 nalazimo iz kvazistacionarnih uslova:

$$\frac{d[X_2]}{dt} = k_2[X_1] \cdot [B] - k_{-2}[X_2] - k_3[X_2] = 0$$

$$[X_2] = \frac{k_2[X_1] \cdot [B]}{(k_{-2} + k_3)} = \frac{k_2 K_1[A] \cdot [B] \cdot [C]}{(k_{-2} + k_3)(1 + K_1[A])}$$

Odavde brzinu obrazovanja produkta izračunavamo na osnovu izraza:

$$v = k_3[X_2] = \frac{k_3 k_2 K_1[A] \cdot [B] \cdot [C]}{(k_{-2} + k_3)(1 + K_1[A])} \quad 2.28$$

Iz jednačine 2.28. sledi da je reakcija prvog reda u odnosu na reaktant B, dok u odnosu na reaktant A je lomljiv broj. Međutim, u slučaju kada je $k_3 \gg k_{-2}$, jednačina 2.28. dobija oblik:

$$v \approx \frac{k_2 K_1[A] \cdot [B] \cdot [C]}{(1 + K_1[A])} \quad 2.29$$

i dalje ukoliko je vrednost proizvoda $K_1[A]$ znatno manja od 1, to jednačina 2.29. prelazi u jednačinu tipa 2.27., a pri $K_1[A] \gg 1$ jednačina prelazi u oblik:

$$v \approx \frac{k_2 K_1[A] \cdot [B] \cdot [C]}{K_1[A]}$$

odnosno:

$$v = k_2[B] \cdot [C] \quad 2.30$$

Treći slučaj razlikuje se po tome, što je prvi prelazni kompleks X_1 nestabilan (prelazno jedinjenje Vant-Hoffa) i lako prelazi u drugi prelazni kompleks X_2 , koji se polako razlaže dajući proizvode reakcije i regenerisan katalizator. Između X_1 i X_2 postoji ravnoteža. Odgovarajuću ravnotežnu koncentraciju prvog prelaznog jedinjenja određuje se iz stacionarnih uslova, a koncentraciju drugog iz uslova ravnoteže. Šema je sledećeg oblika:



Pri čemu je:

$$[C] = [C]_{sl} + [X_1] + [X_2]$$

gde je $[C]$ - ukupna koncentracija katalizatora, a $[C]_{sl}$ - u slobodnom stanju.

Sada je:

$$\frac{d[X_1]}{dt} = k_1[A]([C] - [X_1] - [X_2]) - k_{-1}[X_1] - k_2[X_1] \cdot [B] + k_{-2}[X_2] = 0,$$

$$[X_1] = \frac{k_1[A] \cdot [C] + k_{-2}[X_2]}{k_{-1} + k_2[B]}$$

gde je uzeto da je $[X_1], [X_2] \ll [C]$. Da bi se odredila $[X_2]$ koristiće se konstanta ravniteže:

$$K_2 = \frac{[X_2]}{[X_1] \cdot [B]} \quad \text{ili} \quad [X_2] = K_2[X_1] \cdot [B]$$

Zamenjujući izraz za $[X_1]$ dobijamo:

$$[X_2] = \frac{k_1 K_2 [C] \cdot [A] \cdot [B]}{k_{-1} + (k_2 - k_{-2} K_2) [B]} = \frac{k_1 K_2 [C] \cdot [A] \cdot [B]}{k_{-1}}$$

Brzina reakcije jednaka je:

$$v = k_3[X_2] = \frac{k_3 k_1 K_2 [C] \cdot [A] \cdot [B]}{k_{-1} + (k_2 - k_{-2} K_2) [B]}$$

kako je: $k_2 = k_{-2} \frac{k_2}{k_{-2}} = k_{-2} K_2$, to poslednji izraz dobija oblik:

$$v = k_3[X_2] = \frac{k_3 k_1}{k_{-1}} K_2 [C] \cdot [A] \cdot [B] \quad 2.32$$

U slučaju da se ne mogu zanemariti koncentracije $[X_1]$ i $[X_2]$ u odnosu na $[C]$ onda konačan izraz za brzinu reakcije ima oblik:

$$v = \frac{k_3 k_1 K_2 [C] \cdot [A] \cdot [B]}{k_{-1} + k_1 [A] + k_1 K_2 [A] \cdot [B]}$$

S obzirom da se proces stvaranja prelaznog kompleksa X_1 može smatrati nepovratnim, pa se konstanta k_{-1} može zanemariti, pa se dobija izraz za brzinu reakcije:

$$v = \frac{k_3 k_1 K_2 [C] \cdot [A] \cdot [B]}{k_1 [A] + k_1 K_2 [A] \cdot [B]} \quad 2.33$$

koji u slučaju kada je $K_2 [B] \gg 1$ dobija oblik:

$$v = \frac{k_3 k_1 K_2 [C] \cdot [A] \cdot [B]}{k_1 [A] (1 + K_2 [B])} = k_3 [C] \quad 2.34$$

odakle se može videti, da pri datim uslovima brzina reakcije ne zavisi od koncentracije reaktanata.

U četvrtom slučaju svi stadijumi su neravnotežni. Radi izvođenja jednačina korišćena je metoda stacionarnih stanja:



Kod stacionarnog stanja $v = v_1 = v_2 = v_3$ ili $v = k_1[A](C - X_1 - X_2) = k_2[X_1] \cdot [B] = k_3[X_2]$. Pri tome dobija se:

$$\begin{aligned}
 [X_2] &= \frac{k_2}{k_3}[B] \cdot [X_1] \\
 k_1[A] \cdot [C] - \left(k_1[A] + k_1 \frac{k_2}{k_3}[B] \right) [X_1] - k_2[X_1] \cdot [B] &= 0 \\
 [X_1] &= \frac{k_1[A] \cdot [C]}{k_1[A] + k_1 \frac{k_2}{k_3}[A] \cdot [B] + k_2[B]} \\
 v = k_2[X_1] \cdot [B] &= \frac{k_1 k_1[A] \cdot [B] \cdot [C]}{k_1[A] + k_2[B] + \frac{k_1 k_2}{k_3}[A] \cdot [B]}
 \end{aligned} \tag{2.36}$$

Ako se uzme u obzir recipročna vrednost brzine dobiće se jednačina:

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{v} &= \frac{1}{k_2[B] \cdot [C]} + \frac{1}{k_1[A] \cdot [C]} + \frac{1}{k_3[C]} \\
 \frac{1}{v} &= \frac{1}{[C]} \left\{ \frac{1}{k_1[A]} + \frac{1}{k_2[B]} + \frac{1}{k_3} \right\}
 \end{aligned} \tag{2.37}$$

koja zavisi od odnosa veličina $\frac{1}{k_1[A]}$, $\frac{1}{k_2[B]}$ i $\frac{1}{k_3}$. Brzina reakcije može biti izražena kao:

$$v = k_1[C] \cdot [A] \tag{2.38}$$

$$v = k_2[C] \cdot [B] \tag{2.39}$$

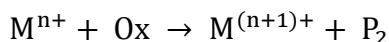
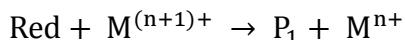
$$v = k_3[C] \tag{2.40}$$

Brzina katalitičke reakcije sa dva reaktanta, koja protiče obrazovanjem dva prelazna jedinjenja tipa Vant-Hoffa, može se odrediti brzinom bilo kog stadijuma (*Erofeev, 1977*).

2.1.3.1. Reakcije katalizovane jonom koji menja svoje oksidaciono stanje tokom reakcije

Većina katalitičkih metoda bazira se na reakcijama koje su katalizovane jonima koji menjaju svoje oksidaciono stanje tokom reakcije.

Jedan od reakcionih ciklusa kod ovih reakcija je sledeći:



Red i Ox su reagensi (polarne komponente) redox procesa, P₁ i P₂ su produkti reakcije, a M ion katalizator. Uloga Ox je da vrati katalizator iz nižeg valentnog stanja u više (aktuuelno) oksidaciono stanje, iz kojeg će on da vrši oksidaciju komponente Red i ponovo preći u niže valentno stanje. Ovaj se proces stalno vrši dok traje reakcija. Tipični primeri ovakvih reakcija su reakcije katalizovane jonom metalala sa promenljivim oksidacionom stanjem, kao što su vanadijum, mangan, gvožđe i bakar.

Reakcija ovakvog tipa biće pogodna za analitičko određivanje ukoliko ispunjava sledeća dva uslova:

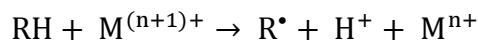
- Oksidacioni potencijal E_M° redoks para $\text{M}^{(n+1)+}/\text{M}^{n+}$ u reakcionim uslovima treba da je veći od potencijala E_{Red}° redoks para P_1/Red , a niži od oksidacionog potencijala E_{Ox}° redoks para Ox/P_2 , tj.

$$E_{\text{Ox}}^{\circ} > E_M^{\circ} > E_{\text{Red}}^{\circ}$$

- Direktna interakcija između Red i Ox je termodinamički dopustiva, ali se sporo odigrava, dok oksidacija M^{n+} pomoću Ox protiče brzo.

2.1.3.2. Redoks reakcije sa organskim supstratima

Reakcije ovog tipa obično uključuju oksidaciju arilamina, fenola ili obojene organske supstance (boje). Oksidacijom arilamina i fenola dobijaju se obojeni produkti, dok oksidacijom obojenih organskih supstanci obično se dolazi do obezbojavanja. Zbog toga se kinetike takvih reakcija najčešće ispituju spektrofotometrijski. Ove oksidacije su najčešće spore ali se mogu katalizovati metalnim jonom. Kada se koriste metalni joni prelaznih metala (i drugi jednoelektronski oksidansi), prvi stepen oksidacije arilamina ili fenola je uvek homolitičan:



gde R^\bullet predstavlja arilaminov radikal ($ArNH^\bullet$) ili ariloksi radikal (ArO^\bullet). Niska jonizaciona energija arilamina i fenola omogućava lako otkidanje elektrona. Radikali se stabilizuju konjugacijom nesparenog $2p_z$ elektrona azota ili kiseonika sa π -elektronskim sistemom aromatičnog prstena. Reagensi sa supstituentima koji povećavaju elektronsku gustinu u konjugovanom sistemu se oksidišu lakše nego li kad su nesupstituisani. Tako homolitična oksidacija polifenola, arilamina, aminofenola, alkil- i aril-supstituisanih fenola i aril amina protiče vrlo lako.

Stvaranje primarnih arilaminskih i fenolnih radikala i njihovo dalje reagovanje jako zavisi od pH sredine. U kiselim sredinama obično se stvaraju manje reaktivni produkti sa relativno niskim molekulskim težinama. Poslednja reakcija ne protiče tako lako u kiselim rastvorima, a koordinacija metalnog jona sa slobodnim elektronskim parom azota ili kiseonika je otežana, zbog velikog broja konkurentnih H^+ jona. Velika brzina stvaranja radikala u alkalnom rastvoru povećava koncentraciju radikala, a ujedno i broj mogućih produkata reakcije. Alkalna sredina može da stabilizuje neke vrste radikala, kao semihinone dobijene tokom oksidacije polifenola.

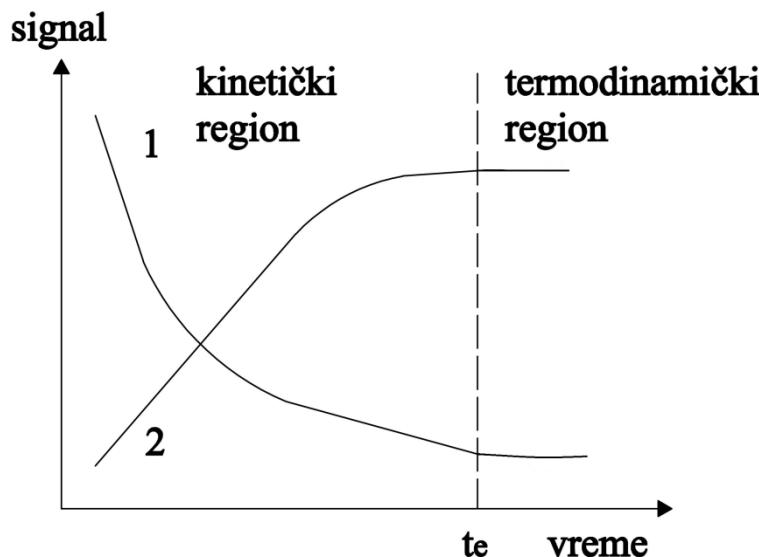
2.1.4. Kinetičke metode analize

Kinetičke metode merenja se obavljaju pod *dinamičkim* uslovima u kojima se koncentracije reaktanata i produkata neprekidno menjaju. Kao analitički parametar služi ili pojavljivanje produkta ili nestajanje reaktanta. Nasuprot tome, merenja kod termodinamičkih metoda obavljaju se u sistemu koji se nalazi u ravnoteži, tako da su koncentracije nepromenljive.

Razlika između ova dva tipa metoda ilustrovana je slikom 2.9, koja prikazuje vremensko odigravanje reakcije:



u kojoj A označava analit, R reagens, a P produkt. Termodinamičke metode koriste vreme nakon t_e , nakon koga je koncentracija reaktanata i produkata postala stalna, a hemijski sistem je u ravnoteži. Nasuprot tome, kinetičke metode koriste vremenski interval od 0 do t_e , u kome se koncentracije reaktanata i produkata neprekidno menjaju.



Slika 2.9. Promena koncentracije analita (1) i produkata (2) u funkciji vremena.

Kod kinetičkih metoda selektivnost se postiže odabirom reagensa i uslova koji pojačavaju razlike u *brzinama* kojima uzorak i moguće interferencije reaguju. Kod termodinamičkih metoda selektivnost se postiže odabirom reagensa i uslova koji povećavaju razlike u *ravnotežnim konstantama*.

Postoje dva tipa kinetičkih metoda koje se temelje na katalitičkim reakcijama. Kod prvog tipa analit je katalizator, a određuje se na osnovu njegovog katalitičkog uticaja u indikatorskoj reakciji, koja uključuje lako merljive reaktante ili produkte. Ove metode se ubrajaju u najosetljivije hemijske metode. Kod drugog tipa kinetičkih metoda uvodi se katalizator koji ubrzava reakciju između analita i reagensa. Ovakve metode su često vrlo selektivne, čak specifične, naročito ako se kao katalizator koristi enzim (Skoog i sar., 1998).

2.1.4.1. Vrste kinetičkih metoda

Za merenje brzine hemijskih reakcija potrebno je pratiti promenu koncentracije sa vremenom bilo kog reaktanta ili proizvoda reakcije. Međutim, kod kinetičkih metoda analize, za praćenje kinetike hemijskih reakcija češće se primenjuju tzv. indirektne metode. Kao preduslov za primenu neke indirektne metode, neophodno je da postoji što prostiji i linearan odnos između merene fizičke osobine (apsorbancije, električne provodljivosti, jačine difuzione struje i dr.) i koncentracije analizirane supstance.

U zavisnosti od odnosa koji postoji između merene veličine i koncentracije uzorka, kinetičke metode se dele na diferencijalne i integralne metode.

Kod *diferencijalnih metoda* koncentracije se računaju iz diferencijalnih oblika izraza za brzinu. Brzine se određuju merenjem nagiba krivih koje opisuju koncentraciju analita ili produkta kao funkcije vremena odigravanja reakcije. To se može objasniti ako se zameni $[A]$ iz jednačine

$$\text{brzina} = \frac{-d[A]}{dt} = k[A] \quad (\text{za reakciju } A \rightarrow P)$$

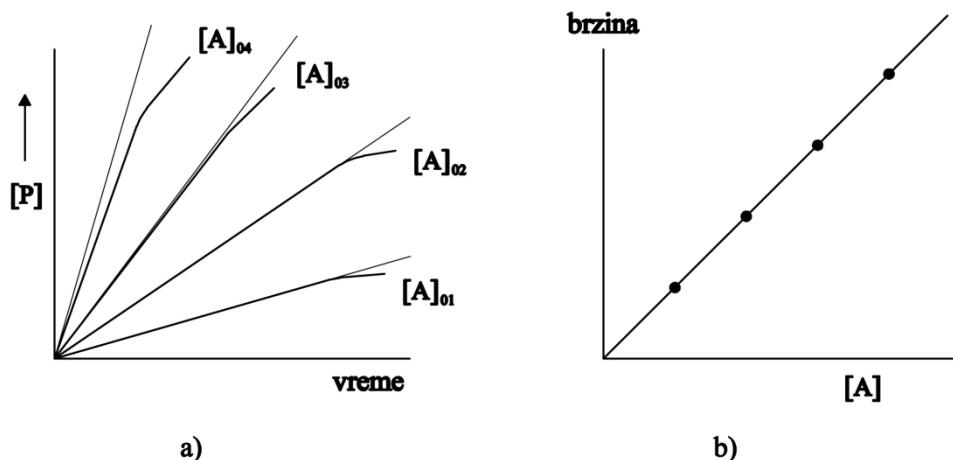
sa $[A]_t$ iz jednačine:

$$[A]_t = [A]_0 e^{-kt} \quad \text{da je:}$$

$$\text{brzina} = -\left(\frac{d[A]}{dt}\right)_t = k[A]_t = k[A]_0 e^{-kt} \quad 2.42$$

Osim toga, brzina se može izraziti i pomoću koncentracije produkta. Jednačina 2.42 pokazuje da brzina reakcije zavisi od konstante k , vremena t , i kao najvažnije od početne koncentracije analita $[A]_0$. Pri bilo kom određenom vremenu t faktor ke^{-kt} je konstantan, tako da je brzina srazmerna početnoj koncentraciji analita.

Izbor vremena u kome se meri brzina često se temelji na mogućnosti preciznog merenja u određenom vremenu, postojanju sporednih reakcija koje ometaju merenja i dr. Često je pogodno merenja vršiti u blizini vremena $t=0$, jer je taj deo eksponencijalne krive približno linearan, pa je lako moguće odmeriti nagib pomoću tangente na krivi (slika 2.10).



Slika 2.10. Diferencijalna metoda.

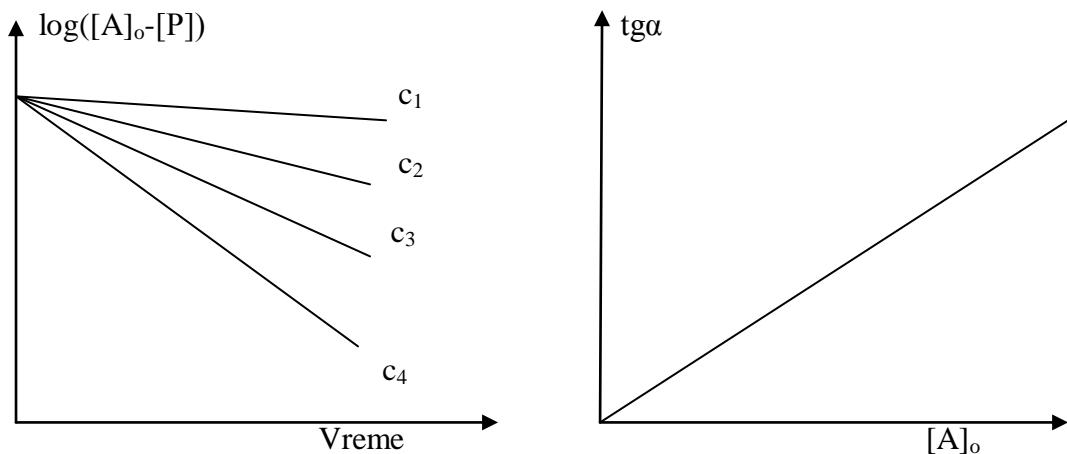
Slika 2.10 prikazuje primenu diferencijalne metode za određivanje koncentracije uzorka analita iz eksperimentalnih podataka merenja brzine reakcije. Krive nacrtane punom linijom na slici prikazuju izmerene vrednosti koncentracije produkta $[P]$ kao funkcije

vremena reakcije za četiri različite koncentracije A. Ove krive se koriste za konstruisanje kalibracione krive. Brzine se dobijaju pomoću tangenata na svaku krivu slike 2.10a., pri vremenu blizu nule (tanke linije). Kada se tangens ugla nagiba prikaže u funkciji [A] dobija se prava prikazana na slici 2.10b.

Nasuprot diferencijalnim metodama, *integralne metode* primenjuju integralne oblike zakona brzine. Naime, preuređenjem jednačine (2.42) dobija se:

$$\ln[A]_t = -kt + \ln[A]_0 \quad 2.43$$

pri čemu bi se kao kinetička kriva dobila zavisnost prirodnog logaritma eksperimentalno izmerene vrednosti koncentracije A (ili P) u funkciji vremena sa pravcem nagiba $-k$ i odsečkom $\ln[A]_0$ na y-osu (slika 2.11).



Slika 2.11. Integralna metoda.

U skladu sa jednačinama (2.42 i 2.43), za obradu kinetičkih podataka koriste se sledeće metode: *tangensna metoda* (diferencijalna varijanta tangensne metode je poznata kao „*metoda inicijalne brzine*“), *metoda fiksnog vremena*, *metoda fiksne koncentracije* i *metoda indukcionog perioda* (Jacimirskii i sar., 1967, Perez-Bendito i Silva, 1988).

2.1.4.2. Karakteristike kinetičkih metoda analize

Kinetičke metode analize zauzimaju značajno mesto u savremenoj kvantitativnoj hemijskoj analizi. Posebna oblast primene kinetičkih metoda analize je u određivanju niskih koncentracija organskih supstanci. Posebno veliki izazov predstavlja povećanje osetljivosti i selektivnosti kinetičkih metoda za određivanje organskih molekula i biomolekula.

Osnovne karakteristike analitičkih metoda su: osetljivost, selektivnost, tačnost i preciznost.

Osetljivost, S je svojstvo instrumenta, a u instrumentalnoj analizi izražava se kao nagib kalibracione krive $y = f(x)$:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad 2.44$$

Pojam osetljivosti i dalje je jedan od najkontraverznejih pojmova u analitičkoj hemiji. Iako se jasno razlikuje od limita detekcije i dalje se u nekim radovima ovi pojmovi koriste kao sinonimi.

Koncept osetljivosti trenutno se identificuje sa nagibom kalibracione krive, tj. sa IUPAC-ovom analitičkom osetljivošću. Osetljivost treba računati kao odnos nagiba i njegove standardne devijacije. Prema tome, osetljivost raste sa porastom nagiba i smanjenjem standardne devijacije. Ovo je dobar kriterijum za poređenje analitičkih metoda i tehnika.

Prema IUPAC-ovoj definiciji, *limit detekcije* je najmanja koncentracija ili količina analita za koju se može tvrditi da se statistički razlikuje od slepe probe. Limit detekcije, c_L se može izraziti jednačinom:

$$c_L = \frac{x_L - \bar{x}_{SP}}{m} \quad 2.45$$

gde je: x_L - analitički signal koji odgovara koncentraciji c_L ,

\bar{x}_{SP} - srednja vrednost odgovora slepe probe za n ispitivanja (obično $n \geq 20$),

m - analitička osetljivost (ili nagib kalibracione prave).

Detekcioni limit se može izraziti preko standardne devijacije slepe probe, standardne devijacije fitovanja kalibracione prave ili standardne devijacije odsečka:

$$c_L = \frac{\kappa \cdot S}{m} \quad 2.46$$

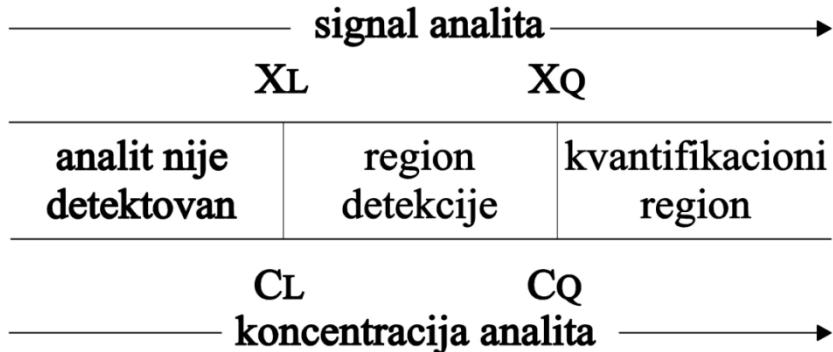
Gde je κ numerički faktor izabran prema željenom nivou pouzdanosti. Obično se uzima da je $\kappa=3,3$, što bi trebalo da odgovara verovatnoći od 99,86% (tj. verovatnoći da će se 99,86% x_L nalaziti u datom intervalu pouzdanosti).

Kvantifikacioni limit (granica određivanja) je najmanja koncentracija ispitivane supstance u uzorku koja može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću, pod datim eksperimentalnim uslovima i izračunava se prema jednačini:

$$c_Q = \frac{10S}{m} \quad 2.47$$

Postoje tri glavna analitička regiona (slika 2.12) povezana sa određivanjem supstance:

- a) region u kome se analit ne može pouzdano odrediti, za koncentracije manje c_L ;
- b) detekcioni region, između c_L i c_Q i
- c) kvantifikacioni region, za koncentracije veće ili jednake c_Q .



Slika 2.12. Regioni analitičkog određivanja.

Osetljivost i detekcioni limit kinetičkih metoda se mogu poboljšati optimizacijom eksperimentalnih uslova (temperatura, pH vrednost, koncentracija reaktanta, jonska jačina, dielektrična konstanta rastvarača), primenom separacionih tehnika i pre svega upotrebom aktivatora. Pored povećanja osetljivosti i smanjenja detekcionog limita, primena aktivatora povećava selektivnost kinetičke analitičke metode.

Prema IUPAC-u, *selektivnost* je stepen interferiranja drugih supstanci na određivanje analita datom metodom. Interferent je supstanca koja dovodi do sistematske greške u određivanju analita.

Kinetičke metode su selektivnije od ravnotežnih, jer se zasnivaju na diferencijalnim, a ne apsolutnim merenjima. Zato izostaje interferencija signala od drugih komponenti uzorka sve dok one ne interaguju sa nekom komponentom sistema. Njihova veća selektivnost proizilazi iz dinamike procesa. Krakto vreme mešanja uzorka i reagensa i činjenica da merenje počinje odmah nakon mešanja smanjuje efekat interferenata. Uticaj interferenata kod ravnotežnih metoda je znatno veći, što je posledica dugog vremena potrebnog za postizanje ravnoteže, u toku kog aktivni interferenti mogu reagovati sa jednom ili više komponenti sistema, uključujući i analit.

Tačnost nekog rezultata označava blizinu tog rezultata njegovoj pravoj vrednosti i vezana je za odstupanja primenjene metode određivanja. Opisuje se kao apsolutna ili relativna greška. Tačnost se može odrediti poznavajući pravu vrednost merene veličine ili srednju vrednost velikog broja merenja iste.

Recovery je mera mogućnosti analitičke metode da tačno izmeri čistu supstancu kada se njena poznata količina (spike) doda u uzorak koji se rutinski analizira, pri čemu se uzima u obzir uticaj svih supstanci realno prisutnih u matriksu tog uzorka. Zbog toga je recovery u direktnoj vezi sa tačnošću metode i može da se koristi za procenu njene primenljivosti, naročito u situacijama kada nema odgovarajuće referentne metode ili referentnog materijala. Recovery vrednosti između 95 i 105 % predstavljaju dokaz odsustva interferencija u određivanju analita.

Preciznost je mera usaglašenosti rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz istog uzorka pod istim uslovima. Termin preciznosti danas je zamenjen terminom *nepreciznost* koja se izražava standardnom devijacijom ili koeficijentom varijacije izračunatim iz grupe ponovljenih merenja, a predstavlja meru za slučajnu grešku. Na veličinu slučajne greške, odnosno na nepreciznost metode određivanja u jednoj/više serija uzoraka koje se rade u jednom danu utiču različiti faktori: nestabilnost instrumenta, promena temperature, promena sastava reagensa i standarda, promena zapremine pipetiranjem, nejednako mešanje u svim uzorcima, složenost procedure rada, zamor operatera itd. Slučajna greška se povećava kada se metoda primenjuje iz dana u dan, jer se pojavljuju novi faktori uticaja: promene u reagensima i standardima, naročito ako se svakog dana priprema svež reagens, promene u radu aparata itd. Zbog toga je za svaku metodu potrebno odrediti *ponovljivost* tj. *nepreciznost u seriji* (u jednom danu) i *srednju preciznost* tj. *nepreciznost iz dana u dan*.

2.2. FENOLNA JEDINJENJA

Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu biljnih metabolita koja mogu biti vrlo jednostavne strukture, kao što su fenolne kiseline, ili vrlo složene strukture, odnosno, polikondenzovana jedinjenja kao što su proantocijanidoli. Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Do danas je identifikovano više od hiljadu, u slobodnom obliku ili češće u obliku glikozida (*Leucuta i sar.*, 2005). Monosaharidi koji najčešće ulaze u sastav glikozida su: glukoza, galaktoza, arabinosa, ramnoza, ksiloza, manoza, glukuronska i galakturonska kiselina, pored toga šećeri mogu biti prisutni u obliku: mono-, di-, tri-, ili tetra-saharida.

U literaturi se navode različite klasifikacije fenolnih jedinjenja, po jednoj ova jedinjenja se svrstavaju u sledeće grupe:

- Flavonoidi
- Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture
- Isparljiva fenolna jedinjenja

Međutim, najčešća klasifikacija se zasniva na broju ugljenikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola (*Robards i sar.*, 1999), što je prikazano u tabeli 2.1.

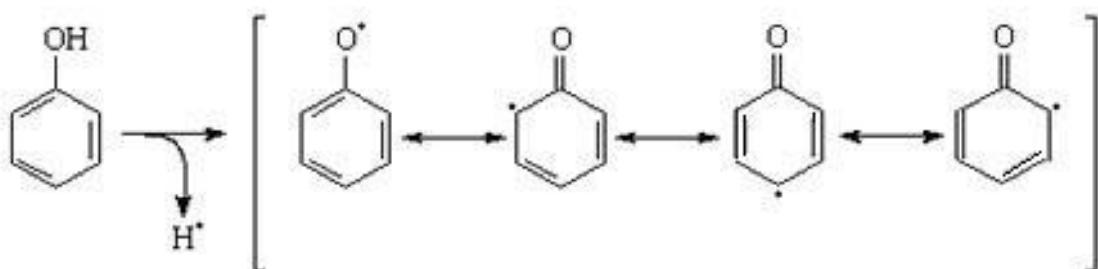
Smatra se da je antioksidativna aktivnost fenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju slobodne radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala:



Povećana stabilnost fenoksil radikala pripisuje se prvenstveno delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi (slika 2.13):

Tabela 2.1. Klasifikacija fenolnih jedinjenja.

Osnovni skelet	Klasa	Jedinjenje
C6	Prosti fenoli	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
	Benzohinoni	
C6-C1	Fenolne kiseline	p-hidroksibenzoeva kiselina
C6-C2	Fenilsirćetne kiseline	p-hidroksifenilsirćetna
C6-C3	Cimetne kiseline	Kafena kiselina, ferulna kiselina
	Fenilpropeni	Eugenol, miristicin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
C6-C4	Naftohinoni	Juglon
C6-C1-C6	Ksantoni	Mangostin, magniferin
C6-C2-C6	Stilbeni	Razveratrol
Antrahinoni	Emodin	
	Flavonoidi	
	Flavoni	Apigenin, luteolin, sinensitin, nobiletin, izosinensitin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvarcetin, kamferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
C6-C3-C6	Flavanoli	Dihidrokvarcetin i dihidrokamferol glikozidi
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin
	Flavanon glikozidi	Hesperidin, neohesperidin, narirutin, naringinin, eriocitrin
	Antocijanini	Glikozidi peralgonidina, peonidina, delfnidina, petunidina, cijanidina
	Katehini	Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin
(C6-C3)2	Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonarigenin
	Lignini	Pinorezinol
(C6-C3-C6)2	Biflavonoidi	Agatisflavon, amentoflavon



Slika 2.13. Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala.

Sa povećanjem stabilnosti nastalog fenoksil radikala povećava se mogućnost nastajanja reakcija koje dovode do slobodno radikalnih procesa kod flavonoida, kumarina i fenolnih kiselina. Dokazano je da su vicinalne diolne funkcije značajne za kapacitet hvatanja radikala kao i da metoksilacije ili glikolizacije o-hidroksi grupa kumarina i esterifikacija fenolnih kiselina smanjuju antioksidativnu aktivnost ovih jedinjenja.

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

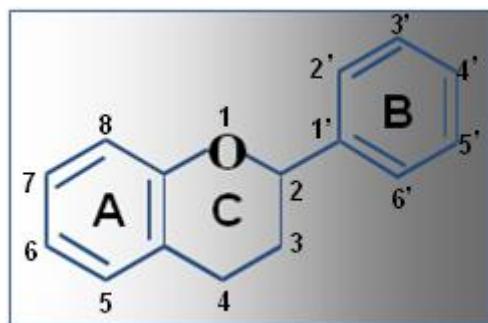
Fenolna jedinjenja nisu ravnomerno rasprostranjena u biljnim tkivima. Najznačajniji izvori fenolnih jedinjenja, a time i izvori antioksidanata su razni napici (crno vino, voćni sokovi, zeleni i crni čaj, kafa, pivo), kakao, crna čokolada, jezgrasto voće (lešnik, badem, kikiriki), šljive, grožđe, borovnice, brusnice, kupine, maline, jabuke, masline, soja, integralne žitarice, brokoli, celer, itd., što je dalo u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Prirodni izvori fenolnih jedinjenja (Sakakibara, 2003).

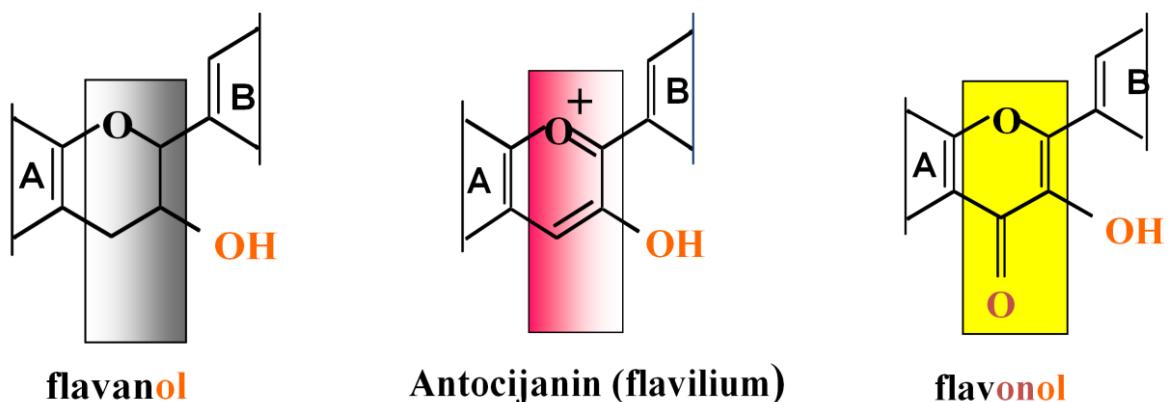
Klasa	Primer	Izvor
Prosti fenoli	Hlorogenska, kafena, galna, ferulna kiselina	veoma rasprostranjeni, naročito u krtolastom povrću
Glikozidi flavona i flavonola	Apigenin, luteolin, kvercetin, kamferol, glikozidi miricetina	lisnato povrće
Aglikoni flavona i flavonola	Apigenin, luteolin, galangin	peršun, celer, prokelj i biljke
Izoflavoni	Genistein, daidžein i njihovi glikozidi	soja
Flavanoni	Naringenin i glikozidi hesperidina	citrus voće
Katehini	Epigalokatehin, epigalokatehingalat, galokatehin	čajevi i kakao
Antocijani	Pelargonidin, cijanidin, malvidin, delfnidin	obojeni prirodni proizvodi: patlidžan, borovnica, crna soja
Antrahinoni	Emodin, hrizofanol, rein	krušina, sena, aloja

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najzastupljenija grupa fenolnih jedinjenja u biljkama sa 15 atoma ugljenika u osnovnoj C₆-C₃-C₆ strukturi (slika 2.14), od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C) a ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva (slika 2.14 i slika 2.15) (flavoni, flavonoli, flavononi, dihidroflavoni, flavan-3-oli, flavan-3,4-dioli i antocijanidini), tri (izoflavoni) i četiri (neoflavoni).

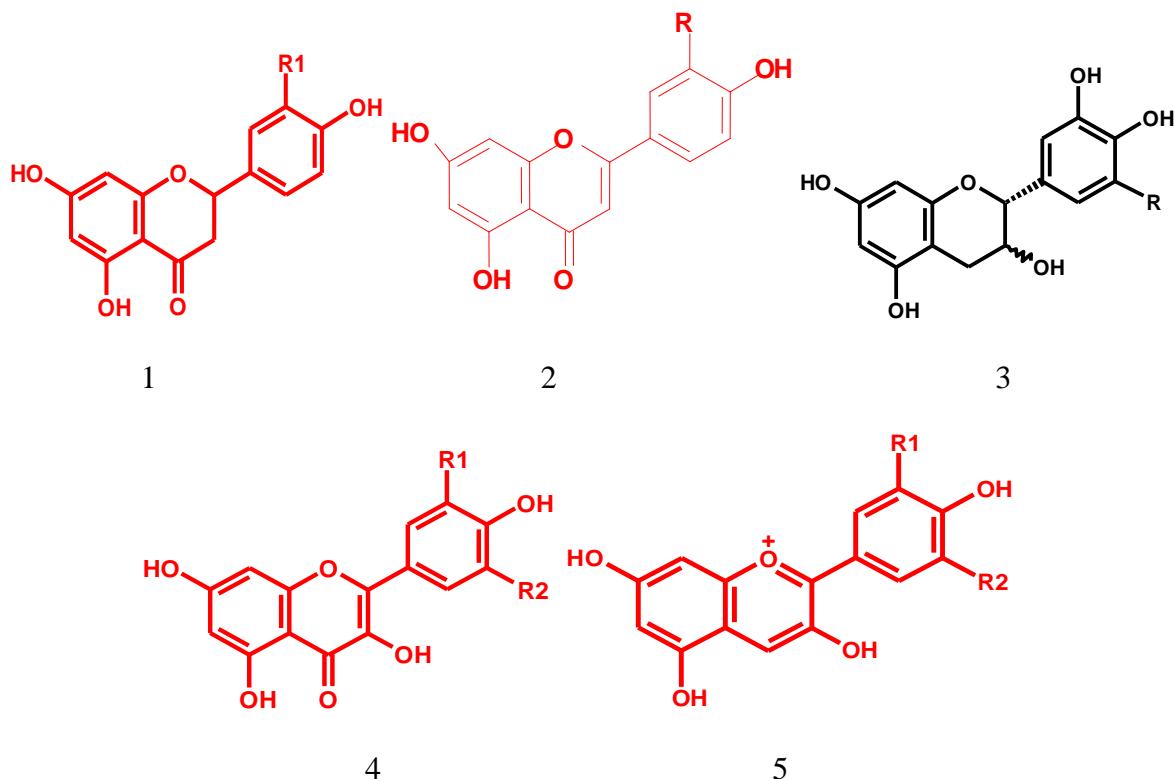


Slika 2.14. Osnovni skelet flavonoida.



Slika 2.15. Razlike između osnovnih klasa flavonoida.

Osnovno jedinjenje, po kojem je čitava grupa dobila ime, izolovao je 1985. godine *Kostanesku* i nazvao ga *flavon* (lat. *flavus*, žut). Prema stepenu oksidacije centralnog piranskog prstena flavonoidi se mogu podeliti u nekoliko klasa što je prikazano u tabeli 2.3, dok su strukture različitih klasa flavonoida prikazane na slici 2.16.



Slika 2.16. Struktura različitih klasa flavonoida.

Tabela 2.3. Različite klase flavonoida

1	Flavanoni	R=H, OH, OMe
2	Flavoni	R=H, OH
3	Flavanoli	R=H-katehin, R=OH-galokatehin
4	Flavonoli	R ₁ , R ₂ =H, OH
5	Antocijanini	

Zbog svoje specifične strukture flavonoidi su potencijalni prirodni antioksidanti. Prisustvo flavonoida dovodi do prekidanja slobodno-radikalnih 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:



Kao snažni antioksidanti, fenolna jedinjenja različitim mehanizmima neutrališući slobodne radikale u ćelijama, mogu da spreče oksidativna oštećenja DNK i širenje tumora (*Ohshima i sar., 1998*). Osim toga, flavonoidi kvercetin i naringenin inhibiraju enzime citochroma-P450, za koje je dokazano da potpomažu bioaktivaciju karcinogena. Fenolna jedinjenja kao antioksidanti, mogu uticati i na primarni proces starenja, mogu biti efikasni inhibitori oksidacije LDL, a epidemiološka proučavanja pokazuju inverzni odnos između unosa hrane bogate flavonoidima i kardiovaskularnih oboljenja. Svi ovi podaci ukazuju na to da povećana konzumacija voća i povrća bogatog nutritivnim i nenutritivnim sastojcima koji ispoljavaju antioksidativna svojstva može doprineti poboljšanju kvaliteta života.

2.2.2. Antocijani

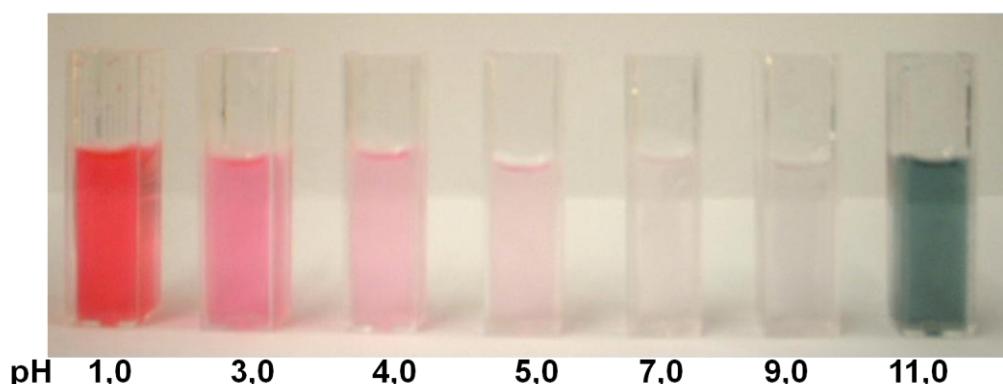
Antocijani (*anthos*-cveće, *kyanos*-plav) su klasa flavonoidnih jedinjenja koja predstavljaju prave biljne pigmente. Prvi put su izolovani još 1835. godine. Mogu se naći u svim delovima biljke, od cveta do korena, a osim što biljci daju obojenost, štite je i od prekomerne i UV svetlosti, zatim od štetnog dejstva slobodnih radikala, a smatra se i da predstavljaju signalne molekule u odgovoru biljke na negativne spoljašnje uticaje (*Gould i sar., 2009*).

Antocijani se u grožđu, za razliku od ostalih flavonoida, pretežno nalaze u obliku glukozida nastalih vezivanjem flavonoidne komponente, koja se naziva antocijanidin, sa šećernom komponentom, najčešće glukozom. Pored glukoze kao šećerna komponenta glikozida mogu se naći i galaktoza i ramanoza. Vezivanjem za šećernu komponentu povećava se stabilnost antocijanidina i njegova rastvorljivost u vodi. Ukoliko antocijani sadrže samo jedan molekul šećera onda se on nalazi isključivo vezan u položaju 3, a ako sadrži dva, onda je ili diglikozid u položaju 3, ili se šećeri nalaze u položajima 3 i 5 (*Lajšić i Grujić-Injac, 1998*). Struktura antocijana može biti dalje usložena vezivanjem sirćetne, kumarne ili kafene kiseline, za šećernu komponentu, pri čemu nastaju tzv. acil derivati (slika 2.18).

Osnovna podela antocijana u šest klasa izvršena je na osnovu položaja slobodnih i metilovanih hidroksilnih grupa na prstenu B (slika 2.18). Međusobni odnos i količina svake pojedinačne klase zavisi od sorte vinove loze i načina njenog uzbijanja, pri čemu odnos antocijanina veoma utiče na nijansu i stabilnost boje grožđa (*Jackson, 2008*). Nijansa, kao i stabilnost boje, grožđa direktno su uslovjeni brojem i položajem slobodnih hidroksilnih grupa na prstenu B, tako je plava nijansa izraženija što je veći broj slobodnih hidroksilnih grupa, dok se njihovim metilovanjem dobija crvena nijansa.

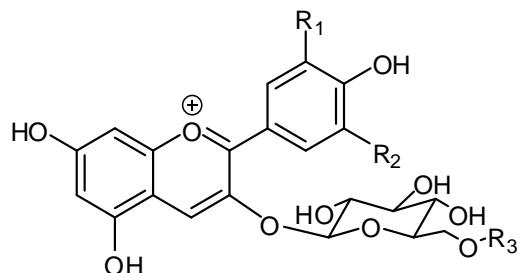
Antocijani su jedinstveni među polifenolima biljaka jer mogu biti prisutni u različitim hemijskim oblicima u zavisnosti od pH sredine, pri čemu ove promene u strukturi se odražavaju i na promenu boje molekula (slika 2.17). Na niskim pH vrednostima antocijani su prisutni u obliku veoma stabilnih, u vodenoj sredini crveno obojenih, flavonijum katjona. Pri povećanju pH vrednosti flavonijum katjon može preći ili u ljubičasto obojenu konjugovanu bazu hinonoidalne strukture, ili može doći do njegove transformacije u poluacetalni oblik, čijom hidrolizom nastaju žuto obojeni halkoni. Neke od predhodno opisanih transformacija mogu biti i ireverzibilne. Na slici 2.19 prikazane su promene u strukturi i boji antocijana pri promeni pH.

Malvidin-3-glikozid (33,0 μM , u fosfatno-citratnom puferu)



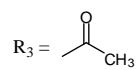
Slika 2.17. Uticaj pH na boju antocijana.

Antocijani

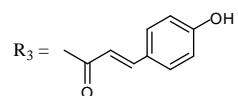


Acil derivati antocijana

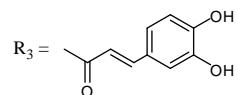
Acetil



Kumaril

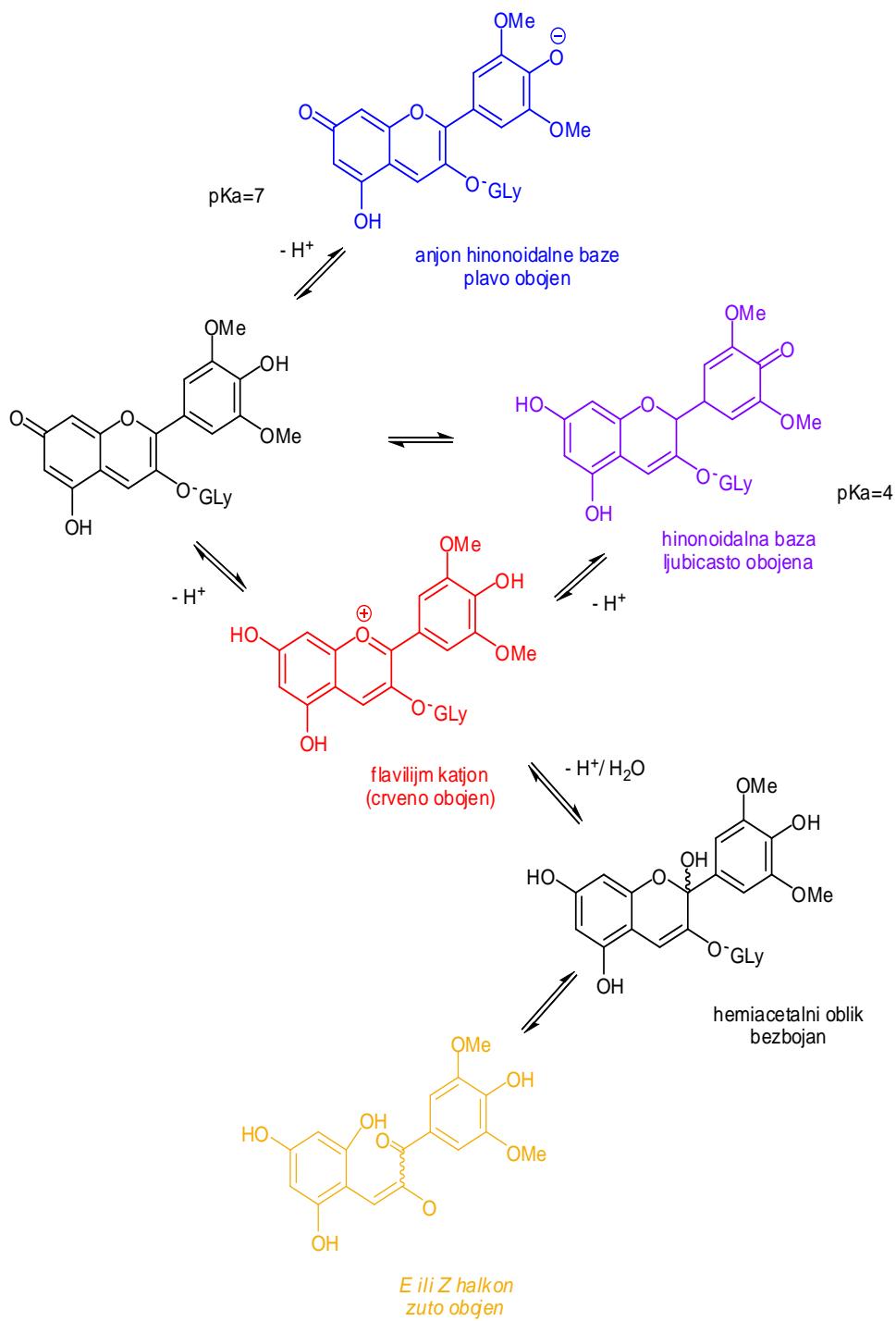


Kafeoil



Antocijanin	R ₁	R ₂	λ_{\max} (nm)	
			R ₃ = H	Antocijani-din
Delfnidin	OH	OH	546	541
Petunidin	OH	OCH ₃	543	540
Malvidin	OC H ₃	OCH ₃	542	538
Cianidin	OH	H	535	530
Peonodin	OC H ₃	H	532	528
Pelargonidin	H	H	520	516

Slika 2.18. Osnovne klase antocijana.

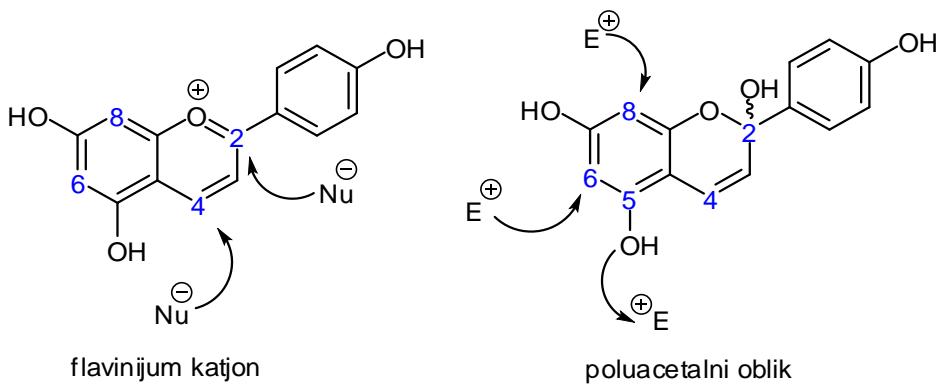


Slika 2.19. Promene u strukturi i boji antocijanina pri promeni pH.

U vinovoj lozi, antocijani se akumuliraju u listovima tokom njegovog biološkog starenja, a odgovorni su i za obojenost pokožice (ponekada i pulpe) crnih i roze sorti grozđa. Akumulacija antocijana u pokožici grožđa počinje nakon fenološke faze, poznate pod

imenom *véraison*, ali njihov sadržaj u mnogome zavisi od vremenskih uslova, pre svega od intenziteta svetlosti i temperatute, što ograničava uzgoj crnih sorti grožđa na umereno topla područja (*Revilla i sar.*, 1998).

Antocijani su zaslužni i za obojenost crvenih i roze vina, koja pored grožđa predstavljaju važan izvor ove klase flavonoida u ishrani. Međutim utvrđeno je da tokom starenja vina dolazi do obrazovanja novih strukturno različitih, najčešće narandžasto obojenih, kopigmenata reakcijom antocijana sa drugim bezbojnim polifenolima, karbonilnim jedinjenjima, jonima metala, proteinima i ugljenim hidratima (*Seabra i sar.*, 2008). Struktura antocijana omogućava im izuzetnu reaktivnost kako ka elektrofilima tako i prema nukleofilima (*Gould i sar.*, 2009). Do nukleofilnog napada može doći u položaju 2 i 4 piranovog prstena C, što je favorizovano pozitivnom šaržom na kiseoniku, dok su mesta elektrofilnog napada hidroksilne grupe, kao i C6 i C8 atomi prstena A u hemiacetalnom obliku antocijanina (slika 2.20).



Slika 2.20. Mesta mogućih elektrofilnih i nukleofilnih napada u strukturi antocijanina.

Smatra se da većina novih familija kopigmenata iz crvenog vina nastaje:

- U reakciji antocijanina sa malim molekulima (piruvatna kiselina, acetaldehid, p-vinilfenol) pri čemu nastaju piranoantocijanski pigmenti,
- Kondenzacijom antocijanina i flavanola u prisustvu aldehyda,
- Direktnom kondenzacijom antocijanina i flavanola.

Nastankom ovih kopigmenata vino zadobija narandžasto-braon nijansu tokom starenja. Boja ovih kopigmenata znatno je stabilnija prema promeni pH, a i prema dekolorizaciji pod dejstvom SO₂ u odnosu na antocijanine.

Skorašnje studije sa čistim antocijaninima i ekstraktima koji su bogati njima na *in vitro* biološkim sistemima pokazale su njihovo blagotvorno dejstvo: u prevenciji oštećenja jetre, na snižavanju krvnog pritiska, na poboljšanje vida, zatim, snažno antiinflamatorno i antimikrobno dejstvo, kao inhibitorno dejstvo na mutacije nastale usled mutagena iz hrane i

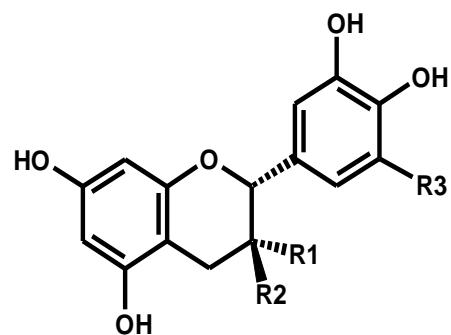
na proliferaciju kancerogenih ćelija kod ljudi. Zajedno sa ostalim polifenolima predstavljaju odlične antioksidante, iako imaju i pro-oksidativno dejstvo. S obzirom na njihovu široku paletu fizioloških dejstava konzumacija antocijana može imati važnu ulogu u prevenciji bolesti, povezanih sa stresnim i brzim načinom života, poput kancera, dijabetesa, kardiovaskularnih i neuroloških bolesti.

2.2.3. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli su gradivne jedinice tanina. Tanini (proantocijanidoli ili proantocijanidini) su polimeri koji se sastoje iz dve ili više različito vezane jedinice flavan-3-ola ili flavan-3,4-diola, pri čemu stereohemija supstituenata na C₂ i C₃ atomu pojedinih jedinica, kao i stereohemija međusobno povezanih jedinica ima važnu ulogu. Najčešće jedinice proantocijanidola su: (-)-epikatehin sa 2,3 cis i (+)-catehin sa 2,3 trans položajem supstituenata.

U zavisnosti od broja OH-grupa u prstenu B i položaja supstituenata na C₂ i C₃ atomu razlikuju se katehinska i galokatehinska serija flavan-3-ola (*Kovač i sar., 1991*), što je prikazano na slici 2.21.

	R1	R2	R3
<i>Katehini:</i>			
(+)-catehin	H	OH	H
(-)-epikatehin	OH	H	H
<i>Galokatehini:</i>			
(+)-galokatehin	H	OH	OH
(-)-epigalokatehin	OH	H	OH



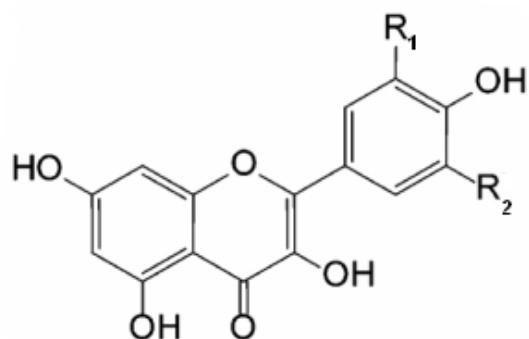
Slika 2.21. Struktura flavan-3-ola.

Katehinska serija je značajnija, pošto je zastupljenija u biljnom svetu. Ova jedinjenja se nalaze u slobodnom obliku, ali mogu biti i esterifikovana, najčešće galnom kiselinom.

2.2.4. Flavonoli

Flavonoli su flavonoidi pronađeni u mnogim biljnim vrstama, uglavnom u obliku glikozida. To su pigmenti žute boje koji određuju boju belih vina, dok su u crvenim vinima i sokovima maskirani antocijanima – crvenim pigmentima. Sinteza flavonola se uglavnom odvija u pokožici bobice (*Price i sar., 1995*). Ekstrakcija flavonola iz pokožice odvija se u fazi maceracije.

Hidroksilne grupe u B prstenu flavonola (slika 2.22) mogu se nalaziti na C-4, C-3' i C-4' i C-3, C-4' i C-5', pa su u voću i proizvodima od voća prisutni kemferol, kvercetin i miricetin. Metilovanjem 3'-OH kvercetina nastaje izoharmnetin. Produkt metilovanja miricetina na C-3', poznat je pod nazivom laricitin. Singletin je dimetoksi derivat miricetina sa metoksi grupama na položajima C-3' i C-5' (*Puškaš, 2010*).



	R ₁	R ₂
kemferol	H	H
kvercetin	H	OH
miricetin	OH	OH
izoharmnetin	H	OCH ₃
laricitrin	OH	OCH ₃
siringetin	OCH ₃	OCH ₃

Slika 2.22. Struktura flavonola.

2.2.5. Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture

Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture, fenolne kiseline i stilbeni, sadrže C₆-C₁, C₆-C₃ ili C₆-C₂-C₆ osnovni skelet. Fenolne kiseline su derivati benzoeve i cimetne kiseline (slika 2.23).



Benzoeva kiselina	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Cimetna kiselina
p-hidroksi benzoeva	H	H	OH	H	Kumarinska
Prokatehinska	H	OH	OH	H	Kafena
Vanilinska	H	OCH ₃	OH	H	Ferulna
Galna	H	OH	OH	OH	

Slika 2.23. Fenolne kiseline.

Fenolne kiseline su prisutne u voću u glikozidnoj formi, iz koje se mogu osloboditi kiselom hidrolizom (*Riberau-Gayon, 1965*). Slobodne fenolne kiseline prisutne u crvenim vinima 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 lako podležu oksidaciji i odgovorni su za brzo potamnjivanje šire.

Hidroksicimetne kiseline su delimično zaslužne za boju crvenih vina, jer njihovom oksidacijom nastaju žuto obojena jedinjenja. Takođe iz derivata cimetne kiseline, pod uticajem kvasca *Brettanomyces* i nekih mlečnih bakterija nastaju isparljivi fenoli. Isparljivi fenoli su jedinjenja koja i u veoma malim koncentracijama daju vinu neprijatan miris (*Puškaš, 2010*).

2.3. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI PROCESI

2.3.1. Definicija i podela slobodnih radikala

Slobodni radikali predstavljaju atome, jone, molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne aktivnosti i nestabilnosti. Oni mogu biti neutralni, ali i pozitivno (*radikal-katjon*) i negativno (*radikal-anjon*) nanelektrisani. Nespareni elektron se može nalaziti na atomima različitih elemenata, pa se slobodni radikali dele na slobodne radikale (reaktivne slobodnoradikalske vrste) kiseonika, hlora, azota itd.

Reaktivne vrste se dele na reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Najvažnije reaktivne vrste kiseonika (ROS – od engl. reactive oxygen species) date su u tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Najvažnije reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste kiseonika.

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil radikal, $\cdot OH$	Hipobromna kiselina, HOBr
Hidroperoksil radikal, HO_2^{\cdot}	Hipohlorna kiselina, HOCl
Peroxsil radikal, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoksil radikal, RO^{\cdot}	Singletni kiseonik, 1O_2
Karbonatni radikal, $CO_3^{\cdot-}$	Organski peroksid, ROOH
Ugljenoksidni radikal, $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$

Slobodni radikali spadaju u najreaktivnije hemijske vrste i zbog svoje visoke hemijske reaktivnosti oni lako stupaju u rekciju, međusobno ili sa drugim molekulima, pri čemu nespareni elektroni obrazuju hemijske veze, oslobađa se energija, a sistem prelazi u niže energetsko stanje.

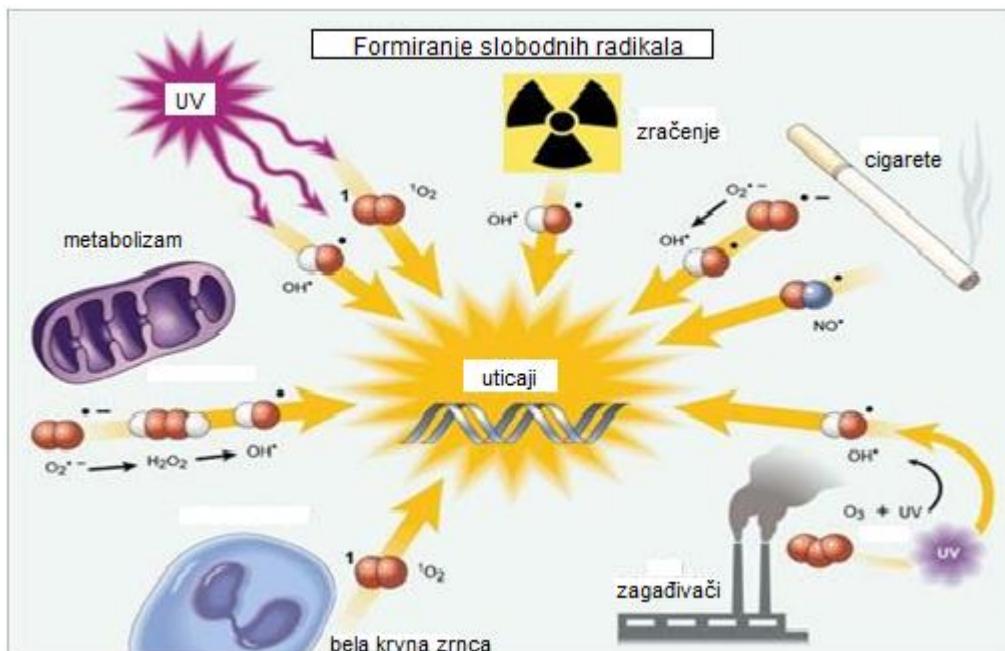
Reaktivni slobodni radikali mogu nastati brojnim reakcijama koje se uglavnom svode na četiri osnovna tipa:

-termolizu

-fotolizu

- oksido-redukcione procese i
- radijaciju visoke energije (*Piletić i sar., 1993.*).

U biosistemima se produkcija slobodnih radikala dešava tokom sledećih procesa: apsorpcije radijacije, fagocitoze, biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatičnom retikulumu, enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, itd. Količinu slobodnih radikala povećavaju zagađeni vazduh, pušenje, stres, izlaganje suncu, hronične bolesti, infekcije i genetska predispozicija na neku bolest (slika 2.24).



Slika 2.24. Šema nastanka slobodnih radikala.

Neki slobodni radikali nastaju i u toku normalnog metabolizma. Preko 90% kiseonika iz vazduha u organizmu sisara redukuje se do vode primanjem četiri elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu mitihondrija (*Acworth, 2003*).

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot -}$) odnosno njegov protonovani oblik, peroksilni radikal ($HO_2^{\cdot -}$), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, a može se dobiti i jednoelektronskom oksidacijom vodonik peroksida. Značajne količine produkuju se u reakcijama katalizovanim nekim oksidazama (npr. ksantin oksidazom) (*Ohara i sar., 1993*).

Hidroksil radikal, ($\cdot OH$) je najreaktivniji od svih ROS i najodgovorniji za citostatičke efekte kiseonika. Brzo reaguje sa biomolekulima, pa je njegov poluživot kratak. Hidroksil radikal se u ćelijama stvara kada postoje uslovi za Haber-Vajsovu ili Fentonovu

reakciju. Takođe, nastaje dejstvom γ -zračenja na molekul vode, u procesu fagocitoze, troelektronskom redukcijom iz molekulskog kiseonika u respiratornom lancu mitihondrija.

Vodonik peroksid (H_2O_2) nije slobodni radikal, ali se ubraja u reaktivne vrste kiseonika. Najstabilniji je, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Nastaje direktno dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom enzimskom mutacijom, dejstvom superoksid dismutaze:



Proces stvaranja vodonik peroksida odvija se na nivou peroksizoma, mitohondrija, mikrozoma i ćelijske membrane.

Singletni kiseonik (1O_2) je izrazito reaktivan, nastaje enzimskim putem, u prisustvu mieloperoksidaza i laktoperoksidaza.

2.3.2. Antioksidanti

Najšire prihvaćena definicija bioloških antioksidanata jeste ona koju je dao Halliwell (1990), a prema kojoj su antioksidanti “supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata”.

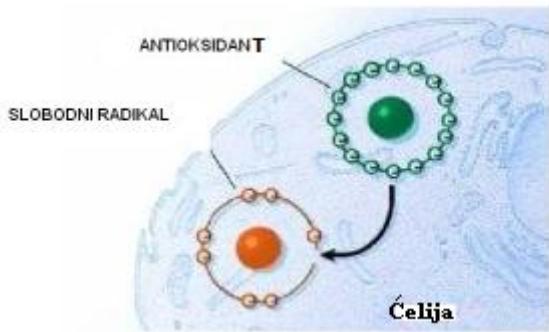
Antioksidanti mogu ispoljavati svoju aktivnost različitim mehanizmima (slika 2.25) zahvaljujući njihovoj sposobnosti da:

- deluju kao “hvatači” (skevindžer) slobodnih radikala
- deluju kao donori elektrona ili
- donori H-atoma

peroksil ili hidroksil radikalima, ili da:

- deluju kao akceptori elektrona i
- akceptori H-atoma

ugljenikovih slobodnih radikala.



Slika 2.25. Način delovanja antioksidanta.

Shi i sar. (2001) klasifikovali su antioksidante prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu na: preventivne antioksidante, "skevindžer" antioksidante i "reparacione" antioksidante. Preventivni antioksidanti sprečavaju nastanak slobodnih radikala. "Skevindžer" antioksidanti poseduju sposobnost da "hvataju" slobodne radikale. "Reparacioni" antioksidanti deluju posebnim mehanizmima, obnavljujući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. U "reparacione" antioksidante ubrajaju se fosfolipaze, proteaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze, itd.

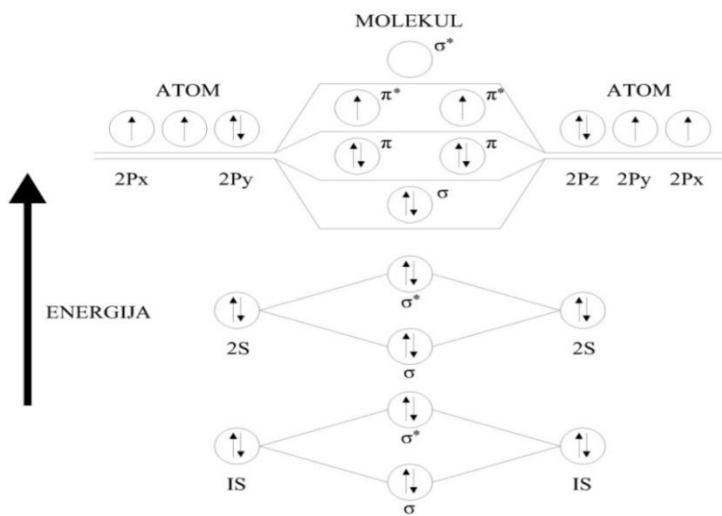
Prema mestu nastajanja antioksidanti značajni za ljudski organizam dele se na: endogene i egzogene. Endogeni antioksidanti predstavljaju antioksidante koji nastaju u ljudskom organizmu, dok se egzogeni unose putem hrane ili lekova. Fenolna jedinjenja su jedna od najvažnijih grupa prirodnih egzogenih antioksidanata, čija je aktivnost uslovljena strukturnim karakteristikama.

2.3.3. Oksidacija fenolnih jedinjenja

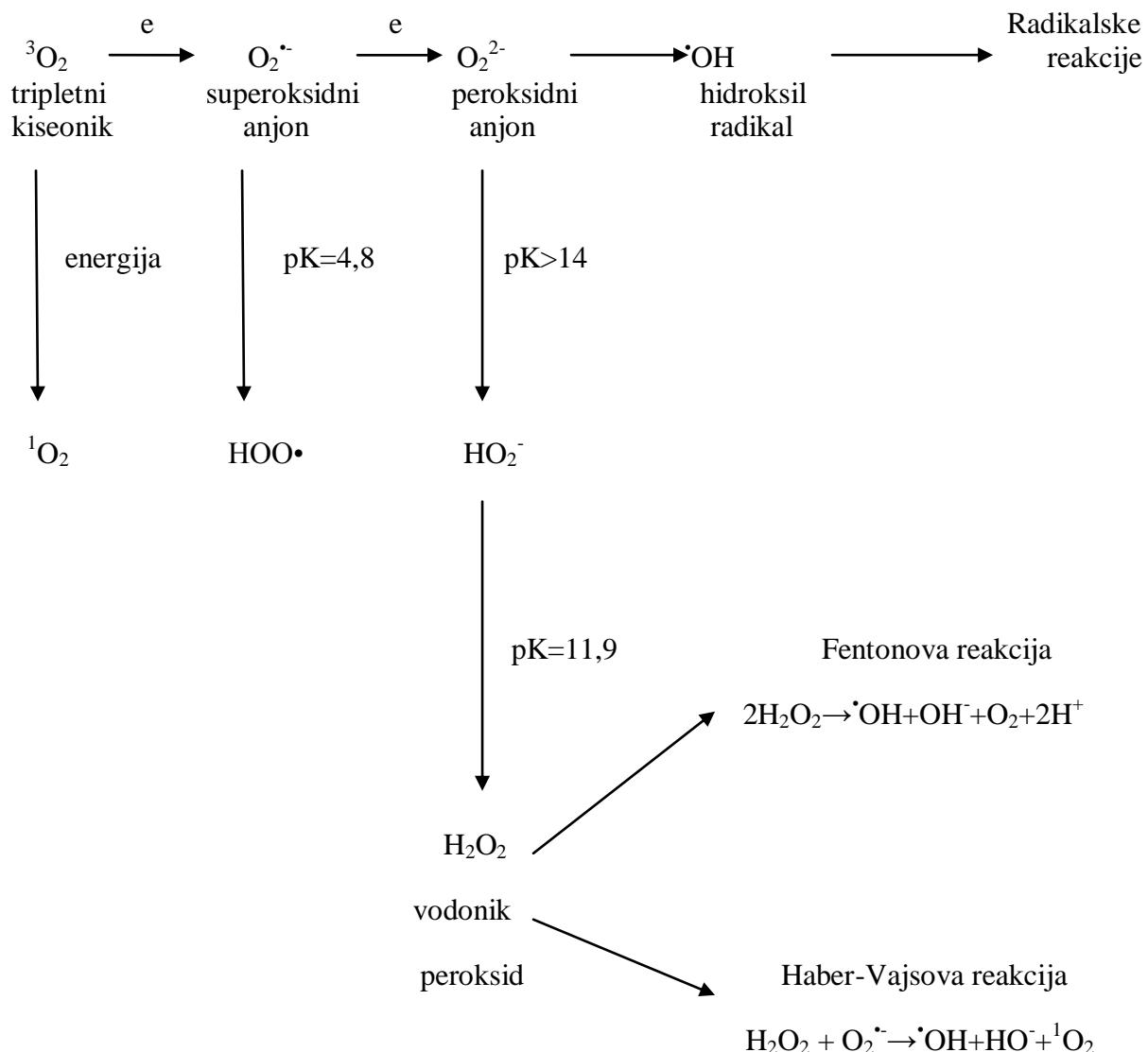
Voće i proizvodi od voća ispoljavaju snažan biološki efekat koji se, pre svega pripisuje visokom sadržaju fenolnih jedinjenja (*Cao i sar., 2009*). Postoji visok stepen pozitivne korelacije između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i pojedinačnog udela galne kiseline, katehina, epikatehina i antioksidativnog potencijala (*Minussi i sar., 2003*).

Najizraženiju aktivnost u pogledu hvatanja slobodnih radikala ima galna kiselina, zatim taninska kiselina, kafena kiselina, kvercetin, rutin, ferulna kiselina, a najnižu aktivnost poseduje resveratrol (*Sanchez-Moreno, 1999*). Međutim, prema *Ghiselli i sar. (1998)* najviši stepen antioksidativne aktivnosti pokazuju antocijani. Videli smo, da su antioksidanti "hvatači" slobodnih radikala, a najčešći slobodni radikali jesu reaktivne vrste kiseonika.

Pri standardnoj temperaturi i pritisku, kiseonik postoji kao gas sa 20,9% u atmosferi. To je diatomni molekul formule O₂. Najstabilniji oblik kiseonika je triplet ³O₂. Tripletni kiseonik je biradikal sa dva nesparena elektrona, koji imaju isti spinski kvantni broj i locirani su u suprotno orijentisanim antivezivnim π^* orbitalama (slika 2.26). Strukturna formula O = O ne simbolizuje biradikalsku prirodu kiseonika, pa je zato treba prikazati kao •O-O•. Sa ovakvom elektronskom konfiguracijom, kiseonik ne može direktno reagovati u mnogim organskim i neorganskim reakcijama.



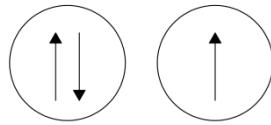
Slika 2.26. Elektronska konfiguracija tripletnog kiseonika



Slika 2.27. Producija reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Dovođenjem energije, osnovno stanje molekula kiseonika se može aktivirati pri čemu nastaje neradikalska vrsta. Reč je o singletnom kiseoniku ${}^1\text{O}_2$, u kojem je spinska restrikcija uklonjena, te je moć oksidacije znatno uvećana (slika 2.27).

U vodenim prirodnim sredinama, jednoelektronskom redukcijom tripletni kiseonik se može prevesti u superoksidni anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), koji se može predstaviti kao $\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$, dovođenjem jednog elektrona u antivezivnu π^* orbitalu (slika 2.28)

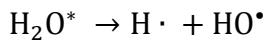
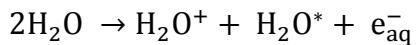


Slika 2.28. Elektronska konfiguracija antivezivne 2π orbitale superoksidnog anjona.

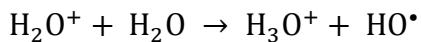
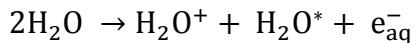
Novonastali radikal ($O_2^{\cdot-}$) se može oksidovati ili redukovati, a pri pH vrednosti vina postoji kao protonovani hidroperoksil radikal ($HOO^{\cdot+}$). Hidroperoksil radikal nastaje u reakciji vodonik peroksida i hidroksil radikala (HO^{\cdot}):



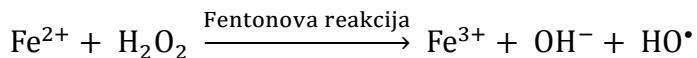
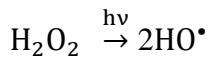
Hidroperoksil radikal (HOO^{\cdot}) može nastati i reakcijom tripletnog kiseonika i atoma vodonika koji nastaje iz vode. Ekscitovano stanje molekula vode se postiže adsorpcijom energije koja molekul vode hidrolitički razlaže na atom vodonika (H^{\cdot}) i hidroksil radikal (HO^{\cdot}) za 10^{-14} - 10^{-13} s (Halliwell i Gutteridge, 2001):



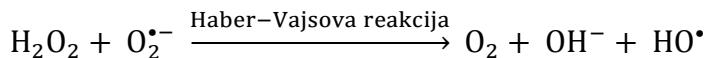
Hidroksil radikal (HO^{\cdot}) može nastati iz vode ili vodonik peroksida. Naime, pod uticajem zračenja visoke energije (γ -zračenje) u vodi protiču sledeće reakcije (Jacobien i sar. 1996):



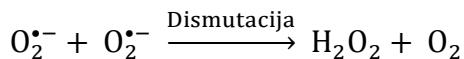
Hidroksil radikali mogu nastati UV-izazvanim cepanjem veze kiseonik-kiseonik u vodonik peroksidu ili dekompozicijom vodonik peroksida u prisustvu kompleksa prelaznih metala (Salem i sar., 2000).



Haber-Vajsovom reakcijom mogu nastati hidroksil radikali u reakciji vodonik peroksida i superoksidnog anjona (Hu i Jiang, 1996):

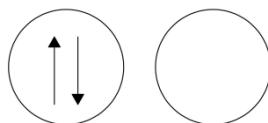


Dismutacijom superoksidnog anjona može nastati vodonik peroksid, reakcijom koja je veoma spora (*Bielski i sar., 19983*):



Konstanta brzine nekatalizovane dismutacije superoksidnog anjona strogoo zavisi od pH rastvora. Pri tome je određeno da se brzina dismutacije superoksidnog anjona kreće od 10^2 do $5 \cdot 10^5$ mol/s za oblast pH od 11 do 7 (*Halliwell i Gutteridge, 2001*).

Singletni kiseonik nije radikal s obzirom da nema nesparene elektrone (slika 2.29).



Slika 2.29. Elektronska konfiguracija antivezivne 2π orbitale singletnog kiseonika

Singletni kiseonik u osnovnom stanju sadrži visoku energiju od 93,6 kJ. U rastvoru prelazi u tripletni kiseonik predajući svoju energiju rastvoru (*Girotti, 1998*). Vreme života singletnog kiseonika zavisi od hemijskih osobina rastvora, u vodi iznosi $2\mu\text{s}$ dok je u ugljentetrahloridu $700\ \mu\text{s}$.

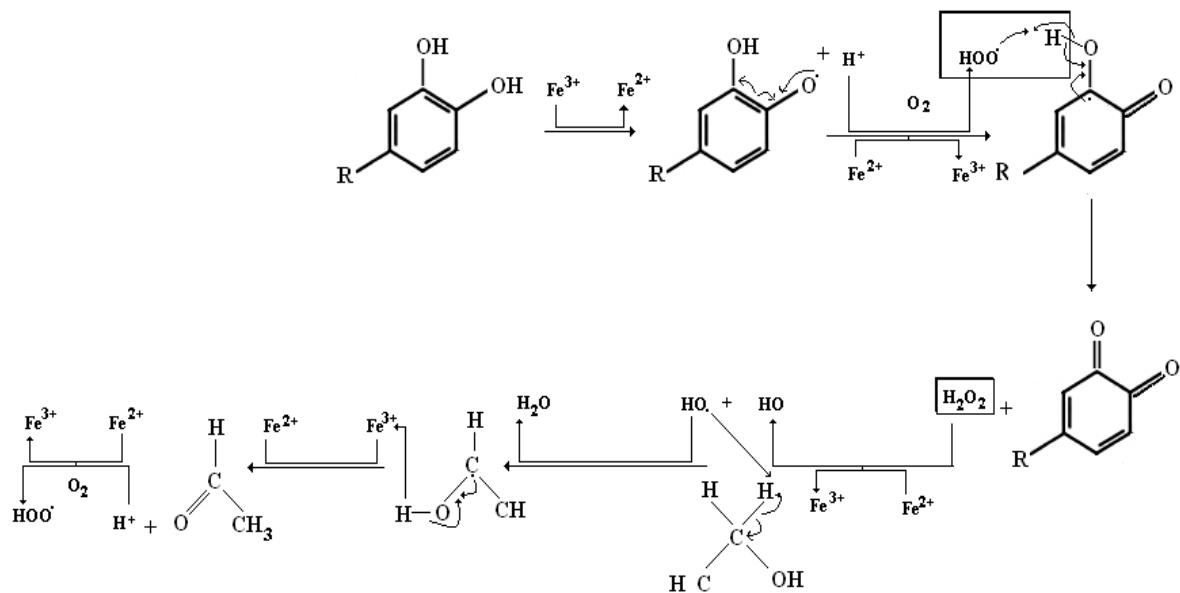
Reaktivnost kiseoničnih vrsta može se prikazati nizom (*Karbowiak i sar., 2010*):

Tripletni kiseonik < superoksidni anjon < hidroperoksidni radikal < peroksidni anjon < hidroksil radikal

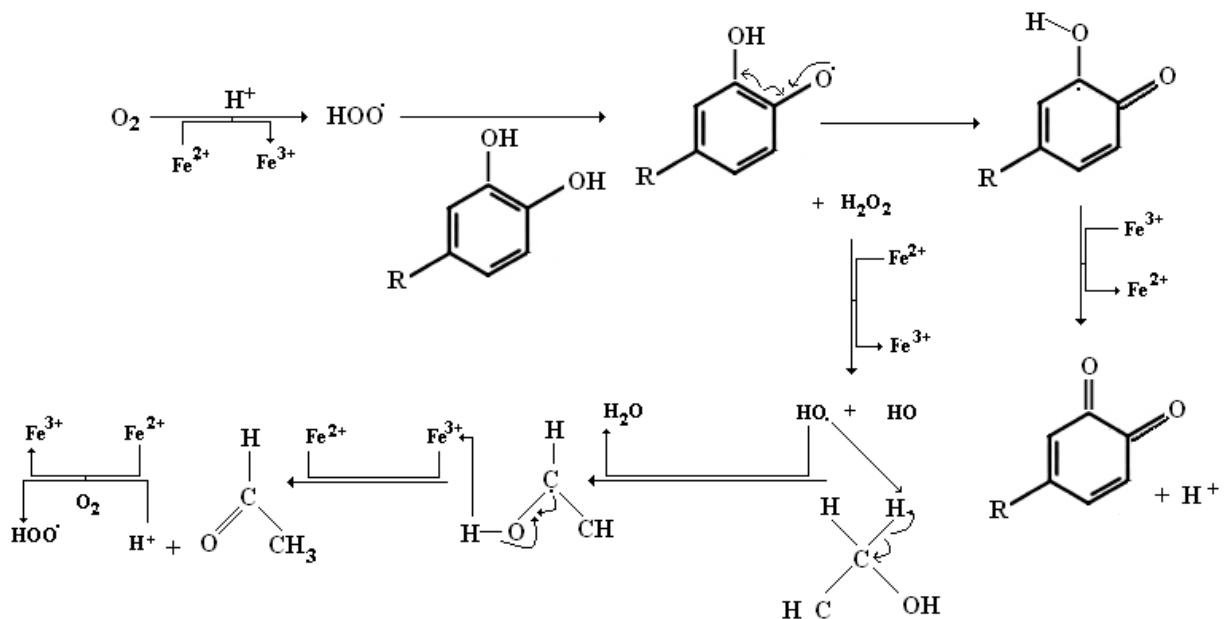
Hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$), nastao redukcijom kiseonika, sa kratkim vremenom života od oko 10^{-6}s u vodi, je trenutno najmoćniji oksidant od svih reaktivnih kiseoničnih vrsta i u mogućnosti je da brzo oksiduje većinu organskih jedinjenja (*Choe i Min, 2005*). Neki autori smatraju da $\cdot\text{OH}$ može da oksiduje gotovo svako jedinjenje u vinu u potpunosti (*Laurie i Waterhouse, 2006*).

Mehanizam hemijske oksidacije vina je dugo proučavan. Ovde će biti prikazane dve hipoteze.

Po prvoj hipotezi, oksidacija fenola vrši se direktno u prisustvu prelaznih metala, kao što su feri joni, uz formiranje semi-hinoidnih radikala koji se dalje oksiduju do odgovarajućih hinona (slika 2.30).



Slika 2.30. Šema oksidacije vina (prva hipoteza).



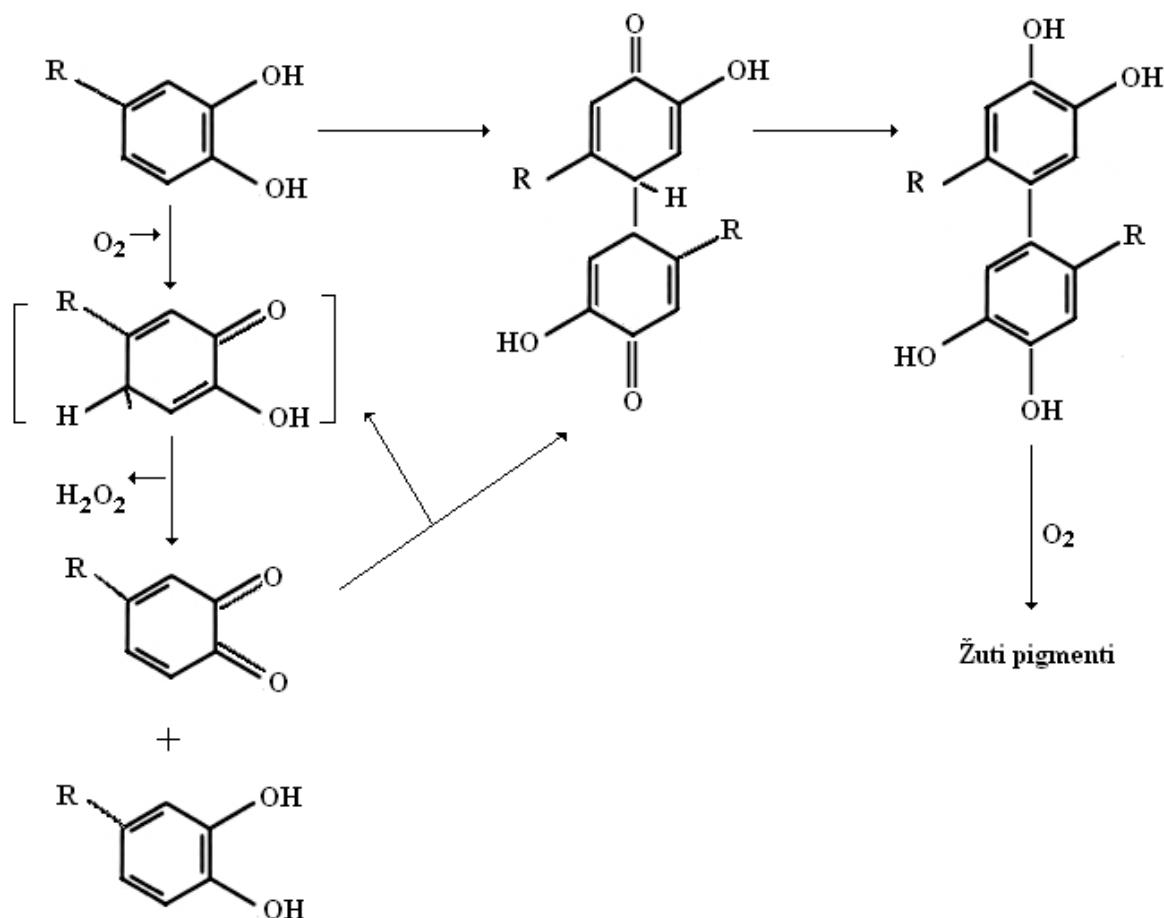
Slika 2.31. Šema oksidacije vina (druga hipoteza).

Paralelno, u lančanoj radikalskoj reakciji, od tripletnog kiseonika posredstvom fero jona nastaju tri reaktivne kiseonične vrste: hidroperoksil radikal, vodonik peroksid i hidroksil radikal. Ove kiseonične vrste su veoma nestabilne i reaguju veoma brzo uključujući pri tome veoma neselektivne reakcije. Ove vrste su sposobne da oksiduju ne samo fenolna jedinjenja već sve supstance koje su prisutne u vinu i sklone su procesu oksidacije. Veliki proj produkata se pri tome formira. S obzirom da je u vinu prisutan u visokoj koncentraciji, etanol se takođe može oksidovati hidroksil radikalima, koji se redukuju do vode. U drugom koraku,

karbon radikal koji se formira od etanola može reagovati sa molekulskim kiseonikom prelazeći u acetilaldehid i novi hidroperoksil radikal. Regenerisani radikali obezbeđuju kontinuitet procesa oksidacije fenolnih komponenti do njima odgovarajućih hinona.

Po drugoj hipotezi (slika 2.31), oksidacija fenola može biti rezultat reakcije fenola sa hidroperoksil radikalima, koji nastaju u reakciji kiseonika sa Fe^{2+} ionima. Naime, fenoli su dobri donori vodonika hidroperoksil radikalima, pri čemu prelaze u semihinonski radikal a dalje u odgovarajuće hinone, dok hidroperoksil radikali prelaze u H_2O_2 . Vodonik peroksid u prisustvu prelaznih metala i etanola učestvuje dalje u već opisanim reakcijama.

Bez obzira na mehanizam, oksidacijom fenola nastaju hinoni. Hinoni, nastali kao primarni proizvodi, su nestabilni i mogu učestvovati u novim reakcijama. Ove reakcije mogu uzrokovati nastajanje pigmenata, proizvoda sa visokom molekulskom masom. Naime, hinoni mogu da se spontano kombinuju sa nukleofilnim jedinjenjima (uključujući neke fenole, amine i dr.) zbog njihovog visokog elektronskog afiniteta i pri tome dolazi do formiranja dimeri ili polimeri. Nastali dimeri ili polimeri u kuplovanoj oksidaciji imaju niži redoks potencijal od polaznih fenola i lakše se oksiduju (slika 2.32) (Li i sar., 2005).



Slika 2.32. Formiranje dimera procesom oksidacije fenola.

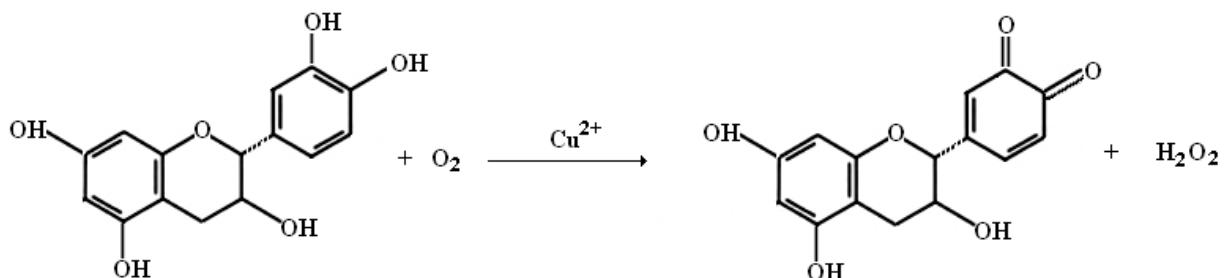
Takođe, acetaldehid, produkt oksidacije etanola, može imati veoma važnu ulogu u procesu oksidacije vina tokom starenja u boci. Acetaldehid je sklon da reaguje sa antocijanima i flavanolima dajući nove polimerne fenole. Kondenzovanim reakcijama sa antocijanima i taninima daje stabilne polimerne pigmenate, koji obezbeđuju stabilnu boju crvenih vina (*Monagas i sar., 2005*).

Uobičajeno, vino sadrži od 0–5 mg/L gvožđa. Međutim, i pri ovako niskoj koncentraciji ovog metala može doći do oksidativnog kvarenja vina. Osim koncentracije, važan je i oblik u kome se nalaze joni gvožđa. Feri jon (Fe^{3+}) prisutan u vinu, nije u slobodnom obliku već u obliku kompleksa sa drugim jedinjenjima. Isti slučaj je i sa fero jonima (Fe^{2+}). Kompleksiranje smanjuje pH vrednost sistema zbog oslobađanja vodonikovih jona. U kiselim vodenim sredinama joni Fe^{3+} i Fe^{2+} su prisutni kao heksaakovkompleksi $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ i $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ jedini reaguje sa kiseonikom i to veoma sporo zbog nepovoljnih termodinamičkih uslova (*Danilewicz, 2003*). Međutim, molekuli vode mogu biti lako zamenjeni drugim ligandima, kao što su neki fenoli (catehol) ili sadrže 3-hidroksi-4-karbonilne grupe (kao što je kafena kiselina). Broj i položaj hidroksilnih grupa takođe utiče na kompleksiranje (*Andelković i sar. 2006*). Broj liganda u kompleksima Fe-polifenoli zavisi od pH: istiskivanjem jednog molekula vode nastaje kompleks sa jednim ligandom (FeL^+) sa dvema orto-hidroksilnim grupama koje ulaze u koordinacionu sferu; sa porastom pH, dva ili tri molekula vode mogu biti zamenjeni pri čemu nastaju FeL^- i FeL^{3-} . Pri tome, kompleksiranje smanjuje potencijal Fe^{3+} - Fe^{2+} , stabilizuje oksidaciono stanje Fe^{3+} i povećava redukcionu sposobnost Fe^{2+} jona, što ukazuje da organski ligandi prisutni u vinu osiguravaju brzu oksidaciju Fe^{2+} jona. Kao rezultat, u prisustvu kiseonika, kiseonik je redukovani do H_2O_2 a Fe^{2+} joni oksidovani do Fe^{3+} , što povećava pokretljivost gvožđa u oksidacionim procesima (*Danilowicz, 2003*).

Bakar takođe može reagovati sa H_2O_2 i generisati hidroksil radikale, i pri tome je mnogo reaktivniji od gvožđa. Osim $\cdot\text{OH}$ mogu nastati i drugi radikali:



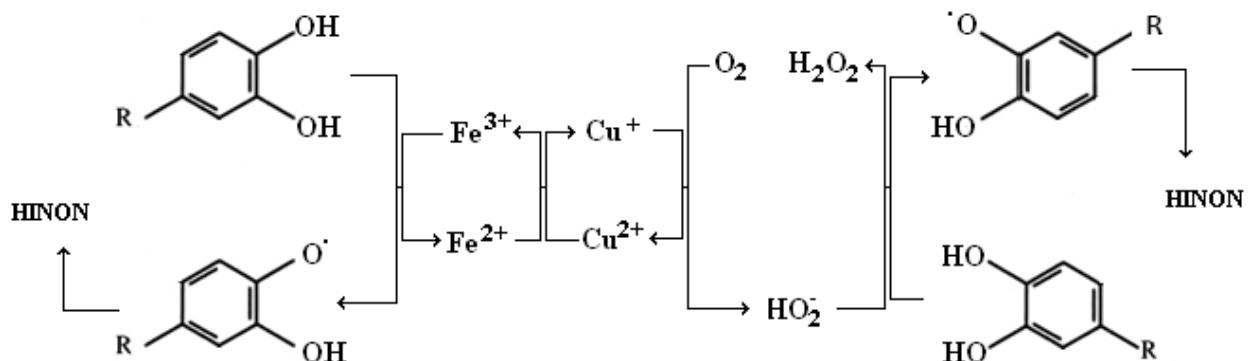
Tako se oksidacija katehina kiseonikom u prisustvu Cu^{2+} jona može prikazati jednačinom (slika 2.33):



Slika 2.33. Oksidacija katehina kiseonikom u prisustvu Cu(II).

pri čemu se Cu^{2+} i $\cdot OH$ stvaraju reakcijom (7).

Uočeno je da postoji sinergijsko delovanje gvožđa i bakra. Tako je Danilewicz (2007) pokazao da prisustvo gvožđa u količini od 5 mg/L izaziva neočekivano mali uticaj na brzinu reakcije oksidacije u odnosu na brzinu reakcije kada se u isti sistem doda i mala količina bakra (0,15 mg/L). Efikasnost gvožđa kao katalizatora u oksidaciji katehola zavisi od redoks ciklusa u kome se fero ion, koji nastaje redukcijom feri jona, vraća u reakcioni ciklus. Bakar obezbeđuje efikasniju interakciju sa kiseonikom, verovatno zbog mogućnosti formiranja CuO_2^+ vrsta. Ceo proces može biti predstavljen šemom (slika 2.34), u kojoj se katehol oksiduje feri jonima i hidroperoksil radikalima, pri čemu je ceo proces vođen kruženjem metala.



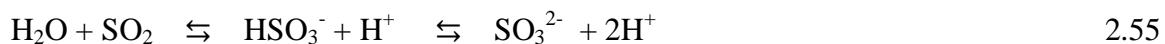
Slika 2.34. Oksidacija katehola u prisustvu gvožđa i bakra.

Oksidacija fenolnih komponenti je dugotrajan problem u proizvodnji vina. Sumpordioksid je najvažnija i najčešće korišćena supstanca za sprečavanje oksidacije vina. Pored antioksidativne aktivnosti SO_2 ima i antimikrobne osobine i druge važne funkcije zbog kojih je godinama korišćen. Međutim, dodavanje SO_2 vinu izaziva ozbiljne alergijske reakcije, zbog čega je "Svetska zdravstvena organizacija" (World Health Organization – WHO) donela niz propisa o njegovoj ograničenoj upotrebi. U isto vreme, proizvođači su zabrinuti zbog

dodavanja SO_2 voćnim sokovima i vinima zbog gubljenja kvaliteta. Do danas nije pronađena uspešna zamena za SO_2 , bez obzira na veliki broj radova urađenih u ovoj oblasti (*Comuzzo i Tat, 2003; Ribereau-Gayon i sar., 2006*).

Neki autori smatraju (*Danilewicz, 2007; Boulton i sar., 2001*) da je glavna antioksidativna uloga SO_2 u vinu da reaguje sa H_2O_2 , ograničavajući oksidaciju fenola.

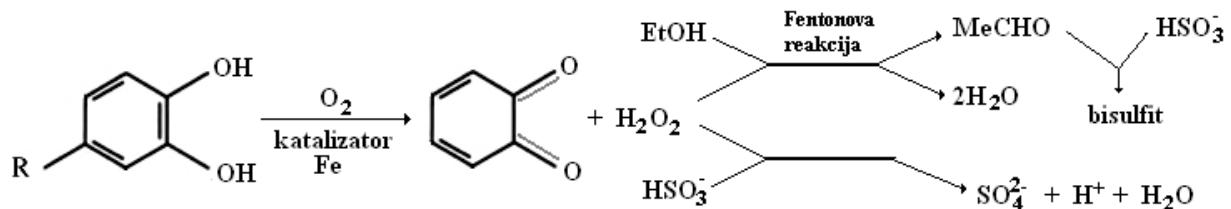
Rastvaranjem SO_2 u vodi uspostavljaju se ravnoteže:



a u prisustvu kiseonika protiče reakcija:

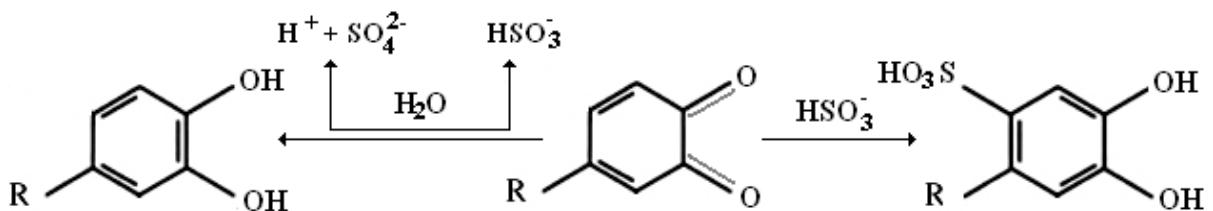


U sistemu koji sadrži fenolna jedinjenja i u prisustvu gvožđa ili bakra protiče reakcija kojom nastaju bisulfitni joni, koji mogu reagovati sa vodonik-peroksidom:



Slika 2.35. Oksidacija katehola u prisustvu SO_2 .

Međutim, isti autori navode i mogućnost proticanja reakcije između hinona i bisulfitnog jona:

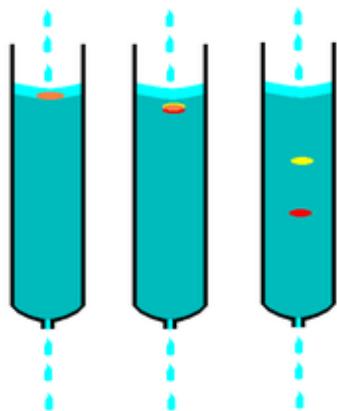


Slika 2.36. Reakcija bisulfitnog jona sa hinonima.

2.4. HROMATOGRAFIJA

Hromatografija (od grč. χρώμα: *chroma*, boja i γραφειν: *grafein* pisati) je zbirni naziv za grupu laboratorijskih tehnika za razdvajanje smeša. Ona uključuje kretanje ispitivane smeše, rastvorene u "mobilnoj fazi", kroz "stacionarnu fazu", čime se delovi smeše razdvajaju i izoluju, pa ih je moguće analizirati i kvantitativno odrediti.

Hromatografski sistem čine dve faze, pokretna i nepokretna kao i ispitivani analit. Tokom hromatografskog procesa analit se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između ovih dve faza. Zbog kretanja analita narušava se ravnotežno stanje, što uzrokuje kretanje grupe molekula u pravcu kretanja mobilne faze. Nepokretna faza mora biti odabrana tako da zadržavanje molekula na njoj bude selektivno, tj. da različiti sastojci smeše budu vremenski različito vezani za nju, što uzrokuje njeno razdvajanje (slika 2.37). Sama raspodela je posledica raznih fizičko-hemijskih procesa kao što su adsorpcija, desorpcija, apsorpcija, podela između dva rastvarača i jonska izmena.



Slika 2.37. Razdvajanje komponenata uzorka u koloni.

S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, hromatografske tehnike se mogu podeliti na:

- *podeonu hromatografiju*, kada se ravnoteža uspostavlja između dve tečne faze, što znači da je i nepokretna faza tečna ali je vezana za neki inertni čvsti nosač
- *adsorpcionu hromatografiju*, pri kojoj se ravnoteža uspostavlja između tečne ili gasovite pokretne faze i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se molekuli ispitivanog analita često vežu za površinu adsorbensa
- *afinitetnu hromatografiju*, kod koje se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne grupe s definisanim prostornim rasporedom, a vezivanje nastaje zbog

- specifičnih interakcija molekula s hemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze
- *hromatografiju sa isključenjem*, kod koje je nepokretna faza materijal s posebno definisanim dimenzijama i slabo izraženim adsorpcionim svojstvima, a razdvajanje molekula se dešava zbog razlike u molekulskoj masi i veličini (obimu).

Hromatografske tehnike se mogu podeliti i na osnovu sastava pokretne faze. Tako je kod *gasne hromatografije* pokretna faza inertni gas, kod *tečne hromatografije* to je tečnost male viskoznosti, a kod *fluidne hromatografije u superkritičnim uslovima* pokretna faza je tečnost iznad svoje kritične temperature i pritiska (Kaštelan-Macan, 2003).

Hromatografija može biti analitička i preparativna. *Preparativna hromatografija* se bavi razdvajanjem komponenata smeše radi dalje obrade, pa se može smatrati metodom prečišćavanja. U *analitičkoj hromatografiji* se obično radi sa malim uzorcima i može se odrediti relativni odnos komponenata u smeši.

2.4.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Tečna hromatografija visokih performansi (tečna hromatografija pri visokim pritiscima) ili HPLC (High performance liquid chromatography ili high pressure liquid chromatography) predstavlja vrstu hromatografije kojom se postiže izuzetno dobra rezolucija pri razdvajaju čak i veoma kompleksnih smeša (zbog toga se nekada naziva i tečnom hromatografijom visoke rezolucije). HPLC je vrsta eluacione hromatografije na koloni, koja je našla široku primenu u analitičkoj hemiji i biohemiji, i koristi se za razdvajanja, identifikaciju i kvantitativno određivanje različitih jedinjenja.

HPLC razdvajanja se zasnivaju na različitoj raspodeli supstance između dve faze: tečne (mobilne faze) koja nosi smešu analita kroz porozni materijal (stacionarnu fazu), pri čemu, usled različite vrste interakcija analita sa stacionarnom fazom, dolazi do razlike u vremenu migracije komponenti analiziranog uzorka. Ono što je razlikuje od ostalih metoda je to što je mobilna faza izložena dejству visokog pritiska. Visok pritisak omogućava kontinuirani protok mobilne faze i uspostavljanje dinamičke ravnoteže sa stacionarnom fazom. Dinamička ravnoteža je uslov dobre selektivne raspodele komponenti u ispitivanom uzorku. Dejstvo visokog pritiska dovodi i do efikasnog i brzog eluiranja komponenti smeše sa kolone.

HPLC instrument je veoma složen i skup, pri čemu je sličan aparatu za gasnu hromatografiju. Njegova prednost u odnosu na gasnu hromatografiju je u tome što se mogu analizirati i razdvajati neisparljive supstance i što se analize vrše na sobnoj temperaturi.

Osnovni delovi HPLC sistema su:

- *pumpa* (pumpe koje se koriste u HPLC sistemima mogu da stvore pritisak oko 10^6 Pa. One omogućavaju kontinualnu promenu brzine mobilne faze. Uzorak se ubacuje u injekcioni blok nakon čega dospeva u mobilnu fazu pod visokim pritiskom. Kasnije podleže razdvajanju na koloni).
- *kolona* (najvažniji deo HPLC sistema).
- *detektor* (najčešće se koriste UV/Vis detektori). UV/Vis detektori kao izvor zračenja najčešće koriste deuterijumsku lampu. Deuterijumska lampa ima veoma širok emisioni spektar zračenja (200-700 nm).

Tipičan HPLC sistem sastoji se od relativno polarne mobilne faze i nepolarne stacionarne faze. Voda (ili pufer) se koristi kao slab rastvarač i acetonitril, metanol, ili manje zastupljen tetrahidrofuran, kao jak rastvarač. Stacionarna faza (HPLC kolona) je materijal sa silika česticama. Hidrofobna površina ovih kolona tipično je napravljena kovalentnim vezama organosilana na silika površini. Ove modifikacije uključuju reakciju monofunkcionalnih alkildimetilhlorosilana sa površinskim silanolnim grupama. Oktadecilsilan je bio prva komercijalno dostupna silika vezivna faza i još uvek je jedna od najčešće korišćenih (Kirkland, 2004). Takođe, i drugi ligandi alkil tipa sa različitim brojem C atona (C1, C4, C8, C12) se često koriste, kao i faze sa fenil grupom. Većina pakovanog materijala ima relativno nisko područje pH primene (pH 2-7). Koji će tip kolone biti izabran zavisi od jedinjenja i cilja analize. Za hidrofobnija jedinjenja, treba koristiti kolone sa stacionarnom fazom koje imaju manju specifičnu površinu. Za veoma polarna jedinjenja, koja ne mogu biti zadržana na tradicionalnim C18 fazama, treba koristiti manje hidrofobne kolone kao što su C4 ili stacionarne faze sa ubačenim polarnim grupama. Međutim, sve ovo zavisi i od pH analize, sobzirom da pojedine kolone nisu stabilne na niskim pH (< 2) i visokim pH (> 7) za duže vreme.

Mobilne faze uobičajeno korišćene u HPLC su vodeno-organske smeše. Najčešće korišćeni organski modifikatori su metanol, acetonitril i/ili kombinacija ova dva modifikatora. Kombinacija organskog modifikatora u eluentu je predominantan faktor koji upravlja retencijom analita. Visoko prečišćeni rastvarači (HPLC grade) se preporučuju kako bi se minimizirala kontaminacija stacionarne faze sa nečistoćama rastvarača. Razmatranja za izbor rastvarača uključuje kompatibilnost između rastvarača, rastvorljivost analita u eluentu, polarnost, svetlosna propustljivost, viskoznost, stabilnost, pH. Rastvarači za mobilnu fazu treba da budu mešljivi i ne treba da dovode do taloženja kada se pomešaju. Svetlosna propustljivost je bitan parametar kada se koristi UV/Vis detektor. Rastvarači sa visokim vrednostima donjih granica talasnih dužina za UV propustljivost kao što su aceton (330 nm) i etil acetat (256 nm) ne mogu biti korišćeni za analizu na niskim talasnim dužinama kao što je 210 nm. Acetonitril je sobzirom na nisku vrednost donje granice talasne dužine za UV propustljivost koju ima, jedan od najčešće korišćenih rastvarača u HPLC. Kada se radi sa metanolom, izopropanolom i etanolom preporučuje se rad na preko 210 nm.

Izbor odgovarajućeg detektora zavisi od osobina analita. Postoje različiti tipovi detektora, UV-VIS, detektori na bazi merenja fluorescencije, indeksa refrakcije, plameno ionizacioni detektori (FID), maseni (MS), NMR i drugi. Pravilan izbor detekcione talasne dužine je kritičan deo razvoja metode.

Temperatura takođe utiče na određivanja kod tečne hromatografije, posebno kada je reč o rastvorima male molekulske mase. Povišena temperatura poboljšava difuznost uzorka i smanjuje viskoznost pokretne faze, pa se time poboljšavaju kinetički parametri. Međutim, maksimalno dozvoljena temperatura je niža za oko 20°C od temperature ključanja pokretne faze.

2.4.1.1. HPLC parametri

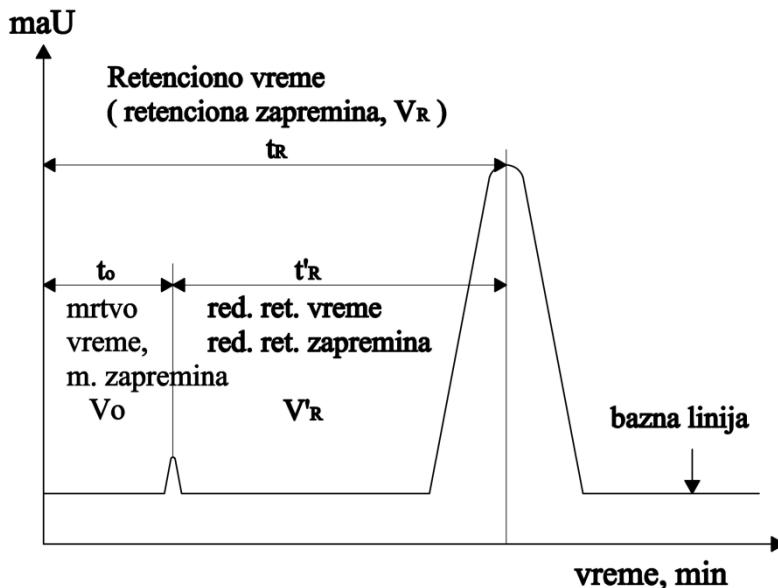
Retencionia zapremina i retenciono vreme. Odgovor HPLC sistema nakon separacije analita dobija se u formi hromatograma. U odsustvu jakih interakcija analita sa stacionarnom fazom i na relativno niskom koncentracionom nivou, pikovi su simetrični i nalikuju tipičnoj Gaus-ovojoj (normalna distribucija) krivoj. Rastojanje maksimuma pika od polazne tačke izraženo je *retencionim vremenom*, t_R (slika 2.38) i služi za identifikaciju datog analita. Retenciono vreme je verovatno najčešće korišćeni parametar za opisivanje ponašanja analita i najlakše je merljiv. Međutim, i pored toga on je i najmanje univerzalan parametar. Retenciono vreme analita zavisno je od protoka mobilne faze; veći protok, manje retenciono vreme. Proizvod retencionog vremena i protoka mobilne faze je *retencionia zapremina*, V_R , veličina koja je manje zavistna od instrumentalnih parametara (Kazakevich i Lobutto, 2007).

Mrtva zapremina. Čak i ako analit ne reaguje sa stacionarnom fazom, detektor ga neće detektovati odmah nakon injektiranja. HPLC kolona je ispunjena malim česticama poroznog materijala koji ima značajnu zapreminu tečne faze između čestica i unutar njihovog poroznog prostora, tako da analit koji ne interaguje mora proći kroz tu zapreminu pre nego što dođe do detektora. Zapremina tečne faze u koloni se zove *mrtva zapremina*, V_o . Odnos retencionog vremena (t_r), retencionie zapremine (V_R), mrtve zapremine (V_o) i mrtvog vremena (t_o), definisan je izrazima:

$$t_r = \frac{V_R}{F} \quad t_o = \frac{V_o}{F} \quad 2.57 \text{ i } 2.58$$

gde je F protok mobilne faze. Mrtvo vreme je deo ukupnog retencionog vremena koje analit stvarno provodi u mobilnoj fazi krećući se kroz kolonu, a ostatak retencionog vremena analit provodi na površini stacionarne faze.

Retencioni faktor. Retencija analita sastoji se od dva dela: 1) vremena koje komponente provedu u mobilnoj fazi krećući se kroz kolonu i 2) vremena koje komponente provedu zadržane na stacionarnoj fazi (slika 2.38).



Slika 2.38. Parametri retencije analita.

Razlika između ukupnog retencionog vremena (t_R) i mrtvog vremena (t_0) zove se redukovano retenciono vreme (t'_R), a odgovarajuća razlika između retencione zapremine (V_R) i mrtve zapremine (V_o) zove se redukovana retencionna zapremina (V'_R).

Odnos redukovane retencionne zapremine (V'_R) i mrtve zapremine (V_o) je široko korišćeni bezdimenzionalni parametar poznat kao *retencioni faktor, k*.

$$k = \frac{V'_R - V_o}{V_o} = \frac{V'_R}{V_o} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad 2.59$$

Retencioni faktor (ili faktor kapaciteta) je veoma pogodan hromatografski parametar sobzirom da je bezdimenzionalni i nezavistan od protoka mobilne faze i dimenzija kolone.

Selektivnost. Sposobnost hromatografskog sistema da odvoji različite analite zove se selektivnost (α). Selektivnost je određena odnosom retencionih faktora (k) dva analita

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad 2.60$$

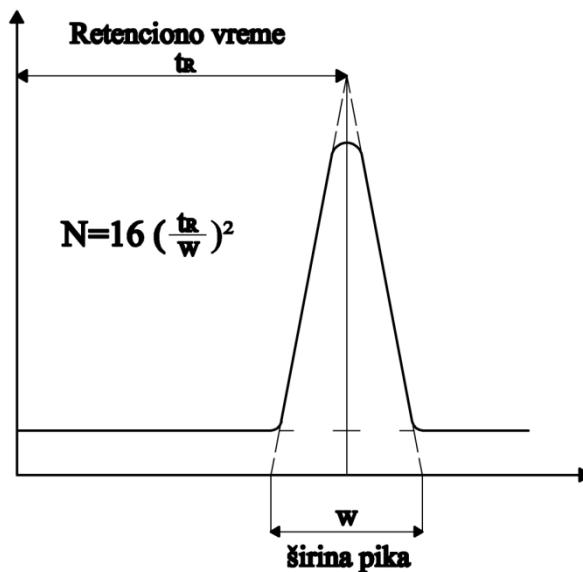
Povećanje selektivnosti u separaciji dva analita iz kompleksne smeše je primarni cilj razvoja metode, jer ukoliko je selektivnost za par analita jednak 1, sistem neće moći da odvoji ove komponente. Selektivnost je zavisna od razlike u interakciji analita sa stacionarnom fazom.

Efikasnost. Analit se injektira u kolonu u formi veoma male zone sa podjednakom distibucijom analita ututar zone. Sa kretanjem ove zone kroz kolonu, on se razdvaja. Stepen ovog razdvajanja zove se *efikasnost*. Efikasnost je mera hromatografskog razdvajanja i broja teorijskih podova u koloni i izračunava se korišćenjem jednačine:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

2.61

Gde je t_R retenciono vreme analita i w – širina pika merena u vremenskim jedinicama kao rastojanje između tački preseka tangenti prevojnih tačaka pika sa baznom linijom (slika 2.39). Teorija podova predpostavlja da je analit u trenutnoj ravnoteži sa stacionarnom fazom i smatra se da se kolona može podeliti u brojne hipotetičke (teorijske) podove. Svaki pod ima ograničenu visinu (visina efikasnog teorijskog poda, HETP) i analit provodi ograničeno vreme na ovom podu.



Slika 2.39. Određivanje efikasnosti (broja teorijskih podova u koloni).

Efikasnost je osobina kolone. Idealno, svi analiti odvojeni na istoj koloni treba da pokažu isti broj teorijskih podova. Efikasnost i selektivnost su komplementarni hromatografski parametri. Kolona sa visokom efikasnošću može proizvesti uske hromatografske zone.

Rezolucija. Rezolucija, R , je definisana kao odnos rastojanja između dva pika prema prosečnoj širini ovih pikova (na baznoj liniji), tako da ovaj parametar obuhvata i efikasnost i selektivnost:

$$R = 2 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 - w_1} \quad 2.62$$

2.4.1.2. Razvoj i validacija HPLC metode

Polazna tačka u razvoju analitičke metode je određivanje fizičko-hemijskih karakteristika aktivne supstance, kao što su njena struktura, rastvorljivost, stabilnost u različitim rastvaračima, pKa i dr. Tipični HPLC sistem sastoји se od relativno polarne mobilne faze i nepolarne stacionarne faze. Voda (ili pufer) se koristi kao slab rastvarač i acetonitril, metanol, ili manje zastupljen, tetrahidrofuran, kao jak rastvarač. Retencija i separacija rastvorka je bazirana na njegovoj podeli između dve faze. Mnogo tipova kolona je zastupljeno, uključujući klasične C8, C18, fenil, ciano faze sa različitim formama silika čestica. Koji će tip kolone biti izabran zavisi od jedinjenja i cilja analize. Za hidrofobnija jedinjenja, treba koristiti kolone sa stacionarnom fazom koje imaju manju specifičnu površinu. Za veoma polarna jedinjenja, koja ne mogu biti zadržana na tradicionalnim C18 fazama, treba koristiti manje hidrofobne kolone kao što su C4 ili stacionarne faze sa ubaćenim polarnim grupama. Međutim, sve ovo zavisi i od pH analize, s obzirom da pojedine kolone nisu stabilne na niskim Ph (<2) i visokim (>7) za duže vreme. Pre svega, uticaj pH na retenciju jedinjenja treba najpre razmotriti, pa onda istraživati retenciju i selektivnost različitih kolona (*Kazakevich i Lobutto, 2007*). vodeno-organske smeše

Mobilne faze su uobičajeno vodeno-organske smeše. Najčešće korišćeni organski modifikatori su metanol, acetonitril i/ili kombinacija ova dva modifikatora. Drugi modifikatori kao što su tetrafidrofuran, izopropil alkohol, dimetilsulfoksid koriste se za mala podešavanja u selektivnosti. Koncentracija organskog modifikatora u eluentu je predominantan faktor koji upravlja retencijom analita. Visoko prečišćeni rastvarači (HPLC grade) se preporučuju kako bi se minimizirala kontaminacija stacionarne faze sa nečistoćama rastvarača i smanjila njihova pozadinska apsorbanca ukoliko sadrže nečistoće sa UV hromoforima >190 nm.

Razmatranja za izbor rastvarača za mobilnu fazu uključuju kompatibilnost između rastvarača, rastvorljivost uzorka u eluentu, polarnost, svetlostnu propustljivost, viskoznost, stabilnost, pH. Rastvarači za mobilnu fazu treba da budu mešljivi i ne treba da dovode do taloženja kada se pomešaju.

Dva različita pristupa mogu biti razmatrana za dalju optimizaciju separacije. Jedan pristup razmatra korišćenje kombinacije organskih modifikatora, na primer smeše metanola i acetonitrila. Drugi pristup razmatra modifikovanje dodatnih varijabli, kao što je pH mobilne faze.

Pravilan izbor detekcione talasne dužine je kritičan deo razvoja metode. Kod izbora talasne dužine, sledeće faktore treba uzeti u obzir da:

- mobilna faza ne treba da pokazuje jaku pozadinsku apsorpciju na izabranoj talasnoj dužini,

-detektabilnost treba biti maksimizirana za komponente od interesa i minimizirana za interference.

Izbor odgovarajućeg detektora zavisi od osobina analita. Postoje različiti tipovi detektora, kao što su UV-Vis, detektori na bazi merenja fluorescencije, indeksa reflekcije, elektrolitičke provodljivosti, plameno ionizacioni detektori (FID), maseni (MS), NMR i drugi.

Povišenje temperature se koristi za povećanje kolonske efikasnosti, skraćivanje vremena hromatografisanja i poboljšanja separacione selektivnosti (*Hancock i sar., 1994*). Povišena temperatura takođe povećava rastvorljivost (difuznost) rastvorka.

Za procenu da li je hromatografska metoda odgovarajuća za predviđena analitička određivanja komponenti u realnim uzorcima, potrebno je definisati sledeće parametare:

- test pogodnosti sistema
- specifičnost i selektivnost
- linearost
- preciznost – ponovljivost
- limit detekcije i limit kvantifikacije
- tačnost ili recovery

Test pogodnosti sistema. Pre izvođenja bilo kog validacionog eksperimenta, treba pokazati da je HPLC sistem i procedura sposobna da obezbedi podatke zadovoljavajućeg kvaliteta. Ovi testovi se koriste zbog verifikovanja da su rezolucija i ponovljivost koju daje sistem adekvatni za analize koje se izvode. Test pogodnosti je provera sistema u cilju osiguranja performansi sistema pre ili tokom analize nepoznatog uzorka.

Specifičnost/Selektivnost. Za hromatografske metode razvoj separacije uključuje demonstriranje specifičnosti, koja predstavlja sposobnost metode za tačno merenje analitičkog signala u prisustvu svih potencijalnih komponenti uzorka. U tu svrhu se snima hromatogram test rastvora koji sadrži potencijalne komponente uzorka prisutnih u poznatim koncentracijama.

Linearost. Svrha testa linearnosti je demonstrirati da unutar analitičkog sistema postoji linearni odgovor i da je direktno proporcionalan odgovarajućim koncentracijama analita u određenom koncentracionom području. Test linearnosti treba ispitati za najmanje pet različitih koncentracija unutar područja. Prihvatljivost podataka iz testa linearnosti je često potvrđivana na osnovu podataka za rikaveri koeficijenta. Koeficijent određivanja $R^2 > 0.990$

se obično smatra kao dokaz prihvatljivog signala podataka sa regresionom linijom (*Green, 1996*).

Limit detekcije i limit kvantifikacije. Za HPLC limit detekcije i limit kvantifikacije može biti definisan u masenim ili koncentracionim jedinicama. Određivanje c_L i c_Q može biti:

- Bazirano na vizuelnoj proceni: limiti se određuju na osnovu analize uzorka sa poznatom koncentracijom analita i procenjivanjem minimalnog nivoa na kome analit može biti pouzdano detektovan, tj. kvantifikovan sa prihvatljivom tačnošću.

- Bazirano na vrednosti odnosa signala prema šumu: poredi se mereni signal koji potiče od uzorka sa poznatom niskom koncentracijom analita sa blank uzorkom i procenjuje se minimalna koncentracija na kojoj analit može biti pouzdano detektovan, tj. kvantifikovan. Kod određivanja c_L vrednost odnosa signala prema šumu je između 3 ili 2:1, dok kod određivanja c_Q je 10:1.

- Bazirano na standardnoj devijaciji signala i nagiba: c_L i c_Q se izračunavaju pomoću formula 41 i 42.

Nagib m se određuje iz kalibracione prave analita. Procena S može biti izvršena na više načina: bazirano na standardnoj devijaciji blanko probe ili bazirano na kalibracionoj pravoj (standardna devijacija y-odsečka).

Tačnost i preciznost. Test tačnosti demonstrira blizinu između nađenih vrednosti i vrednosti koje su prihvачene kao propisane tačne vrednosti ili kao prihvачene referentne vrednosti. Tačnost može biti demonstrirana i određivanjem recovery vrednosti za analit koji je dodat u realnom uzorku. Preciznost je indikator slučajnih grešaka i može biti svedena na ponovljivost. Ponovljivost predstavlja najprostiju situaciju i uključuje ponavljanje analiza od strane istog analitičara, jedno po jedno injektovanje pod istim operativnim uslovima za kratak period vremena (Milenović, 2010).

Ovi parametri se utvrđuju laboratorijskim ispitivanjem, čime se dokumentuje da je hromatografska metoda odgovarajuća za datu namenu. Zapravo to je proces koji osigurava pouzdanost metode tokom korišćenja, i prema smernicama ICH (International Conference on Harmonization) naziva se *validacija metode*.

2.5. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIJA

Ultraljubičasta/Vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija je spektroskopska metoda koja obuhvata proučavanje apsorpcije elektromagnetskog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Kako veliki broj organskih jedinjenja ne apsorbuje u ovom delu spektra, to UV/Vis spektrofotometrija, u poređenju sa drugim strukturnim metodama (IC, NMR, MS), ima daleko manju primenu za strukturalna određivanja i uglavnom se koristi kao komplementarna metoda za identifikaciju delova molekula koji apsorbuju u navedenoj oblasti, takozvanih hromofora. Međutim, ova vrsta spektrofotometrije, tj. UV/Vis spektri dobijeni na ovaj način, pružaju veoma korisne informacije o strukturi ispitivanog jedinjenja. Na primer, ona je nezamenljiva pomoćna (a često i glavna) metoda za identifikaciju prirodnih konjugovanih jedinjenja, kao što su: biljni pigmenti (karotenoidi), poliacetileni, porfirini, flavonoidi, itd.

Pored primene za identifikaciju organskih jedinjenja, UV/Vis spektrofotometrija se danas dosta primenjuje u kvantitativnoj analizi. Njene prednosti nad ostalim metodama su u izuzetno velikoj osjetljivosti i jednostavnom rukovanju instrumentom.

2.5.1. Apsorpcija UV/Vis zračenja

Većina standardnih spektrofotometara radi u delu elektromagnetskog spektra između 200 i 800 nm. Taj deo je podeljen na *blisku ultraljubičastu* (200-400 nm) i *vidljivu oblast* (400-800 nm). Na nižim talasnim dužinama (< 200 nm) nalazi se *vakuumsku ultraljubičastu oblast*, koja nije od interesa za strukturalna određivanja zbog apsorpcije kiseonika iz vazduha, tako da je neophodno da uzorak bude u evakuisanom stanju.

Energetski sadržaj zračenja u oblasti od 200 do 800 nm nalazi se između 600 i 150 kJ/mol, što je dovoljno za pobuđivanje elektrona i njihov prelazak iz osnovnih u pobuđena stanja. Zbog toga što UV/Vis zračenje apsorbuju elektroni, ova vrsta spektroskopije naziva se još i *elektronska spektroskopija*.

UV/Vis spektrofotometrija se najčešće koristi za kvalitativna i kvantitativna određivanja rastvora prelaznih metala ili konjugovanih organskih molekula. Prolaskom zračenja iz vidljivog dela spektra kroz obojeni rastvor, joni prelaznih metala apsorbuju deo svetlosti pri čemu se pobuđuju elektroni iz d-orbitale, dok se kod organskih molekula najčešće pobuđuju π -elektroni. Najčešće se snimaju spektri razblaženih rastvora, a mogu se snimati i spektri gasova ili para.

Kvantitativna spektrofotometrijska analiza zasniva se na Beer-ovom zakonu ($A = \varepsilon \cdot l \cdot c$), koji kaže da je *apsorbanca rastvora direktno proporcionalna koncentraciji apsorbujuće vrste i debljini sloja kroz koje zračenje prolazi*. Za kvantitativnu analizu je bitno da se merenja apsorbance vrše sa najvećom mogućom tačnošću i osjetljivošću. Da bi se to postiglo bitan je izbor talasne dužine na kojoj se merenje vrši. Ona mora da ispunjava nekoliko uslova:

1. da se merenjem postiže maksimalna osjetljivost
2. da mala promena talasne dužine ne utiče na reproduktivnost
3. da važi Beer-ov zakon.

Intenzitet apsorpcije zračenja definisan je Lambert-Berr-ovim zakonom:

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad 2.63$$

ε - molarna apsorptivnost

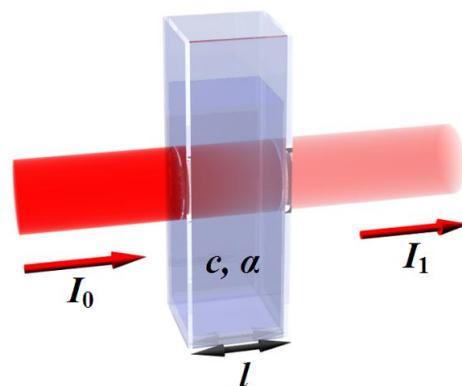
l - debljina sloja (cm)

c - koncentracija apsorbujuće supstance (mol/l)

A - apsorbanca

I_0 - intenzitet upadnog zraka

I - intenzitet zraka po prolasku kroz uzorak



Slika 2.40. Dijagram Lambert-Beerove apsorpcije svetlosti kroz kivetu.

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

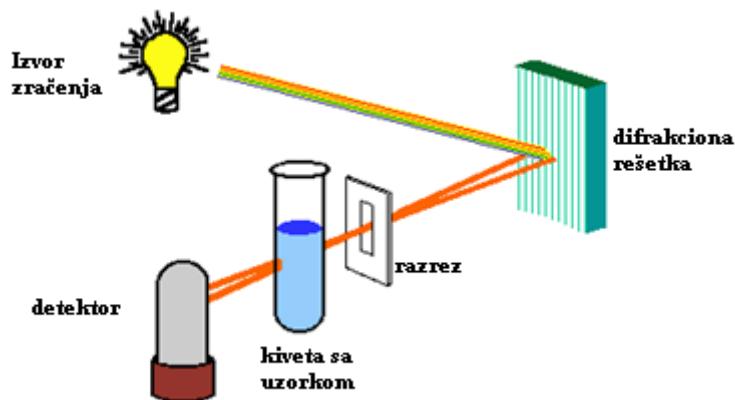
$$A = \sum A_i = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n \quad 2.64$$

Lambert-Berr-ov zakon ne važi kada:

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

2.5.2. Snimanje UV/Vis spektra

Spektrofotometar se sastoji iz svetlosnog izvora iz koga se svetlost deli na dva jednakata zraka (referentni i analitički), monohromatora, detektora i uređaja za pojačavanje, merenje i beleženje signala (pisača). Kao izvor zračenja koristi se kombinacija volframove (za vidljivu oblast, $\lambda > 375$ nm) i deuterijumske lampe za blisku ultraljubičastu oblast. Kao detektor se najčešće koristi fotomultiplikator (slika 2.41).



Slika 2.41. Šema spektrofotometra.

Koncentracija uzorka zavisi od intenziteta apsorpcije i podešava se tako da vrh apsorpcionog maksimuma bude u oblasti najveće tačnosti, što odgovara vrednostima između

0,2 i 0,7 jedinica apsorbancije. Najbolje je napraviti koncentrovani rastvor od kojeg se postupnim razblaživanjem dobija rastvor koncentracije pogodne za spektrofotometiranje. Pripremljeni rastvor se prebacuje u analitičku ćeliju (standardne debljine od 1 cm) od kvarca (sistem propustljiv za blisku UV i vidljivu oblast) ili stakla (sistem propustljiv samo za vidljivu oblast). Takođe se priprema i istovetna referentna ćelija sa čistim rastvaračem. Za vreme kontinualne promene talasne dužine porede se intenziteti referentnog (I_0) i analitičkog (I) signala. Spektar se beleži pomoću pisača, najčešće kao zavisnost apsorbance (A) od talasne dužine (λ).

Svaki apsorpcioni maksimum okarakterisan je talasnom duzinom (λ_{\max}) na kojoj se nalazi i molarnom apsorptivnošću (ϵ) na toj talasnoj dužini. Prilikom opisivanja spektra nekog jedinjenja ove vrednosti se obavezno navode za svaki maksimum. Pored toga, zbog mogućeg uticaja na izgled spektra, uvek se navodi i rastvarač.

2.5.3. Tačnost i preciznost merenja

U spektrofotometrijskoj analizi tačnost i preciznost su često ograničene slučajnom, neodređenom greškom povezanoj sa instrumentom, nazvanom šum. Odnos između šuma koji je uključen u izmerenoj vrednosti transparencije, T ($A = -\log T$) i greške određivanja koncentracije može se izračunati iz Beer-ovog zakona:

$$c = -\frac{1}{\epsilon l} \log T = \frac{-0,434}{\epsilon l} \ln T$$

Za konstantnu vrednost ϵl izraz se može napisati u obliku:

$$\partial c = \frac{-0,434}{\epsilon l T} \partial T$$

u kome se ∂c može smatrati nesigurnošću (greškom) u određivanju c , a koja je rezultat šuma, odnosno greške ∂T u merenju T . Deljenjem ove jednačine sa predhodnom dobija se izraz:

$$\frac{\partial c}{c} = \frac{0,4343}{\log T} \cdot \frac{\partial T}{T} \quad 2.65$$

u kojem je $\partial T/T$ relativna slučajna greška određivanja T . Najbolja i najprimenljivija mera slučajne greške ∂T jeste standardno odstupanje σ_T koje je za instrument lako odrediti merenjem transparencije 20 ili više puta za neki rastvor koji apsorbuje. Ako se uvrsti σ_T i σ_c u jednačinu 2.65 dobija se:

$$\frac{\sigma_c}{c} = \frac{0,4343}{\log T} \cdot \frac{\sigma_T}{T} \quad 2.66$$

gde su σ_c/c i σ_T/T relativne standardne devijacije.

Greške se mogu podeliti u tri grupe:

1. One kod kojih je veličina σ_T nezavisna od T,
2. One kod kojih je veličina σ_T srazmerna sa $\sqrt{T^2 + T}$ i
3. One kod kojih je veličina σ_T srazmerna sa T.

Koncentraciona greška za $\sigma_T=k_1$

Kod mnogih fotometra i spektrofotometra standardna devijacija merenja T je stalna i nezavisna od vrednosti T. Ova vrsta slučajne greške je vezana za sam instrument. Kod tipičnih instrumenta standardna devijacija uglavnom iznosi približno $0,003T$ ($\sigma_T=\pm 0,003T$). Na slici 2.42 vidi se da relativna standardna devijacija određivanja koncentracije postiže svoj minimum pri apsorbanciji približne vrednosti 0,5, a naglo se povećava kada apsorbancija postigne vrednosti od približno 0,1 ili veće od približno 1,5.

Koncentraciona greška za $\sigma_T=k_2\sqrt{T^2 + T}$

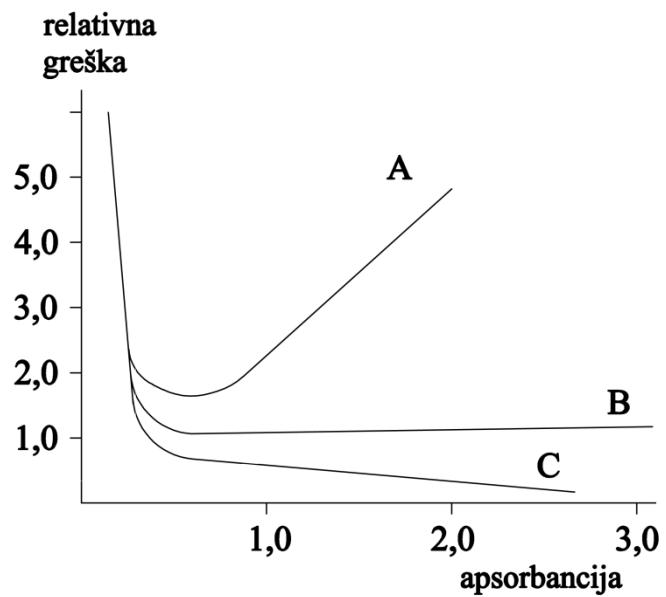
Ova vrsta slučajne greške tipična je za spektrofotometre visokog kvaliteta. Grafički prikaz relativne greške na slici 2.42 prikazan je krivom B. Spektrofotometrima ovog kvaliteta mogu se meriti i vrednost apsorbancije 2,0 i više, bez značajne greške.

Koncentraciona greška za $\sigma_T=k_3T$

Ukoliko uvrstimo izraz $\sigma_T=k_3T$ u jednačinu 2.66 videćemo da je relativna standardna devijacija obrnuto srazmerna logaritmu transparencije:

$$\frac{\sigma_c}{c} = \frac{0,4343}{\log T} \cdot k_3$$

Kriva C na slici 2.42 pokazuje da se greške javljaju samo pri malim vrednostima apsorbancije, i da se približavaju nuli pri velikim apsorbancijama (Skoog i sar., 1996).



Slika 2.42. Krive relativnih grešaka za različite kategorije instrumenentalne nesigurnosti.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. MATERIJAL

U ispitivanjima je kao materijal korišćeno:

- **Grožđe** tri stone sorte: Cardinal, Ribier i Muskat Hamburg i četiri vinske sorte: Cabernet Sauvignon, Merlot, Prokupac i Vranac. Grožđe je poreklom iz vinograda sa područja Južne Srbije.
- **Višnje** tri sorte: Marela, Oblačinska i Cigančica sa područja Niške Banje
- **Crvena ribizla** sa područja Niške Banje, Beograda i Velike Plane
- **Malina** sa područja Niške Banje, Velike Plane i Vlasine
- **Crvena i bela vina** proizvođača iz Srbije, Makedonije i Crne Gore
- **Komercijalni sokovi** (višnja, crna ribizla, crno grožđe) proizvođača iz Srbije
- **Voćna vina** (višnja, kupina, malina) domaća i proizvođača iz Srbije.

3.2. APARATI I REAGENSI

3.2.1. Aparati

Prilikom ispitivanja kinetike degradacije i sadržaja fenolnih komponenti kao i metalnih jona u voću i proizvodima od voća korišćena je sledeća oprema:

1. HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series 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 i ispitivanje kinetike fenolnih jedinjenja;



Slika 3.1. Tečni hromatograf visokih performansi (HPLC) (laboratorija Katedre za analitičku i fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu).

2. UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 sa kivetom dužine optičkog puta 1 cm za određivanje sadržaja i ispitivanje kinetike fenolnih jedinjenja;
3. ICP-OES Thermo scientific iCAP 6000 za određivanje sadržaja metalnih jona;



Slika 3.2. Optički emisioni spektrofotometar sa induktivno kuplovanom plazmom (laboratorija Katedre za analitičku i fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu).

4. MicroMed high purity water system, TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH za dobijanje demineralizovane vode,
5. Termostat Julabo MP 5A Open Bath Circulations za termostatiranje rastvora;
6. Analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S za odmeravanje čvrstih supstanci;

7. pH metar Hanna Instruments za merenje pH vrednosti rastvora;
8. Varijabilne automatske pipette Lab Mate⁺ za pipetiranje rastvora;
9. Hronometar za merenje vremena i
10. Blender za homogenizovanje voća.

3.2.2. Reagensi

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- Rastvor Folin-Ciocalteu reagensa sadrži smešu fosfovolframove ($H_3PW_{12}O_{40}$) i fosfomolibdenske kiseline ($H_3PMo_{12}O_{40}$) (komercijalni proizvod).
- Rastvor Na-karbonata (20%) pripremljen rastvaranjem 200 g anhidrovanog Na_2CO_3 u 800 ml vode. Rastvor se zagreva dok se celokupna količina soli ne rastvori. Nakon hlađenja doda se par kristalića Na_2CO_3 . Nakon inkubacije od 24 h rastvor se filtrira i dopuni dejonizvanom vodom do 1L.
- Standardni rastvor galne kiseline je pripremljen na sledeći način: 50 mg galne kiseline se rastvori u 10 ml metanola, prenese u normalni sud od 100 ml i dopuni dejonizvanom vodom do crte. Dobijena koncentracija iznosi 5 mg/ml. Da bi se dobila koncentracija od 0,05 mg/ml, 1 ml prethodno pripremljenog rastvora prenese se u normalni sud od 100 ml i dopuni dejonizvanom vodom do crte.
- Radni rastvor $NaNO_2$ (5%), pripremljen je odmeravanjem određene mase $NaNO_2$ i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.
- Radni rastvor $AlCl_3$ (2%) pripremljen je odmeravanjem određene mase $AlCl_3$ i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.
- Standardni rastvor katehina: 5 mg katehina rastvoreno je u 5 ml etanola, preneto u odmerni sud od 10 ml koji je dopunjen do crte dejonizovanom vodom. Rastvor je koncentracije 0,5 mg/ml. 1ml ovog rastvora je prenet u normalni sud od 10 ml i dopunjen vodom do crte, tako da je dobijen rastvor koncentracije 0,05 mg/ml. Iz ovog rastvora je pripremljena serija razblaženja pomoću koga je konstruisana kalibraciona kriva.
- Radni rastvor Na-hidroksida, $c=1$ mol/L, pripremljen je odmeravanjem određene mase $NaOH$ i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.

- Osnovni rastvor DPPH, $c=1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L, pripremljen je odmeravanjem 0,0394 gr DPPH i rastvaranjem u metanolu u normalnom sudu od 100 ml. Radni rastvor, $c=1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L, pravljen je pre početka rada razblaživanjem osnovnog.
- Osnovni rastvor troloksa ($c=1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L), pripremljen je odmeravanjem određene mase troloksa i rastvaranjem u metanolu.
- Rastvor kalijum-hloridnog pufera pH=1,0 pripremljen je rastvaranjem 1,86 g KCl u 980 ml dejonizovane vode podešavanjem do pH=1,0 konc. HCl i zapremine do 1L dejonizovanom vodom.
- Rastvor natrijum-acetatnog pufera pH=4,5 pripremljen je rastvaranjem 54,43 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ u 980 ml dejonizovane vode podešavanjem do pH=4,5 konc. HCl i zapremine do 1L dejonizovanom vodom.
- Radni rastvor bifulfita pripremljen je odmeravanjem 1 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ i rastvaranjem u 5 ml dejonizovane vode.
- Radni rastvor H_2O_2 pravljen je neposredno pre početka rada razblaživanjem 30% rastvora H_2O_2 .
- Radni rastvor Cu(II) ($c=1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L) pripremljen je rastvaranjem određene količine $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u dejonizovanoj vodi.
- Radni rastvor vinske kiseline (10%) pripremljen je rastvaranjem određene količine $\text{H}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ u dejonizovanoj vodi.
- Korišćeni su i sledeći sertifikovani standardi: malvidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid, kvercetin, kaemferol, catehin, epikatehin, kafena kiselina, ferulna kiselina, p-kumarna kiselina, hlorogenska kiselina.

Sve hemikalije i rastvarači koji su korišćeni bili su p.a. i HPLC čistoće nabavljeni od Merck (Darmstadt, Germany) i Sigma-Aldrich (GmbH, Sterbeim, Germany).

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. Rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom specifične provodljivosti $0,05 \mu\text{Scm}^{-1}$.

3.3. METODE

3.3.1. Priprema uzorka

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

3.3.1.1. Postupak ekstrakcije

Odmerena je masa, predhodno blenderom homogenizovanog voća (grožđa ili višnje), a zatim je dodato 20 ml 1%-tnog rastvoa HCl u metanolu. U slučaju homogenizovanog suvog voća (crvena ribizla i malina) dodato je 20 ml rastvarača za ekstrakciju (aceton:voda:HCl=80:19:1, etanol:voda:HCl=80:19:1, metanol:voda:HCl=80:19:1). Nakon 2 časa stajanja na sobnoj temperaturi,odekantovan je rastvor, a čvrsti ostatak je još dva puta ekstrahovan na već opisani način (20 ml i 10 ml 1% HCl u MeOH, ili rastvarača za ekstrakciju). Filtrat dobijen ceđenjem sakupljenih ekstrakata kroz Bihnerov levak prenet je u normalni sud od 50 ml i razblažen rastvaračem do crte. Dobijeni ekstrat je čuvan na tamnom i hladnom mestu (*Iacopini i sad., 2008; Borowska i sar., 2009; Katalinić i sar., 2010*).

3.3.1.2. Postupak mineralizacije

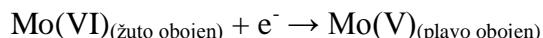
Uzorak težine 15 g , predhodno homogenizovanog voća, prebaci se u porculansku teglicu i zagreva 12 h na 50°C. Teglica se prebaci u peć za žarenje i temperatura postepeno povećava za po 50°C. Kada se dostigne temperatura od 500°C, zagrevanje se nastavlja na toj temperaturi narednih 16 h. Ohlađeni uzorak se tretira sa 1 ml konc. HNO₃ i ponovo zagreva još 10 h u peći za žarenje. Kada se uzorak prohladi rastvoriti se u 5% (v/v) HNO₃, procedi i dopuni istim rastvorom azotne kiseline do 50 ml (*AOAC, 2000*).

3.3.2. UV/Vis spektrofotometrijske metode

UV/Vis spektrofotometrija je primenjena za određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana, monomernih antocijana, procenta polimerne boje, radikal “skevindžer” kapaciteta i ukupne antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima.

3.3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola u pripremljenim uzorcima korišćena je metoda po Folin-Ciocalteu (*Singleton i Rossi, 1965*). 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 $\lambda = 760 \text{ nm}$.

Rastvori i reagensi:

1. 20% Na_2CO_3 ,
2. Folin-Ciocalteu reagens
3. Standardni rastvor galne kiseline

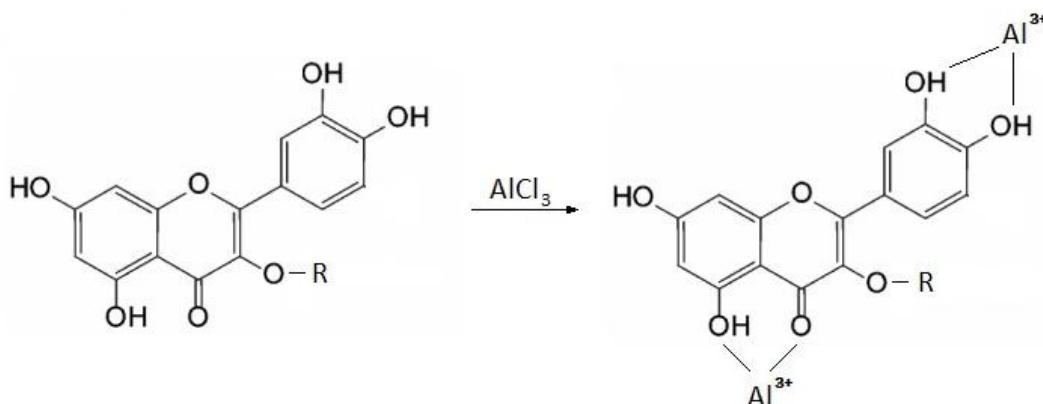
Postupak:

U odmerni sud od 10 ml unosi se određena zapremina uzorka. Nakon toga se u odmerni sud dodaje 2,5 ml dejonizovane vode, 0,25 ml rastvora Folin-Ciocalteu i 1ml rastvora natrijum karbonata (20%). Sud se dopuni do crte vodom i nakon 30min se meri apsorbanca na talasnoj dužini $\lambda = 760 \text{ nm}$, u odnosu na vodu kao slepu probu.

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g/ml}$) polifenolnih jedinjenja korišćenjem jednačine prave $A = (0,0297 \pm 0,0012) \cdot c + 0,008 \pm 0,0006$, $n=5$, $R^2 = 0,998$), a zatim sadržaj polifenolnih jedinjenja u polaznom uzorku izražen kao ekvivalent galne kiseline.

3.3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Flavonoidi i flavonglikozidi imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće metalne komplekse (*Jia i sar., 1999*). Naročito je važan kompleks sa Al^{3+} .



Slika 3.3. Kompleks Al^{3+} jona sa rutinom.

Koncentracija flavonoida određena je primenom AlCl_3 kao reagensa spektrofotometrijskom metodom.

Rastvori i reagensi:

1. 5% NaNO_2
2. 2% AlCl_3
3. 1mol/L NaOH
4. Standardni rastvor katehina (0,5 mg/L)

Postupak:

Reakcionalna smeša je pripremljena mešanjem određene zapremine uzorka, 4 ml deionizovane vode i 0,3 ml 5% NaNO_2 . Nakon 5min dodato je 1,5 ml 2% AlCl_3 , nakon 5 min još 2 ml 1mol/L NaOH i deionizovana voda do 10 ml. Apsorbanca je merena na $\lambda = 510$ nm, u odnosu na deionizovanu vodu kao slepu probu.

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora katehina određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g}/\text{ml}$) flavonoida korišćenjem jednačine prave $A = (0,0233 \pm 0,0008) \cdot c + 0,009 \pm 0,0002$), a zatim se sadržaj ukupnih flavonoida u polaznom uzorku izražava kao ekvivalent katehina.

3.3.2.3. Određivanje sadržaja antocijana (“singl” pH i pH diferencijalna metoda)

Sa vremenom, kao i pod uticajem različitih faktora (temperatura, kiseonik i dr.) dolazi do degradacije monomernih antocijana, ili se povezuju međusobno ili sa drugim prisutnim jedinjenjima, formirajući na taj način proizvode razgradnje. Iako količina monomernih antocijana opada, intenzitet boje se ne menja, jer u reakcijama kondenzacije

nastaju obojeni kondenzovani proizvodi koji su čak i stabilniji nego monomeri (slobodni) antocijani.

Zbog toga se kvantitativno određivanje ukupnih antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva na osobini antocijana, da pri promeni pH sredine, reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi do promena apsorpcionog spektra.

Sadržaj ukupnih antocijana određuje se "singl" metodom, po kojoj je izmerena apsorbancija rastvora antocija pri pH 1,0, proporcionalna sadržaju ukupnih antocijana.

Određivanje sadržaja monomernih antocijana izvodi se *pH diferencijalnom* metodom, koja se zasniva na osobini monomernih antocijana da su pri pH 1,0 u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u poluketalnom obliku (bezbojni) (*Guisti i Wrolstad, 2003*).

Reagensi:

1. 0,025 mol/L kalijum-hloridni pufer, pH = 1,0,
2. 0,4 mol/L natrijum-acetatni pufer, pH = 4,5.

Postupak:

Odmeri se određena zapremina uzorka i prenese u dva odmerna suda od 10 ml, koja su zatim dopunjena puferom pH 1,0, odnosno pH 4,5. Nakon 15 min izmeri se apsorbancija na 520 nm i 700 nm (zbog korekcije zamućenja).

Koncentracija ukupnih antocijana u uzorku (c_{uk}) izračunava se kao ekvivalent malvidin-3-glukozida (ili cijanidin-3-glukozida) prema formuli:

$$c_{uk} = \frac{A_{uk} \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \text{ mg/ml} \quad 3.2$$

gde su: $A_{uk} = (A_{500} - A_{700})_{pH=1,0}$

$M = 493,5 \text{ gmol}^{-1}$ (ili $449,2 \text{ gmol}^{-1}$) molekulska masa malvidin-3-glukozida (ili cijanidin-3-glukozida)

F – faktor razblaženja

$\epsilon = 28000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ili $26900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) molarni koeficijent apsorpcije malvidin-3-glukozida (ili cijanidin-3-glukozida)

l – 1 cm (debljina kivete)

Koncentracija nedegradiranih – monomernih antocijana (c_{mon}) u uzorku izračunata je kao ekvivalent malvidin-3-glukozida (ili cijanidin-3-glukozida) prema formuli:

$$c_{\text{mon}} = \frac{A_{\text{mon}} \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\epsilon l} \text{ mg/ml}$$

3.3

gde je: A_{mon} – apsorbanca uzorka, koja je izračunata prema formuli:

$$A_{\text{mon}} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad 3.4$$

3.3.2.4. Određivanje procenta polimerne boje

Polimerna boja u uzorcima vina određuje se primenom metode izbeljivanja bisulfitnim rastvorom kome podležu samo monomerni antocijani, koja je opisana od strane *Guisti i Wrolstad* (2003).

Reagensi:

1. 0,025 mol/L kalijum-hloridni pufer, pH = 1,0,
2. 0,4 mol/L natrijum-acetatni pufer, pH = 4,5.
3. 20% rastvor bisulfita

Postupak:

Neophodno je pripremiti dva rastvora.

Rastvor I: određena zapremina uzorka prenese se u odmerni sud od 10 ml i dopuni puferom pH 1,0 do crte. Apsorbanca ne treba da bude veća od 0,8-1,0. Nakon 15 minuta meri se apsorbanca na 420 nm, 520 nm i 700 nm.

Intenzitet boje izračunava se na osnovu podataka dobijenih za rastvor I:

$$\text{Intenzitet boje} = (A_{420} - A_{700}) + (A_{520} - A_{700}) \quad 3.5$$

Rastvor II: Od rastvora I pipetom se odmeri 4,665 ml u drugi odmerni sud i dopuni sa 0,335 ml rastvora bisulfita. Nakon 15 minuta meri se apsorbanca na 420 nm, 520 nm i 700 nm.

Polimerna boja izračunava se na osnovu podataka dobijenih za rastvor II:

$$\text{Polimerna boja} = (A_{420} - A_{700}) + (A_{520} - A_{700}) \quad 3.6$$

Procenat polimerne boje dobija se deljenjem jednačine (83) sa jednačinom (84) i množenjem sa 100:

$$\text{Procenat polimerne boje (\%)} = (\text{polimerna boja} / \text{intenzitet boje}) \cdot 100 \quad 3.7$$

3.3.2.5. Određivanje radikal „skevindžer“ kapaciteta, ukupne antioksidativne aktivnosti i antioksidativnog potencijala

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih uzoraka određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališe DPPH· radikale (DPPH test) (*Brand-Williams i sar., 1995*). Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azot- centriranog DPPH· radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) u redukovanoj žuto obojenu formu DPPH-H (*Hayder i sar., 2004*).

Postupak: Potrebno je pripremiti sledeće rastvore:

1. Radni rastvor koji sadrži:

- 2,5 ml rastvora DPPH·
- određena zapremina uzorka
- dopuni se MeOH do 5ml

2. Kontrolni rastvor (rastvor slepe probe) koji sadrži

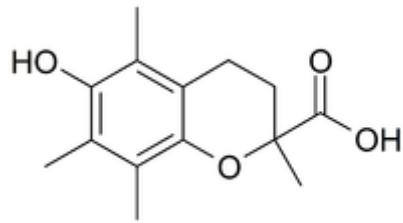
- 2,5 ml rastvora DPPH·
- 2,5 ml MeOH

Apsorbance dobijenih rastvora određene su spektrofotometrijski na 515 nm nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi, uz MeOH kao referentni rastvor. Sve probe su rađene u tri ponavljanja.

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (Radical Scavenging Capacity-RSC) računat je na osnovu sledeće jednačine:

$$\%RSC = \left(1 - \frac{A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{slepe probe}}} \right) \cdot 100 \quad 3.8$$

Na osnovu izmerenih razlika apsorbanci $\Delta A = A_{\text{slepe probe}} - A_{\text{uzorka}}$, sa kalibracione krive standardnog rastvora troloksa određena je *ukupna antioksidativna aktivnost* u $\mu\text{mol}/\text{ml}$ korišćenjem jednačine prave ($TAA = 0,1693 \cdot \Delta A - 0,0005$), a zatim je ukupna antioksidativna aktivnost u polaznom uzorku izražena kao ekvivalent troloksa. Troloks, komercijalni sintetički antioksisans, formule:



Slika 3.4. Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina).

je u vodi rastvoran derivat vitamina E.

Antioksidativni potencijal (AP) se izračunava iz odnosa:

$$AP = \frac{TAA(\text{mmol troloksa})}{TP (\text{mg galne kiseline})} \cdot 1000 \quad 3.9$$

gde je: TAA – ukupna antioksidativna aktivnost

TP - ukupni fenoli

3.3.3. HPLC metoda

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. Hromatografsko razdvajanje izvršeno je na Eclipse XDB-C18 koloni (4,6mm x 150 mm) uz sistem rastvarača: A – (H₂O+5% HCOOH) i B - (80% ACN+5% HCOOH+H₂O). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearog gradijenta: 0-28 min, 0.0%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 autosamplera-a. Kolona je termostatirana na temperaturi od 30°C.

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: malvidin-3-glukozida, cijanidin-3-glukozida, halogenske kiseline, p-kumarne, kafene i ferulne kiseline, catehina, epicatehina, kvercetina i kamferola. 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

konzentracije 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.

3.3.4. ICP-OES metoda

ICP-OES metoda je korišćena za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka grožđa i višanja na sadržaj metalnih jona.

Rastvori i reagensi:

1. Multi standard – Ultra scientific analytical solution USA
2. HCl (1:1)
3. 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 – 30s
- 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 ovakovom realnom uzorku.

3.3.5. Metode za određivanje brzine reakcije

Da bi se proučila kinetika reakcija degradacije fenolnih komponenti u ispitivanim uzorcima primenjene su spektrofotometrijska i HPLC metoda.

3.3.5.1. Kinetičko-spektrofotometrijska metoda

Eksperimentalni postupak za primenu ove metode obuhvata sledeće: selektovane zapremine svih reaktanata (H_2O_2 , Cu(II), uzorak, vinska kiselina) i vode do ukupno sračunate krajnje zapremine probe su odmeravane pipetiranjem u odvojene delove četvorokrake posude. Posuda je termostatirana 5 min na odgovarajućoj temperaturi. Trenutak mešanja rastvora označen kao početak reakcije, evidentiran je hronometrom. Rastvor je zatim prenet u mernu kivetu spektrofotometra. Očitavanje apsorbance je vršeno na odabranim talasnim dužinama na svakih 2,5 ili 5 min u trajanju od 40 ili 60 min, zavisno od sistema. Grafik $A = f(t)$ predstavlja kinetičku krivu. Na taj način je, umesto veličine dc/dt određena njoj proporcionalna veličina dA/dt koja je proporcionalna brzini reakcije prema jednačini:

$$\frac{dA}{dt} = \epsilon \cdot l \frac{dc}{dt} = \text{tg}\alpha \quad 3.10$$

gde je: dc – promena koncentracije indikatorske supstance

ϵ – molarni koeficijent apsorpcije

l – debljina apsorpcionog sloja i

$\text{tg}\alpha$ – tangens ugla nagiba linearne dela kinetičke krive prema apscisnoj osi

u koordinatnom sistemu $A = f(t)$.

Za obradu kinetičkih parametara primenjena je diferencijalna varijanta tangensne metode na osnovu linearne zavisnosti apsorbance rastvora od vremena odigravanja reakcije.

3.3.5.2. HPLC metoda

Ekperimentalni postupak pri primeni ove metode obuhvata sledeće: selektovane zapremine svih reaktanata (H_2O_2 , Cu(II), uzorak, vinska kiselina) i vode do ukupno sračunate krajnje zapremine probe su odmeravane pipetiranjem u odvojene delove četvorokrake posude. Posuda je termostatirana 5 min na odgovarajućoj temperaturi. Trenutak mešanja rastvora označen kao početak reakcije evidentiran je hronometrom. Injektovano je 5 μl rastvora, a reakciona smeša vraćena u thermostat. Kolona je zagrejana na istoj temperaturi kao I pripremljeni uzorak za analizu. Očitavanje površine pika odgovarajuće komponente je vršeno na talasnim dužinama od 520nm za antocijane i 275nm/322nm, $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ za flavan-3-ole svakih 35 min, nakon svakog injektiranja u trajanju 180 min. Grafik $c = f(t)$ predstavljao je kinetičku krivu. Na osnovu grafičke zavisnosti je određena veličina dc/dt .

3.3.6. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti su izvršeni u najmanje tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost. Određena je standardna devijacija. Za pojedine parametre je urađena analiza varijanse (ANOVA), Duncan-ov test višestrukih intervala, kao i koeficijent korelacije između parametara (Prilog).

4. REZULTATI

4.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLA, METALA I ANTOOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Radi boljeg razumevanja i postavljanja mogućeg mehanizma procesa degradacije antocijana i flavan-3-ola u crvenim vinima, polifenola u belim vinima i antocijana u ceđenim sokovima višnje, crvene ribizle i maline, neophodno je dobro poznavati sastav sistema u kome se ovi procesi proučavaju. Kako sastav vina i sokova pre svega zavisi od sastava grožđa, odnosno voća to je bilo neophodno odrediti:

1. sadržaj polifenola, metalnih jona i antioksidativnu aktivnost grožđa,
2. sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost crvenih vina,
3. sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost belih vina,
4. sadržaj polifenola, metalnih jona i antioksidativnu aktivnost višnje,
5. sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost komercijalnih sokova,
6. sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost voćnih vina,
7. sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost crvene ribizle i
8. sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost maline.

4.1.1. Određivanje sadržaja polifenola, metala i antioksidativne aktivnosti grožđa

Heminski sastav grožđa je vrlo složen i zavisi od sorte, ekoloških uslova, stepena zrelosti, primjenjenoj tehnici merenja, kao i brojnih drugih faktora. Čak postoje razlike i u hemijskom sastavu bobica jednog grozda. Tokom alkoholne fermentacije deo sastojaka grožđa se transformiše u nove sastojke koji ulaze u sastav vina, dok deo sastojaka neizmenjen prelazi u vino. To je razlog potrebe za posebnim proučavanjem hemijskog sastava grožđa i hemijskog sastava vina. Za analizu ekstrakata grožđa na sastav i sadržaj polifenolnih jedinjenja i njihove antioksidativne aktivnosti, primenjene su spektrofotometrijska i HPLC metoda, dok je za određivanje sadržaja metalnih jona primenjena ICP-OES metoda.

4.1.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti grožđa

Izolovanje polifenolnih jedinjenja iz voća postiže se ekstrakcijom. Najčešće se koriste dve tehnike: ekstrakcija rastvaračima i ekstrakcija na čvrstoj fazi (solid-phase extraction). Količina polifenola u ekstraktu, kao i sastav ekstrakta u velikoj meri zavisi od načina ekstrakcije, kao i tipa i polarnosti rastvarača. Prirodni antioksidanti iz voća se najčešće ekstrahuju metanolom. Antocijani se najčešće ekstrahuju na hladno, metanolom ili amil-alkoholom koji sadrži malu količinu kiselne. Takođe, pokazalo se da je metanol efikasan ekstragens i za katechine.

U ovom radu izbor rastvarača za ekstrakciju fenola iz grožđa, metanola (sa 0,1% HCl) je prvenstveno izvršen na osnovu predpostavljene efikasnosti.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana u metanolnim ekstraktima tri stone i četiri vinske sorte grožđa, pripremljenim kao što je opisano u deluu 3.3.1.1, prikazani su u tabeli 4.1. Dobijeni rezultati preračunati su na masu polaznog uzorka.

Primenjena je Folin-Ciocalteou metoda za određivanje sadržaja *ukupnih fenola*. Nedostatak metode je njena nedovoljna specifičnost, jer se fenoli detektuju sa različitom osetljivošću. Ipak, u radu je korišćena ova metoda, s obzirom da je reč o standardnoj metodi za određivanje sadržaja ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima grožđa. Rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE).

Korišćenjem Duncan-ovog testa višestrukih intervala (tabela 4.1) jasno se uočavaju razlike u sadržaju ukupnih fenola u uzorcima grožđa. Crvene sorte grožđa kao što su Vranac, Merlot i Cabernet Sauvignon sadrže više fenola od ružičastih sorta grožđa kao što je Cardinal. Poznato je da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiče genotip, mesto i tehnika gajenja, kao i razlike u zrelosti voća. Takođe spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature, prisustva hranljivih materija u zemljištu mogu uticati na sastav polifenolnih jedinjenja.

Sadržaj ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima grožđa kreće se od 142,32 mg GAE/100g svežeg grožđa (sv.g.) u stonoj vrsti grožđa Cardinal do 173,60 mg GAE/100 g sv.g. u vinskoj sorti grožđa Cabernet Sauvignon.

Dobijene vrednosti sadržaja ukupnih fenola su uporedive sa literurnim podacima, što se može zaključiti iz podataka prikazanih u tabeli 4.2.

Tabela 4.1. Sadržaj ukupnih fenola (TP), flavonoida (TF) i antocijana (TA) stonih (Cardinal, Muscat Hamburg, Ribier) i vinskih (Prokupac, Vranac, Merlot, Cabernet Sauvignon) sorti grožđa.

Sorta grožđa	TP ¹ (mg GAE/100g)	TF ² (mg CE/100g)	TA ³ (mg M3GE/100g)
Cardinal	142,32±1,55 ⁴ a ⁵	59,46±0,81 a	44,80±1,93 a
Muscat Hamburg	157,46±4,32 bc	101,52±1,42 b	85,13±1,70 b
Ribier	157,30±5,32 bc	95,52±1,24 b	79,10±1,64 c
Prokupac	156,28±4,93 b	105,80±1,68 b	88,80±4,58 bc
Vranac	158,56±1,94 bc	122,14±1,34 c	106,97±1,20 e
Merlot	169,20±2,69 cd	134,80±1,17 d	110,13±1,64 e
Cabernet Sauvignon	173,60±1,91 d	146,20±1,42 e	120,27±2,00 f

¹ mg ekvivalenta galne kiseline/100g svežeg grožđa; ² mg katehin ekvivalenta/100 g svežeg grožđa; ³ mg malvidin-3-glikozid ekvivalenta/100 g svežeg grožđa; ⁴ srednja vrednost ± SD (n=3); ⁵brojevi označeni različitim slovima u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

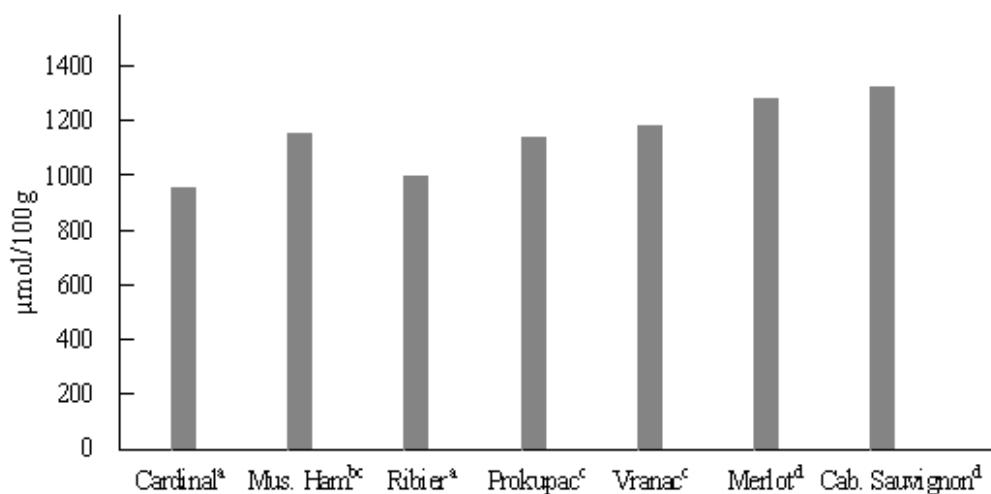
Tabela 4.2. Literaturni podaci za količine ukupnih fenola u grožđu (mg GAE/100g svežeg grožđa).

Zemlja	Sadržaj ukupnih fenola	Referenca
Srbija	142,3-173,6(n= 7)	Naši rezultati
Hrvatska	73,1-348,6(n= 7)	Milis i sar., 2010
Španija	176, 210 (n= 2)	Perez-Magarino, Gonzales-San Jose, 2006
Španija	130-360 (n = 2)	Cantos, Espin, Tomas-Barberon, 2002
United States	201,1-426,6(n= 14)	Yang, Martinson, Lui, 2009
Andalusia	119,1-336,1(n = 5)	Guerrero i sar., 2009a
Kina	63-182 (n = 3)	Hogan i sar., 2009
Kina	250, 480 (n= 2)	Yi et i sar., 2009
Georgia	140-310 (n =10)	Postrana-Bonilla i sar., 2003

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja *ukupnih flavonoida* u metanolnim ekstraktima grožđa, prikazani su takođe u tabeli 4.1. Sadžaj flavonoida kreće se od 47,78 do 84,21% od ukupnog sadržaja fenola. Ukoliko se sadžaj ukupnih flavonoida razmatra na nivou uzoraka grožđa, svojim najvećim sadržajem se ističe Cabernet Sauvignon i

Merlot, dok značajne razlike između Muscat Hamburga, Ribiera i Prokupca nisu uočene. Takođe, Cardinal je pokazao najmanji sadržaj ukupnih flavonoida u odnosu na sve ostale vrste grožđa. Imajući u vidu veliku raznovrsnost jedinjenja koja spadaju u klasu flavonoida, ova metoda, kao i u slučaju određivanje ukupnih fenola pokazuje nejednaku selektivnost prema jedinjenjima ove klase, te kao takva nije dovoljno specifična. U novije vreme, sve više se insistira na primeni hromatografskih metoda.

Najčešće korišćena metoda za određivanje *ukupnih antocijana* u grožđu je pH „singl“ metoda. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih antocijana u ekstraktima grožđa (tabela 4.1) pokazuju da je veći sadržaj antocijana kod ekstrakata vinskih sorti grožđa Cabernet Sauvignon, Merlot ili Vranac (od 106,97 do 120,27 mg/L) u odnosu na stone vrste grožđa (od 44,80 do 85,13 mg/L). Rezultati ispitivanja sadržaja ukupnih antocijana u grožđu iz Srbije uglavnom su slični sa podacima koji se mogu naći u referentnoj literaturi (*Kallithraka i sar., 2009a; Kallithraka i sar. 2007*). Pomenuti autori su dobili vrednosti sadržaja ukupnih antocijana za Cabernet Sauvignon (sa područja Makedonije i Grčke) od 44,85 do 253,97 mg/100g svežeg voća (sv.v.), dok su za Merlot dobili vrednost od 73,35 do 219,80 mg/100 g sv.v. *Katalinić i sar. (2010)* su dobili manji sadržaj (73,9 mg/100 g sv.v.) za Vranac u odnosu na naš rezultat (106,97 mg/100 g sv.v.).

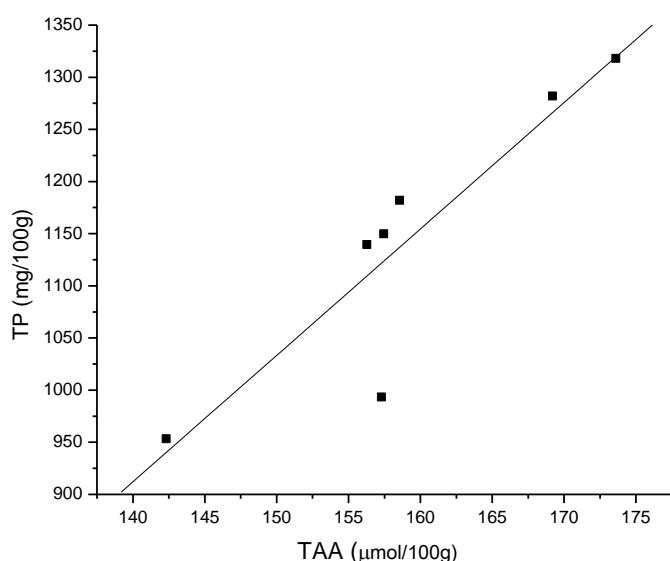


Slika 4.1. Antioksidativna aktivnost ispitivanih vrsta grožđa. Sorte grožđa označene različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

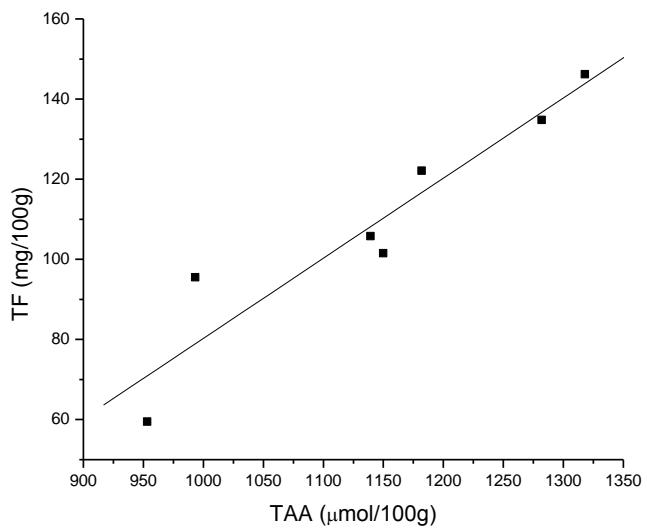
Metoda na DPPH radikale se široko primenjuje pri određivanju „skevindžer“ kapaciteta. Antioksidansi reaguju sa stabilnim DPPH radikalima i transformišu ih. Nivo dekolorizacije rastvora DPPH radikala ukazuje na „skevendžer“ potencijal antioksidativnih jedinjenja. Upravo ova metoda je primenjena za određivanje *antioksidativne aktivnosti* ekstrakata ispitivanih vrsta grožđa. Kao referentni antioksidans u ovom testu korišćen je metanolni rastvor troloksa. Dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 4.1. Najveću antioksidativnu vrednost pokazuje Cabernet Sauvignon, sledi Merlot, Vranac, Muskat

Hamburg, Prokupac i na kraju Cardinal. Vrste koje pokazuju znatnu antioksidativnu aktivnost imaju i veliki sadržaj ukupnih fenola.

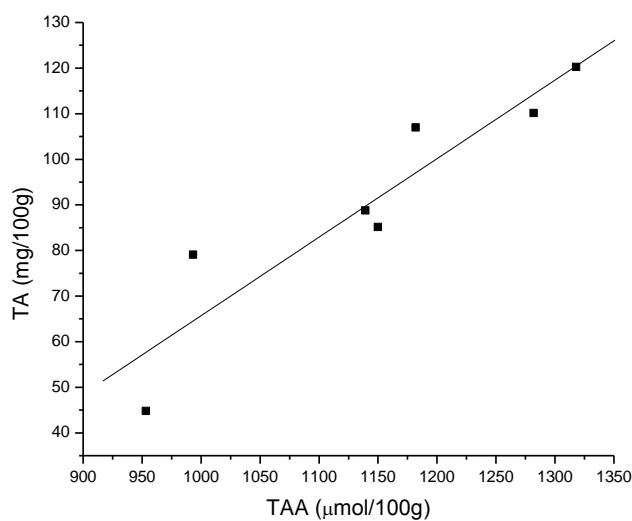
U mnogim istraživanjima (*Kedge i sar., 2007*) je dokazan visok stepen pozitivne *korelaciјe* sadržaja fenolnih jedinjenja grožđa i njihove antioksidativne aktivnosti. Da bi se utvrdila veza između antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata grožđa i sadržaja fenolnih jedinjenja, urađena je koreaciona analiza. Uticaj sadržaja fenolnih jedinjenja na antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata grožđa na DPPH[·] radikale, iskazan je pozitivnom i visokom korelacijom ($R^2=0,902$) (slika 4.2). Takođe, visoka korelacija postoji između ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti ($R^2=0,945$) (slika 4.3) i između ukupnih antocijana i antioksidativne aktivnosti ($R^2=0,926$) (slika 4.4).



Slika 4.2. Grafik korelaciјe sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata ispitivanih sorti grožđa.



Slika 4.3. Grafik korelacije sadržaja ukupnih flavonoida i ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata ispitivanih sorti grožđa.



Slika 4.4. Grafik korelacije sadržaja ukupnih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata ispitivanih sorti grožđa.

4.1.1.2. HPLC određivanje antocijana, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina u grožđu

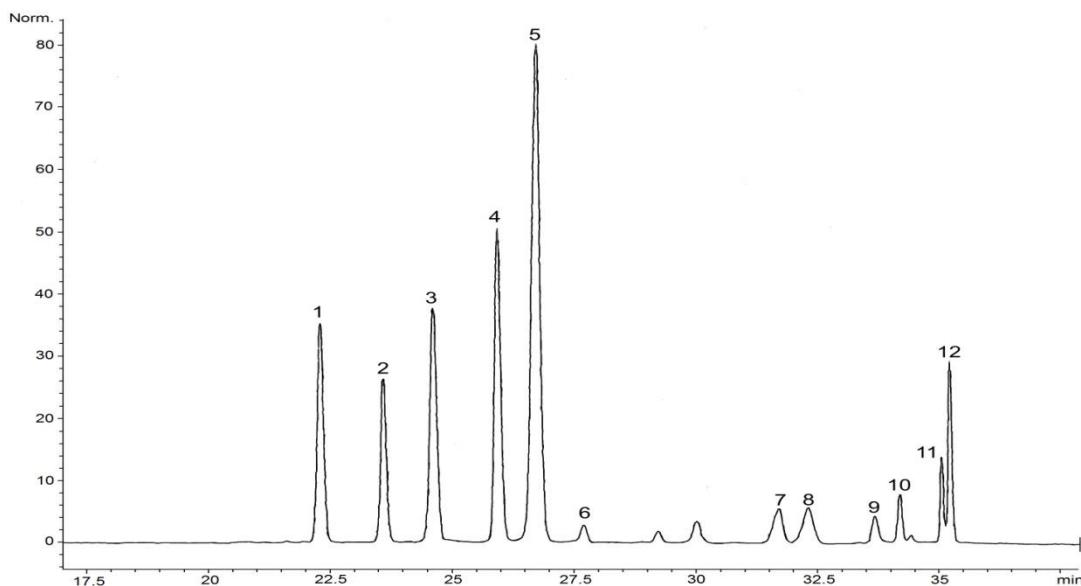
Objavljen je veliki broj HPLC metoda za određivanje polifenolnih jedinjenja u voćnim materijalima. U osnovi, one su prilagođene za određivanje sadržaja najzastupljenijih polifenola u jednoj biljnoj vrsti ili određenog broja jedinjenja u različitim matriksima.

Kvantitativno određivanje polifenolnih jedinjenja samo po sebi predstavlja analitički izazov s obzirom da je procenjeno da postoji preko milion ovih jedinjenja, koja se u voću nalaze u obliku glikozida, sa velikom raznovrsnošću u boji, vrsti i načinu vezivanja šećernih ostataka.

Polifenoli apsorbuju u vidljivom i ultraljubičastom delu spektra, pa se i detekcija ovih jedinjenja u analizi HPLC-om temelji na merenju apsorbancije ultraljubičastog i vidljivog zračenja, pomoću UV/VIS detektora. Dokazivanje ovih grupa jedinjenja nije moguće pri samo jednoj talasnoj dužini, jer svaka grupa jedinjenja ima apsorpcione maksimume pri različitim talasnim dužinama (Prilog, slika 9.15). Antocijani imaju tipičnu apsorpcionu traku na $\lambda=520$ nm, flavanoli na 360 nm, hidroksicimetne kiseline na 320 nm a flavan-3-oli na 280 nm. U cilju identifikacije i kvantifikacije pojedinih grupa jedinjenja, snimaju se hromatogrami na odgovarajućim talasnim dužinama.

Na slici 4.5 je dat hromatogram za crveno grožđe Vranac, a u tabeli 4.3 prikazani su rezultati određivanja pojedinih antocijana HPLC metodom u metanolnim ekstraktima odabranih stonih i vinskih sorti grožđa.

Identifikacija *monomernih antocijana* u ekstraktima grožđa vršena je na osnovu poređenja retencionih vremena i spektara, na 520 nm sa odgovarajućim vrednostima dobijenim za standarde (Prilog, slike 9.1 – 9.4).



Slika 4.5. HPLC hromatogram antocijana (520 nm) u ekstraktu grožđa Vranac: delfinidin-3-glukozid (1); cijanidin-3-glukozid (2); petunidin-3-glukozid (3); peonidin-3-glukozid (4); malvidin-3-glukozid (5); delfinidin-3-acetil-glukozid (6); delfinidin-3-p-kumaroil-glukozid (7); malvidin-3-acetil-glukozid (8); cijanidin-3-p-kumaroil-glukozid (9); petunidin-3-p-kumaroil-glukozid (10); peonidin-3-p-kumaroil-glukozid (11); malvidin-3-p-kumaroil-glukozid (12).

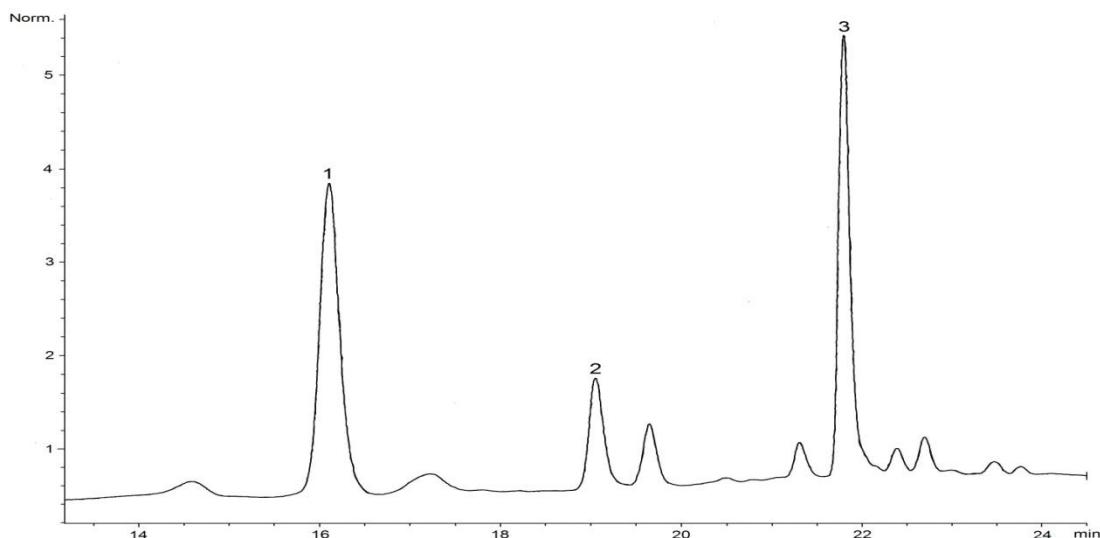
Iz tabele 4.3. se može uočiti da je u vinskim sortama grožđa kao i u stonoj vrsti Ribier najzastupljeniji malvidin-3-glukozid. Ovaj podatak je u skladu sa rezultatima drugih autora (*Guerrero i sar.*, 2009; *Ruberto i sar.*, 2007). Kod Cardinala najzastupljeniji antocijanin je peonidin-3-glukozid, što se i očekivalo s obzirom da Cardinal spada u rose sorte grožđa. Međutim, Muskat Hamburg sadrži uporedive količine malvidin-3-glukozida i peonidin-3-glukozida, što je suprotno rezultatima nekih autora koji su dobili da je najzastupljeniji peonidin-3-glukozid. *Cantos i sar.* (2002), ispitujući fenolni sastav sedam sorti stonih vrsta grožđa pokazalo se da je u stonim sortama grožđa najzastupljeniji antocijan peonidin-3-glukozid, suprotno vinskim sortama grožđa gde je najzastupljeniji malvidin-3-glukozid.

Tabela 4.3. Sadržaj antocijana (mg/100 g svežeg grožđa),^{1,2} u stonim (Cardinal, Muscat Hamburg, Ribier) i vinskim (Prokupac, Vranac, Merlot, Cabernet Sauvignon) sortama grožđa.

		Cardinal	Mus.Ham	Ribier	Prokupac	Vranac	Merlot	C.Sauv.
1	Dp-3-glukozid	0,53±	4,11±	1,84±	2,47±	10,19±	5,36±	8,29±
		0,08	0,35	0,09	0,18	0,72	0,12	0,09
2	Cy-3-glukozid	1,19±	3,54±	0,72±	1,25±	6,70±	1,62±	0,40±
		0,10	0,28	0,06	0,09	0,25	0,06	0,01
3	Pt-3-glukozid	0,74±	4,23±	2,46±	2,93±	11,71±	5,97±	4,54±
		0,09	0,18	0,09	0,11	0,38	0,18	0,08
4	Pn-3-glukozid	14,57±	15,72±	5,19±	7,92±	14,33±	9,35±	7,04±
		0,82	0,83	0,13	0,29	0,85	0,27	0,11
5	Mv-3-glukozid	11,17±	22,23±	17,67±	27,64±	29,14±	43,97±	54,47±
		0,94	0,92	0,52	0,98	0,92	1,18	1,17
6	Dp-3-acetil-glukozid	nd	nd	nd	nd	0,71±	0,89±	0,92±
						0,06	0,05	0,05
7	Dp-p-kumaroil-glukozid	nd	nd	nd	1,74±	2,37±	1,10±	0,95±
					0,07	0,07	0,08	0,09
8	Mv-3-acetil-glukozid	nd	nd	0,98±	3,77±	2,74±	3,02±	3,52±
				0,07	0,05	0,07	0,05	0,09
9	Cy-3-p-kumaroil-glukozid	nd	nd	1,19±	nd	1,30±	0,40±	0,80±
				0,09		0,02	0,01	0,04
10	Pt-3-p-kumaroil-glukozid	nd	nd	nd	0,83±	1,57±	2,30±	2,85±
					0,06	0,03	0,06	0,10
11	Pn-3-p-kumaroil-glukozid	2,66±	1,59±	3,11±	2,86±	2,29±	2,78±	2,92±
		0,32	0,06	0,22	0,10	0,07	0,07	0,08
12	Mv-3-p-kumaroil-glukozid	1,64±	1,08±	11,51±	7,27±	5,17±	12,94±	9,90±
		0,12	0,05	0,63	0,08	0,09	0,32	0,42
Ukupno		32,50	52,50	44,67	58,68	88,22	89,70	96,60

¹ mg malvidin-3-glukozid ekvivalenta /100 g svežeg grožđa; ²srednja vrednost ± SD (n=3).

Flavan-3-oli pokazuju apsorbanciju pri $\lambda=280$ nm, na talasnoj dužini pri kojoj apsorbuju i ostala fenolna jedinjenja. Međutim, ova jedinjenja, za razliku od ostalih fenolnih jedinjenja pokazuju fluorescentne osobine. Iz tog razloga fluorescentni detektor je korišćen za selektivno određivanje koncentracije katehina, epikatehina i dimera, procijanidina, B2. Na slici 4.6 dat je hromatogram na kome su prikazani rezultati kvalitativnog i kvantitativnog određivanja flavan-3-ola u metanolnim ekstraktima grožđa.



Slika 4.6. HPLC hromatogram ($275\text{nm}/322\text{nm}$, $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$) flavan-3-ola u ekstraktu grožđa
Prokupac: katehin (1); dimer procijanidina B2 (2); epikatehin (3).

Količine katehina, epikatehina i procijanidina B2 u 7 različitim crvenih sorti grožđa prikazano je u tabeli 4.4. Katehin je prisutan u većoj količini od epikatehina. Vranac, Merlot i Cabernet Sauvignon su sorte grožđa sa najvećim sadržajem katehina (3,09; 3,62 i 4,08 mg/kg sv.v.). Dobijene vrednosti su uporedive sa literaturnim podacima. *Katalinić i sar.* (2010) su dobili vrednosti za sadržaj katehina za Vranac i Merlot 2,05 i 3,12 mg/kg sv.v., i suprotno našim rezultatima nisu identifikovali epikatehin.

U pogledu sadržaja ukupnih flavan-3-ola, najveći sadržaj je zabeležen u sortama Vranac, Merlot i Cabernet Sauvignon. Ovaj podatak je potvrđen i u radu *Iacopini i sar.* (2008). S obzirom na činjenicu da je sadržaj ovih jedinjenja znatno veći u semenima nego u pokožici grožđa, to njihov sadržaj u zrnu grožđa zavisi pre svega od dva faktora: koncentracije ovih jedinjenja u semenima grožđa i odnosa ukupne težine semena i zrna grožđa (*Guerrero i sar.*, 2009). Odnos težine semena i težine zrna za Cabernet Sauvignon je takav da obezbeđuje ovoj sorti grožđa visok sadržaj flavan-3-ola.

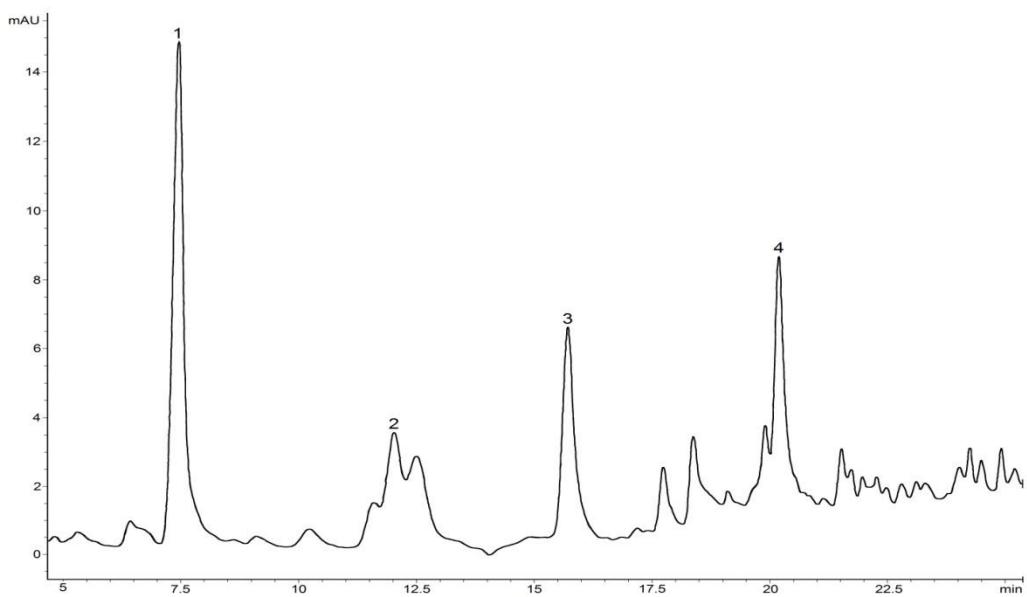
Table 4.4. Sadržaj flavan-3-ola (mg/100 g svežeg grožđa)¹ u stonim (Cardinal, Muscat Hamburg, Ribier) i vinskim (Prpkupac, Vranac, Merlot, Cabernet Sauvignon) sortama grožđa.

Sorta grožđa	katehin	B2 ²	epikatehin	Ukupno
Cardinal	0,63±0,05	0,22±0,04	0,32±0,03	1,17
Muscat Hamburg	1,39±0,08	0,25±0,03	0,72±0,07	2,36
Ribier	0,46±0,06	0,27±0,05	0,38±0,04	1,11
Prokupac	1,17±0,06	0,30±0,05	0,92±0,05	2,39
Vranac	3,09±0,12	0,36±0,04	2,16±0,10	5,61
Merlot	3,62±0,10	0,26±0,02	1,69±0,09	5,57
C. Sauvignon	4,08±0,11	0,21±0,03	2,03±0,08	6,32

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg katehin ekvivalenta/100 g svežeg grožđa.

Od ispitivanih vinskih sorti grožđa, Prokupac je pokazao najmanji sadržaj flavan-3-ola. Do sličnog podatka su došli *Gođevac i sar. (2010)*, koji su ispitivanjem ekstrakata semenki pet crvenih sorti grožđa gajenih u Srbiji utvrdili da najmanji sadržaj katehina i epikatehina imaju semenke Prokupca (26,14 i 23,49 mg/100g suvih semenki), a najveći Game Noir-a (145,04 i 91,67 mg/100 g).

Primenom HPLC metode određene su i hidroksicimetne kiseline. Hidroksicimetne kiseline imaju apsorpcionu traku na 320 nm. Na slici 4.7. je dat hromatogram ekstrakta Vranca. Hidroksicimetne kiseline, prisutne u uzorcima grožđa, su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrima na hromatogramu kafene, p-kumarne i ferulne kiseline. Rezultati određivanja hidroksicimetnih kiselina HPLC metodom u ispitivanim vrstama grožđa prikazani su u tabeli 4.5. Iz tabele 4.5 se vidi da najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina ima Merlot (2,09 mg/kg sv.g.) a najmanji Prokupac (1,01 mg/kg sv.g.). Odnos najvećeg i najmanjeg sadržaja hidroksicimetnih kiselina je oko 2. *Guerrero i sar. (2009)* su dobili sličan odnos sadržaja hidroksicimetnih kiselina za pet ispitivanih crvenih sorti grožđa. Isti autori su izveli zaključak da se hidroksicimetne kiseline sintetišu i/ili degradiraju na isti način bez obzira na sortu grožđa.



Slika 4.7. HPLC hromatogram (320nm) hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu grožđa Vranac: t-kaftarna kiselina (1); c-kutarna kiselina (2); t-kutarna kiselina (3); kafena kiselina (4).

Tabela 4.5. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina (mg/100 g svežeg grožđa)¹ u stonim i vinskim sortama grožđa

	t-kaftarna kiselina ²	c-kutarna kiselina ³	t-kutarna kiselina ³	t-kafena kiselina	Ukupno
Kardinal	0,68±0,05	0,11±0,03	0,32±0,04	0,08±0,01	1,20±0,03
Muscat Hamburg	0,98±0,09	0,17±0,02	0,38±0,07	0,10±0,01	1,63±0,05
Ribier	0,85±0,06	0,19±0,05	0,29±0,03	0,19±0,02	1,42±0,04
Prokupac	0,47±0,02	0,22±0,02	0,21±0,01	0,11±0,02	1,01±0,02
Vranac	0,70±0,05	0,11±0,04	0,18±0,02	0,30±0,05	1,29±0,04
Merlot	1,05±0,11	0,25±0,02	0,67±0,08	0,12±0,04	2,09±0,06
C.Sauvignon	0,82±0,09	0,09±0,01	0,58±0,02	0,25±0,02	1,74±0,04

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg ekvivalenta kafene kiseline/100 g svežeg grožđa; ³mg ekvivalenta p-kumarne kiseline/100 g svežeg grožđa

4.1.1.3. ICP-OES određivanje metala u grožđu

U grožđu i moštu prisutni su brojni minerali. Njihova ukupna koncentracija u moštu iznosi od 3-5 g/L. U najvišoj koncentraciji zastupljeni su kalijum, kalcijum i magnezijum. Koncentracija kalijuma iznosi oko 50% ukupne količine pepela. Količina kalijuma i drugih minerala znatno varira u zavisnosti od njihovih koncentracija u tlu, klimatskih uslova, uslova proizvodnje, stadijuma zrelosti voća. U grožđu mogu biti prisutni i tragovi teških metala poput olova, žive i kadmijuma koji se obično talože tokom vrenja. Za identifikaciju i kvantifikaciju metala u uzorcima grožđa sa područja južne Srbije korišćena je ICP-OES metoda. Jako dobra osetljivost (ppb) i široki radni opseg za mnoge elemente čine ICP-OES skoro idealnom metodom za analizu uzorka voća. U cilju određivanja sadržaja minerala u ispitivanim uzorcima grožđa, izvršena je priprema uzorka po proceduri prikazanoj u delu 3.2.1.2. Zatim su određeni analitički parametri za ispitivane elemente. U tabeli 4.6. prikazane su odabrane talasne dužine za svaki element, koeficijent korelacije i granice detekcije i kvantifikacije c_L i c_Q .

Table 4.6. Karakteristike metoda kvantitativnog određivanja ispitivanih elemenata.

Element	λ (nm)	c_L /mg L ⁻¹	c_Q /mg L ⁻¹	Korelacioni koeficijent
Na	818,326	0,4047	1,3489	1,00000
K	766,490	0,607	2,023	0,99995
Ca	393,366	0,480	1,600	0,99040
Mg	279,553	0,360	1,201	0,99894
Fe	259,940	0,0539	0,1799	0,99992
Cu	324,754	0,1326	0,4421	0,99955
Zn	202,548	0,1138	0,3794	0,99967
Mn	257,610	0,1985	0,6619	0,99900
Cr	284,325	0,0723	0,2412	0,99987
Cd	226,502	0,0826	0,2755	0,99983
Co	230,786	0,1021	0,3405	0,99973
Pb	220,353	0,2325	0,7751	0,99864
Ni	231,604	0,1138	0,3794	0,99969

U tabelama 4.7 i 4.8 prikazan je sadržaj elemenata, određen metodom standardnog dodatka, kao srednja vrednost plus standardna devijacija tri uzastopna merenja.

Kao što se iz tabele 4.7. i 4.8. vidi u uzorcima grožđa najzastupljeniji su alkalni (Na, K) i zemnoalkalni (Ca, Mg) metali, dok su biološki važni elementi (Fe, Cu, Zn, Mn) u sledećoj grupi po zastupljenosti (tabela 4.8). Korišćenjem Duncan-ovog testa višestrukih intervala jasno se uočavaju razlike u sadržaju određivanih elemenata u ispitivanim uzorcima grožđa. Zastupljenost ovih elemenata u Cardinalu, Muscat Hamburgu i Ribieru date su na slikama 4.8, 4.9 i 4.10.

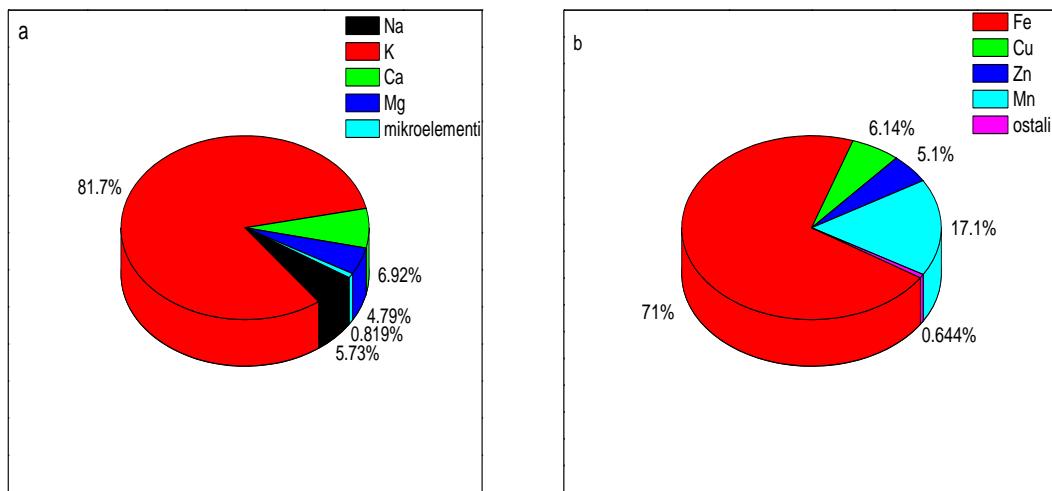
Tabela 4.7. Sadržaj makoelemenata (mg/100g sežeg voća)¹ u uzorcima grožđa.

Metal	Sorta grožđa	Količina u uzorku	Dodato	Određeno	rikaveri (%)
Na	Ca	7,56 ± 0,34 a ²	5,00	12,81 ± 0,28 a	103
	MH	9,81 ± 0,39 b	5,00	14,92 ± 0,30 b	101
	Ri	11,88 ± 0,44 c	5,00	17,40 ± 0,34 c	104
K	Ca	107,77 ± 3,03 a	50,00	151,84 ± 3,22 a	94
	MH	106,40 ± 2,50 a	50,00	159,22 ± 2,82 a	103
	Ri	64,50 ± 1,40 b	50,00	110,52 ± 1,12 b	94
Ca	Ca	9,13 ± 0,39 b	5,00	13,70 ± 0,28 b	95
	MH	8,72 ± 0,20 b	5,00	13,40 ± 0,24 b	96
	Ri	10,15 ± 0,65 a	5,00	15,28 ± 0,55 a	101
Mg	Ca	6,32 ± 0,26 a	5,00	11,56 ± 0,28 a	104
	MH	5,69 ± 0,14 b	5,00	10,78 ± 0,22 b	102
	Ri	7,30 ± 0,22 c	5,00	12,72 ± 0,28 c	106

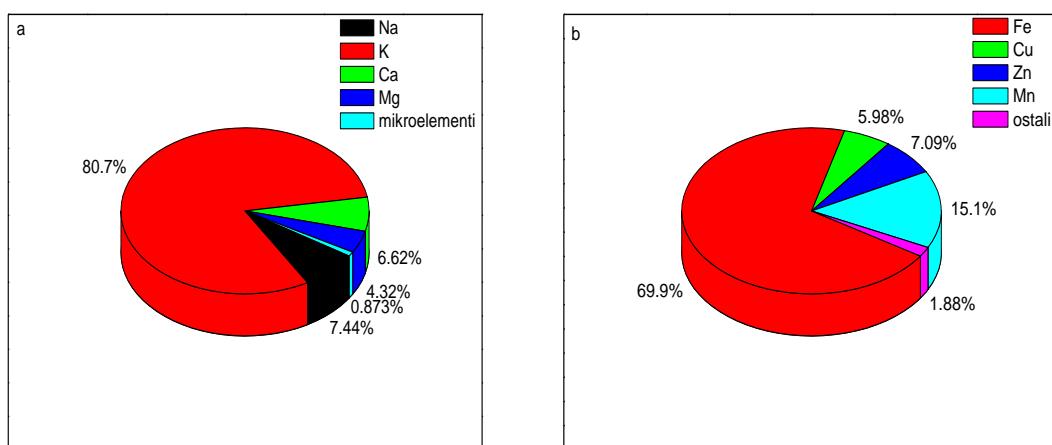
¹ srednja vrednost ± SD (n=3); ² brojevi označeni različitim slovima u koloni za isti element se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05). Ca-Cardinal, MH-Muskat Hamburg, Ri-Ribier.

Iz tabele 4.8. i slika 4.8- 4.10 se može videti da je od mikroelemenata najzastupljeniji element Fe, zatim slede Mn, Cu i Zn. Bakar i gvožđe su nepoželjni u većim koncentracijama jer katalizuju oksidaciju i izazivaju kvarenje vina. U ispitivanim stonim sortama grožđa bakar se kretao u intervalu od 0,64 u Cardinalu do 0,84 mg/kg u Ribieru. Razlike u sadržaju bakra u različitim stonim sortama grožđa sa istog područja posledica su individualnih karakteristika različitih sorti grožđa, dok je sam nivo sadržaja bitno uslovljen podnebljem na kome je grožđe uzgajano i primenom agrotehničkih mera. Provenzano i sar. (2010) su ispitivali korelaciju sadržaja bakra u zemljištu, grožđu i vinu Mediteranskih vinograda. Nađeno je da zemljiše sadrži oko 5 mg/kg (na dubini od 20 do 40 cm), grožđe od 1,7 do 5 mg/kg dok se u vinu njegov sadržaj kreće od 0,116 do 0,462 mg/L. Dakle, ako se upoređenje vrši na nivou kg grožđa/L vina, to je količina ovog jona za oko jedan red veličine manji u vinu, ako ne dođe

do kontaminacije iz drugih izvora u toku proizvodnje vina. Može se očekivati da će sadržaj bakra u vinima sa područja Srbije biti reda veličine od 0,2 do 0,4 mg/L. Istraživanja drugih autora (*Ražić i sar.*, 1999) su pokazala da u vinima sa područja Srbije, sadržaj bakra varira u granicama od 0,18 do 0,41 mg/L.



Slika 4.8. Zastupljenost makro- (a) i mikroelemenata (b) u Cardinalu.

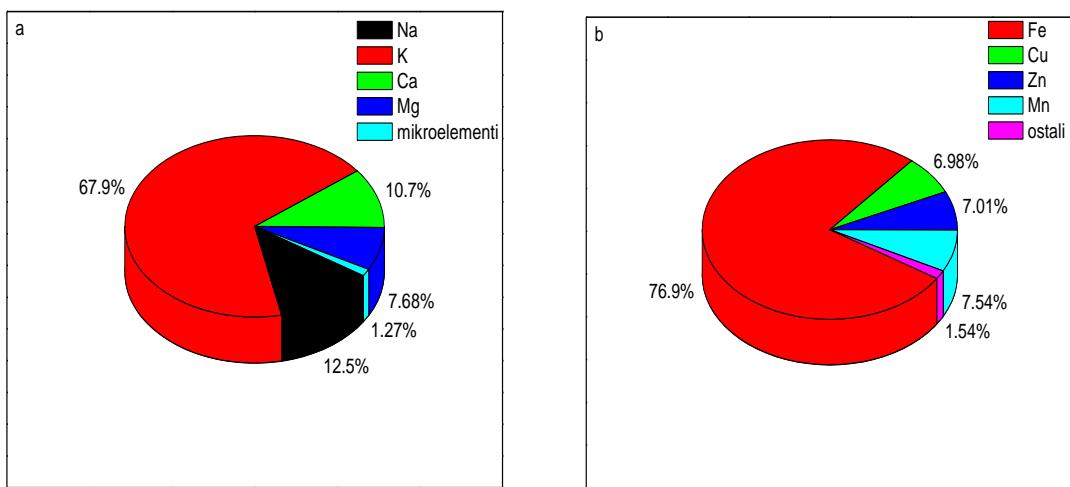


Slika 4.9. Zastupljenost makro- (a) i mikroelemenata (b) u Muscat Hamburgu.

Tabela 4.8. Sadržaj mikroelemenata ($\mu\text{g}/100\text{g svežeg voća}$)¹ u uzorcima grožđa.

Metal	Sorta grožđa	Količina u uzorku	Dodato	Određeno	rikaveri (%)
Fe	Ca	736,00 \pm 14,70a ²	300	1088,80 \pm 10,70a	107
	MH	784,33 \pm 5,87b	300	1108,60 \pm 6,82b	103
	Ri	925,67 \pm 6,52c	300	1258,88 \pm 4,68c	104
Cu	Ca	63,67 \pm 1,23a	30	95,88 \pm 1,08a	103
	MH	67,10 \pm 1,40b	30	98,20 \pm 1,62b	102
	Ri	83,93 \pm 1,07c	30	109,82 \pm 2,04c	95
Zn	Ca	52,80 \pm 1,20a	30	81,66 \pm 2,20a	98
	MH	79,53 \pm 2,67b	30	106,66 \pm 1,99b	96
	Ri	84,37 \pm 2,13c	30	110,64 \pm 2,50c	96
Mn	Ca	177,00 \pm 3,00a	50	234,22 \pm 3,66a	104
	MH	196,43 \pm 7,36b	50	250,02 \pm 6,42b	102
	Ri	90,73 \pm 2,17c	50	142,88 \pm 2,88c	102
Cr	Ca	6,67 \pm 0,23a	3	9,20 \pm 0,18a	93
	MH	5,73 \pm 0,17b	3	8,42 \pm 0,22b	95
	Ri	7,93 \pm 0,17c	3	10,42 \pm 0,28c	94
Cd	Ca	0,37 \pm 0,02a	1	1,42 \pm 0,04a	113
	MH	0,17 \pm 0,00b	1	1,19 \pm 0,03b	112
	Ri	0,50 \pm 0,02c	1	1,57 \pm 0,01c	114
Co	Ca	1,60 \pm 0,03a	1	2,70 \pm 0,03a	106
	MH	1,17 \pm 0,03b	1	2,20 \pm 0,04b	103
	Ri	1,10 \pm 0,02c	1	2,18 \pm 0,04c	107
Pb	Ca	8,77 \pm 0,23a	5	14,20 \pm 0,28a	105
	MH	11,00 \pm 0,50b	5	15,46 \pm 0,36b	95
	Ri	9,43 \pm 0,37a	5	14,68 \pm 0,48a	103
Ni	Ca	7,43 \pm 0,37a	3	10,22 \pm 0,22a	97
	MH	8,77 \pm 0,13b	3	11,40 \pm 0,20b	96
	Ri	7,53 \pm 0,37a	3	10,22 \pm 0,28a	96

¹ srednja vrednost \pm SD (n=3); ² brojevi označeni različitim slovima u koloni za isti element se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05). Ca-Cardinal, MH-Muskat Hamburg, Ri-Ribier.



Slika 4.10. Zastupljenost makro- (a) i mikroelemenata (b) u Ribieru.

Slični rezultati su dobijeni i za druge metalne jone. Tako su naša ispitivanja pokazala da se sadržaj hroma kreće u intervalu od 57,3 do 79,3 µg/kg, dok se u grožđu gajenom na području Španije ove vrednosti kreću od 2,4 do 64,6 µg/kg (*Cabrera-Vique i sar., 1997*).

4.1.2. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti crvenih vina

U tabeli 4.9 prikazan je naziv, sorte grožđa i područje proizvodnje ispitivanih crvenih vina.

Tabela 4.9. Naziv, vrste grožđa i područje proizvodnje ispitivanih crvenih vina.

Vino	Naziv	Sorte grožđa	Područje
1	Ždrepceva krv	Vranac, Merlot, C.Souv.	Subotica- Srbija
2	Medas crni	Merlot, Game, Burgundac	Aleksandr. -Srbija
3	Medveđa krv	Prokupac, Vranac	Kruševac-Srbija
4	Kratošia	Kratošia	Aleksandr. -Srbija
5	Merlot	Merlot	Subotica- Srbija
6	Game	Game	Kruševac-Srbija
7	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	Kruševac-Srbija
8	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	Tikveš-Makedonija
9	Ždrebac	Vranac	Subotica- Srbija
10	Vranac	Vranac	Aleksandr. -Srbija
11	Vranac	Vranac	Kruševac-Srbija
12	Vranac	Vranac	Štip-Makedonija
13	Vranac	Vranac	Ohrid-Makedonija
14	Vranac	Vranac	Ovčepolsko-Make.
15	Vranac	Vranac	Skoplje-Makedonija

Za određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti ispitivanih crvenih vina korišćene su spektrofotometrijska i HPLC metoda.

4.1.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti crvenih vina

U tabeli 4.10. prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja *ukupnih fenola* u 15 uzoraka ispitivanih crvenih vina. Rezultati pokazuju da je najveći sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu Medveđa krv, koje je dobijeno kupažom od sorti grožđa Vranac i Prokupac. Najmanji sadržaj uočen je u vinu Ždrepčeva krv. Korišćenjem Duncan-ovog testa višestrukih intervala jasno se uočavaju razlike između sadržaja ukupnih rastvorljivih fenola u ispitivanim vrstama crvenih vina. Signifikantne razlike vina u pogledu sadržaja ukupnih polifenola su takođe date u tabeli 4.10. Ako se razlike razmatraju samo u okviru vina proizvedenih od jedne iste vrste grožđa, odnosno Vranca, i uzimajući u obzir statističke parametre, vina Vranac (Ohrid-Makedonija i Skoplje-Makedonija) to su vina sa najvećim sadržajem polifenola, dok su vina Vranac (Aleksandrovac-Srbija i Ovčepolsko-Makedonija) uzorci sa najmanjim sadržajem polifenola. Ovo potvrđuje činjenicu da sastav i sadržaj polifenolnih jedinjenja zavisi pre svega od sorte grožđa, ali može biti uslovljen i načinom uzbudjanja, klimatskim uslovima i postupkom ekstrakcije. Dobijene vrednosti sadržaja ukupnih polifenola u crvenim vinima su uporedive sa literaturnim podacima. Sadržaj polifenola u hrvatskim crvenim vinima se kreće od 2809 do 3183 mg GAE/L (Katalinić i sar., 2004), italijanskim od 1365 do 3326 mg/L (Simonetti i sar., 1997), turskim od 1070 do 3410 mg/L (Anli i sar., 2009), dok se u brazilskim kreće od 3200 do 5900 mg/L (Lucena i sar., 2010).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja *ukupnih flavonoida* u ispitivanim crvenim vinima prikazani su u tabeli 4.10. Sadržaj ukupnih flavonoida u 15 uzoraka crvenih vina kreće se od 1578.9 do 1998.4 mg CE/L, pri čemu je vino Cabernet Sauvignon (Tikveš-Makedonija) najbogatije flavonoidima. Iz tabele se može videti da je znatan udeo flavonoida (odnos TF/TP) u ukupnom sadržaju polifenola (0.63-0.73) kod crvenih vina.

Intenzitet boje vina ne zavisi samo od toga koliko će se bojenih materija ekstrahovati iz pokožice grožđa, već i koliko će se antocijana zadržati u vinu tokom čuvanja. Do promene boje crvenih vina dolazi zbog strukturalnih promena antocijana (od ionizovanih antocijana, karbiola i hinoidne veze) do kondenzovanih antocijana, pa se na osnovu njihovog procentualnog učešća u boji vina može proceniti starost vina. Tokom čuvanja vina najveći deo antocijana sa taninima gradi stabilne tamnomrke komplekse, a manji deo se razlaže pod uticajem temperature, svetlosti, kiseonika ili se istaloži kao koloidna frakcija. Po pravilu, kod starijih crvenih vina, apsorbanca na 520 nm se smanjuje, dok se apsorbanca na 420 nm povećava, zbog prelaska monomernih u polimerne antocijane (Luoana, 2005). Ispitivanjem uticaja vremena čuvanja (u boci) vina na sadržaj monomernih i polimernih antocijana, Poiana i sar. (2008) su pokazali da se tokom čuvanja u boci od 30 meseci, procenat monomernih antocijana smanjio od 75,89 do 24,0, dok se u istom vremenskom periodu procenat polimernih antocijana povećao od 11,93 do 68,51. Iz gore navedenih razloga neophodno je odrediti posebno sadržaj monomernih antocijana kao i procenat polimerne boje u ispitivanim crvenim vinima.

Tabela 4.10. Sadržaj ukupnih fenola (TP) i flavonoida (TF) ispitivanih crvenih vina i njihov odnos.

Vino	Naziv	TP ¹ (mg GAE/L)	TF ² (mg CE/L)	TF/TP
1	Ždrepčeva krv	2321 ± 81 ³ a ⁴	1578,9 ± 50,3 a	0,68
2	Međas crni	2738 ± 86 bc	1802,3 ± 68,0 bc	0,66
3	Medveđa krv	3080 ± 101 bc	1950,2 ± 68,4 bc	0,63
4	Kratošija	2800 ± 95 bc	1850,2 ± 61,6 bc	0,66
5	Merlot	2620 ± 95 ab	1762,3 ± 59,9 abc	0,67
6	Game	2665 ± 87 ab	1820,1 ± 62,7 bc	0,68
7	Cabernet Sauvignon	2429 ± 82 a	1682,3 ± 57,2 ab	0,69
8	Cabernet Sougvinon	2860 ± 105 bc	1998,4 ± 69,9 bc	0,70
9	Ždrebac	2377 ± 78 a	1580,2 ± 50,5 a	0,66
10	Vranac	2561 ± 84 ab	1772,3 ± 67,3 abc	0,69
11	Vranac	2668 ± 98 ab	1770,5 ± 60,2 abc	0,66
12	Vranac	2525 ± 84 ab	1720,2 ± 59,9 ab	0,68
13	Vranac	2850 ± 93 bc	1955,3 ± 66,5 c	0,69
14	Vranac	2379 ± 76 a	1735,8 ± 57,3 abc	0,73
15	Vranac	2850 ± 99 bc	1910,8 ± 63,8 c	0,66

¹mg ekvivalenta galne kiseline /l vina; ²mg katehin ekvivalenta /L vina; ³srednja vrednost ± SD (n=3);

⁴brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Sadržaj monomernih antocijana određen je za vina starosti od 3 do 6 godina, prema proceduri prikazanoj u delu 3.3.2.3. Rezultati analize pokazani su u tabeli 4.11. U istoj tabeli prikazani su i rezultati određivanja procenta polimerne boje, po proceduri dатој u delu 3.3.2.4. Analiza rezultata pokazuje da je najveća koncentracija monomernih antocijana određena u vinu Cabernet Sauvignon (br.8, godina punjenja 2007, analiza rađena krajem 2009. godine), a najniža koncentracija takođe u vinu Cabernet Sauvignon (br.7, godina punjenja 2003.). Suprotno ovim rezultatima, procenat polimerne boje je najveći u uzorku vina 7, a najmanji u uzorku vina 8. Dobijeni rezultati potvrđuju literaturne podatke da monomerni antocijani tokom starenja u boci prelaze u polimerne antocijane.

Tabela 4.11. Sadržaj monomernih antocijana (MA) i procenat polimerne boje ispitivanih cryenih vina.

Vino	Godina	MA ¹ (mg/L)	Procenat polimerne boje (%) ^b
1 Ždrepčeva krv	2005	62,2 ± 5,5 ² bc ³	70,4 ± 0,9
2 Međas crni	2005	77,5 ± 6,2 c	65,2 ± 0,7
3 Medveđa krv	2004	46,6 ± 3,9 ab	76,9 ± 1,2
4 Kratošija	2004	43,1 ± 2,9 ab	77,1 ± 1,0
5 Merlot	2004	38,8 ± 3,2 ab	79,9 ± 1,1
6 Game	2005	63,5 ± 5,0 bc	70,1 ± 0,6
7 Cabernet Sauvignon	2003	30,5 ± 2,4 a	85,5 ± 0,8
8 Cabernet Sougvinon	2007	165,5 ± 9,9 c	36,5 ± 0,9
9 Ždrebac	2005	54,1 ± 4,5 b	72,0 ± 1,2
10 Vranac	2005	48,5 ± 4,2 ab	73,2 ± 1,1
11 Vranac	2005	55,7 ± 4,2 bc	72,9 ± 0,7
12 Vranac	2005	63,8 ± 5,3 bc	70,0 ± 0,6
13 Vranac	2005	79,3 ± 5,4 c	66,2 ± 0,5
14 Vranac	2004	50,2 ± 4,0 ab	80,0 ± 1,1
15 Vranac	2005	70,3 ± 4,8 bc	70,1 ± 0,9

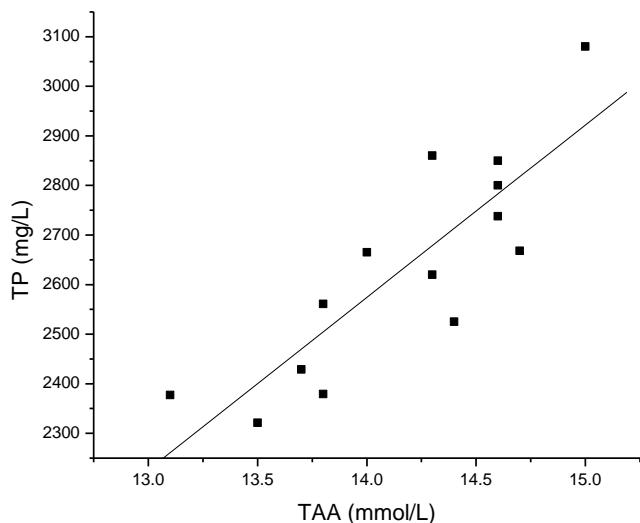
¹mg malvidin-3-glukozid ekvivalenta /L vina; ² % polimerne boje = (polimerna boja / gustina boje) x 100; ³srednja vrednost ± SD (n=3); ³brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Radikal „skevindžer“ kapacitet i antioksidativna aktivnost u ispitivanim uzorcima vina je određena primenom DPPH metode, koja je detaljno opisana u delu 3.3.2.5. Dobijeni rezultati su dati u tabeli 4.12. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4.12. može se zaključiti da ispitivana vina imaju znatan radikal „skevindžer“ kapacitet i znatnu antioksidativnu aktivnost.

Sposobnost neutralizacije DPPH radikala (RSC) u ispitivanim crvenim vinima kreće se u intervalu od 74,8 do 87,9%, pri čemu je najveću sposobnost pokazalo vino Cabernet Sauvignon-Tikveš, Makedonija. Poređenja radi navećemo podatak da se radikal „skevindžer“ kapacitet hrvatskih crvenih vina kreće u intervalu od 72,1 do 82,65 % (Katalinić i sar., 2004). Ukupna antioksidativna aktivnost italijanskih crvenih vina kreće se u intervalu od 7,8 do 19,8 mmol TE/L (Simonetti i sar., 1997), dok je za crvena vina južne Afrike određen interval od 9,51 do 12,39 mmol TE/L (De Beer i sar., 2003), što je u skladu sa našim rezultatima (13,10 – 15,0 mmol TE/L).

Antioksidativni potencijal su De Beer i sar. (2003) određivali da bi napravili razliku između ispitivanih vina i doveli u vezu antioksidativnu aktivnost i sadržaj fenola u njima. Za pet crvenih vina dobili su da se antioksidativni potencijal kreće od 4,73 za vino Ruby Cabernet do 5,24 za Cabernet Sauvignon. Naša ispitivanja su pokazala da od 15 ispitivanih crvenih vina najveći antioksidativni potencijal ima vino Ždrepčeva krv (5,82), odnosno vino koje pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost u odnosu na sadržaj ukupnih fenola.

U mnogim istraživanjima (Muselik i sar., 2007; Lucena i sar., 2010) je dokazan visok stepen pozitivne korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti vina. Da bi se potvrdila veza između ukupne antioksidativne aktivnosti vina i sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i monomernih antocijana urađena je *korelaciona analiza*. Uticaj sadržaja fenolnih jedinjenja na antioksidativnu aktivnost crvenih vina na DPPH radikale, iskazan je relativno dobrom korelacijom ($R^2=0,85$) (slika 4.11). Analiza korelacije između sadržaja ukupnih flavonoida i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih vina pokazuje koeficijent $R^2=0,77$ (slika 4.12), dok korelacija između ukupnih monomernih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti pokazuje koeficijent $R^2=0,16$ (slika 4.13), što se i očekivalo s obzirom na mali sadržaj monomernih antocijana (tabela 4.11) u ispitivanim crvenim vinima. Sadržaj monomernih antocijana u vinu se smanjuje sa vremenom starenjavina u boci zbog prelaska monomernih antocijana u polimerne.

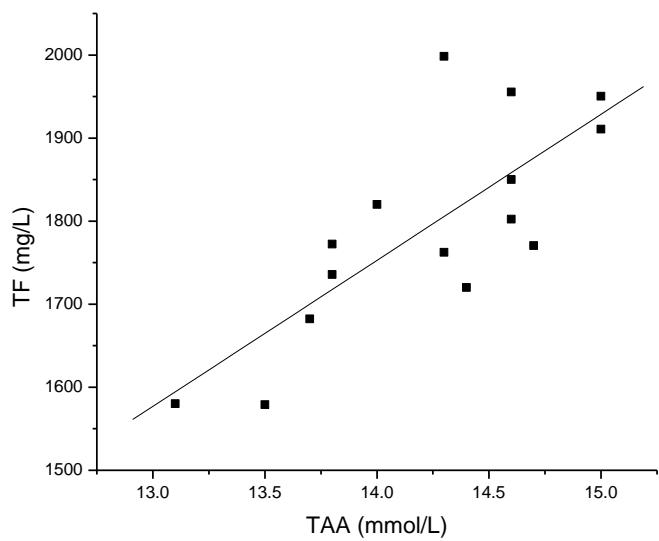


Slika 4.11. Grafik korelacije sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih crvenih vina.

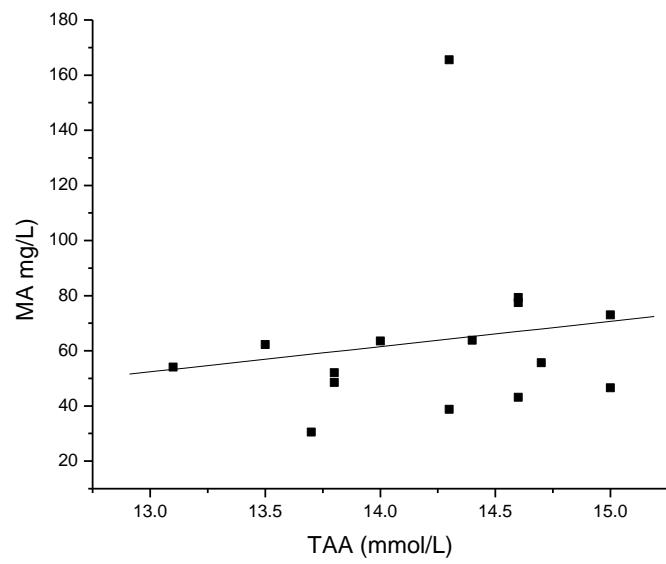
Tabela 4.12. Radikal “skevendžer” kapacitet (RSC), ukupna antioksidativna aktivnost (TAA) i antioksidativni potencijal (AP) ispitivanih crvenih vina.

	Vino	RSC (%)	TAA ¹ (mmol TE/L)	AP ²
1	Ždrepčeva krv	77,4 ± 0,9 ³	13,5 ± 0,36	5,82 ± 0,72
2	Međas crni	83,7 ± 0,8	14,6 ± 0,48	5,33 ± 0,63
3	Medveđa krv	85,9 ± 0,8	15,0 ± 0,48	4,87 ± 0,52
4	Kratošija	83,7 ± 0,3	14,6 ± 0,45	5,21 ± 0,58
5	Merlot	81,8 ± 0,8	14,3 ± 0,47	5,46 ± 0,67
6	Game	80,3 ± 0,7	14,0 ± 0,43	5,25 ± 0,43
7	Cabernet Sauvignon	78,5 ± 0,3	13,7 ± 0,46	5,64 ± 0,28
8	Cabernet Sougvinon	87,9 ± 0,2	14,3 ± 0,46	5,00 ± 0,62
9	Ždrebac	74,8 ± 0,2	13,1 ± 0,43	5,51 ± 0,82
10	Vranac	79,5 ± 0,8	13,8 ± 0,52	5,41 ± 0,75
11	Vranac	84,6 ± 0,5	14,7 ± 0,48	5,53 ± 0,67
12	Vranac	82,6 ± 0,4	14,4 ± 0,46	5,71 ± 0,55
13	Vranac	83,8 ± 0,3	14,6 ± 0,38	5,13 ± 0,57
14	Vranac	79,5 ± 0,2	13,8 ± 0,39	5,80 ± 0,39
15	Vranac	86,3 ± 0,7	15,0 ± 0,40	5,28 ± 0,48

¹mmol troloksa ekvivalenta /L vina; Ukupna antioksidativna aktivnost je izražena kao ekvivalent troloksa; ²AP (antioksidativni potencijal) = TAA (mM trolosa) x 1000 / ukupni fenoli (mg galne kiseline/L).



Slika 4.12. Grafik korelacije sadržaja ukupnih flavonoida i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih crvenih vina.



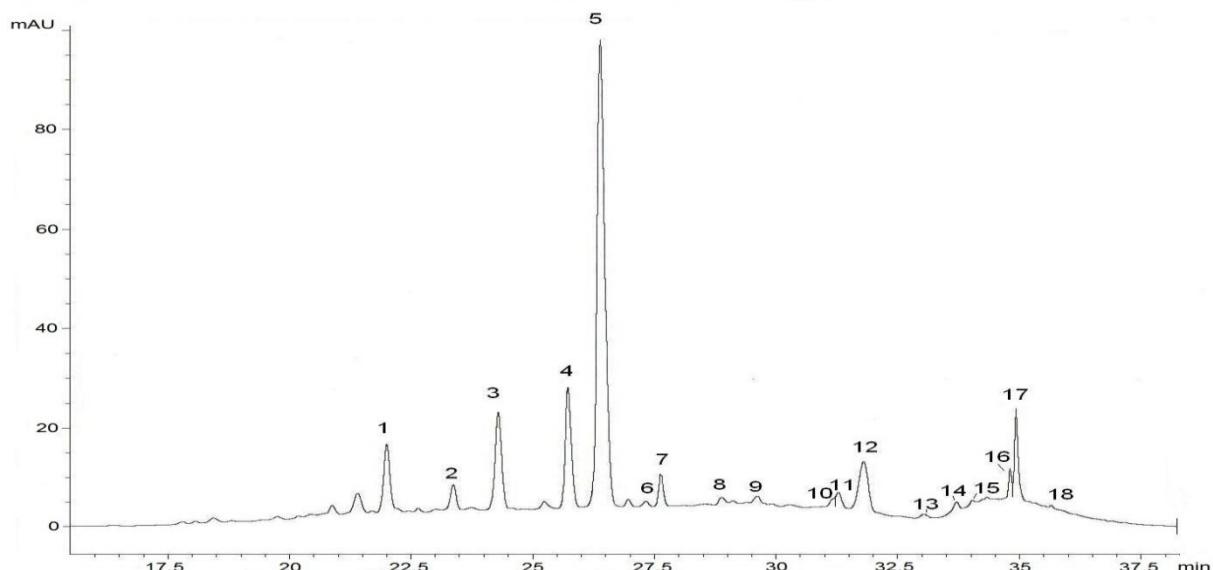
Slika 4.13. Grafik korelacije sadržaja ukupnih monomernih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih crvenih vina.

4.1.2.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina u crvenom vinu

Prema Broillard (1982), u kiseloj sredini (vinu) *antocijani* se nalaze u pet, dinamički uravnoteženih molekulskih oblika: crveno obojeni flavilijum katjoni, ljubičaste hinoidne baze, hinoidne baze, slabo obojene baze i halkona, što je prikazano na slici 21. Boja i sastav vina zavise od pH. U normalnim uslovima prisutni su flavilijum katjoni i karbinol baze, dok se hinoidne baze i halkoni javljaju pri višim temperaturama. Da bi odredili sastav i sadržaj pojedinačnih antocijana primenili smo HPLC metodu.

U ispitivanim crvenim vinima identifikovani su i kvantifikovani glukozidi pet antocijana: malvidina, cijanidina, delfnidina, petunidina i peonidina, a takođe i njihovi acetil i kumaroil derivati.

Na slici 4.14 je dat hromatogram crvenog vina Vranac. Identifikovano je 18 jedinjenja, među kojima je i vitisin A. Vitisin A nastaje tokom alkoholne fermentacije reakcijom malvidina i piruvinske kiseline, dok reakcijom malvidina i acetaldehida nastaje vitisin B. Ovi produkti, kao i antocijani, mogu biti acilovani ili mogu formirati polimere sa taninima.



Slika 4.14. HPLC hromatogram antocijana (520 nm) u crvenom vinu Vranac: delfnidin-3-glukozid (1); cijanidin-3-glukozid (2); petunidin-3-glukozid (3); peonidin-3-glukozid (4); malvidin-3-glukozid (5); delfnidin-3-acetil-glukozid (6); vitisin A (7); cijanidin-3-acetil-glukozid (8); petunidin-3-acetyl-glukozid (9); Delfnidin-3-kumaroil-glukozid (10); Peonidin-3-acetyl-glukozid (11); malvidin-3-acetyl-glukozid (12); cijanidin-3-kumaroil-glukozid (13); malvidin-3-kumaroil-glukozid-cis (14); petunidin-3-kumaroil-glukozid (15); peonidin-3-p-kumaroil-glukozid (16); malvidin-3-kumaroil-glukozid (17); malvidin-3-vinilfenol-glukozid (18).

Rezultati određivanja monomernih antocijana u vinu Merlot (br. 5, godina punjenja 2004., analiza rađena krajem 2009.), Vranac (br.11, godina punjenja 2005.) i Vranac (br.15, godina punjenja 2005.) prikazani su u tabeli 4.13. Iz tabele se može videti da je njihov sadržaj u ispitivanim crvenim vinima mali, što je u saglasnosti sa starošću vina i sa rezultatima za ista vina dobijenih spektrofotometrijskom analizom (tabela 4.11).

Predhodni rezultati pokazuju da se hemijski sastav vina dosta razlikuje u zavisnosti od vrste grožđa, godine branja, starosti vina, različitih uslova gajenja vinove loze tj. područja. Da bi se objasnio uticaj različite lokacije na sastav vina urađena je uporedna analiza vina Vranac iz Srbije, Makedonije i Crne Gore iste godine proizvodnje 2009 (uzeta su mlada vina) HPLC metodom. U tabeli 4.14, dat je sadržaj antocijana, flavonola, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina, dok je zastupljenost pojedinih klasa jedinjenja prema ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja određenom HPLC metodom za ispitivana vina data na slikama 4.15 - 4.17.

Tabela 4.13. Sadržaj antocijana (mg/L)^{1,2} u crvenim vinima određen HPLC metodom.

Vino	Merlot (5)	Vranac (11)	Vranac (15)
Dp-3-glukozid	1,22±0,02	4,75±0,20	3,85±0,09
Cy-3-glukozid	0,13±0,01	0,43±0,05	1,27±0,05
Pt-3-glukozid	1,52±0,04	4,82±0,18	5,72±0,17
Pn-3-glukozid	0,54±0,02	3,84±0,11	6,75±0,21
Mv-3-glukozid	15,47±0,15	26,52±0,35	33,29±0,56
Dp-3-acetil-glukozid	0,76±0,09	0,26±0,03	0,28±0,05
Cy-3-acetil-glukozid	1,09±0,08	0,14±0,02	0,38±0,06
Pt-3-acetil-glukozid	1,26±0,03	0,28±0,02	0,29±0,03
Pn-3-acetil-glukozid	nd	0,78±0,07	1,01±0,18
Mv-3-acetil-glukozid	7,47±0,10	2,34±0,10	4,67±0,12
Dp-3-kumaroil-glukozid	0,62±0,05	nd	0,46±0,09
Cy-3-kumaroil-glukozid	0,26±0,01	0,10±0,02	0,28±0,07
Pt-3-kumaroil-glukozid	0,14±0,02	0,09±0,03	0,17±0,06
Pn-3-kumaroil-glukozid	0,16±0,02	0,64±0,05	0,84±0,12
Mv-3-kumaroil-glukozid	0,87±0,02	2,68±0,06	3,11±0,18
Mv-3-kuma.-glukozid-cis	nd	0,36±0,03	0,43±0,08
Vitisin A	1,62±0,08	1,23±0,10	1,36±0,06
Mv-3-vinilfenol-glukozid	nd	0,07±0,10	0,21±0,03
Ukupno	33,13	49,65	64,23

¹ mg malvidin-3-glukozid ekvivalenta /L vina; ²srednja vrednost ± SD (n=3).

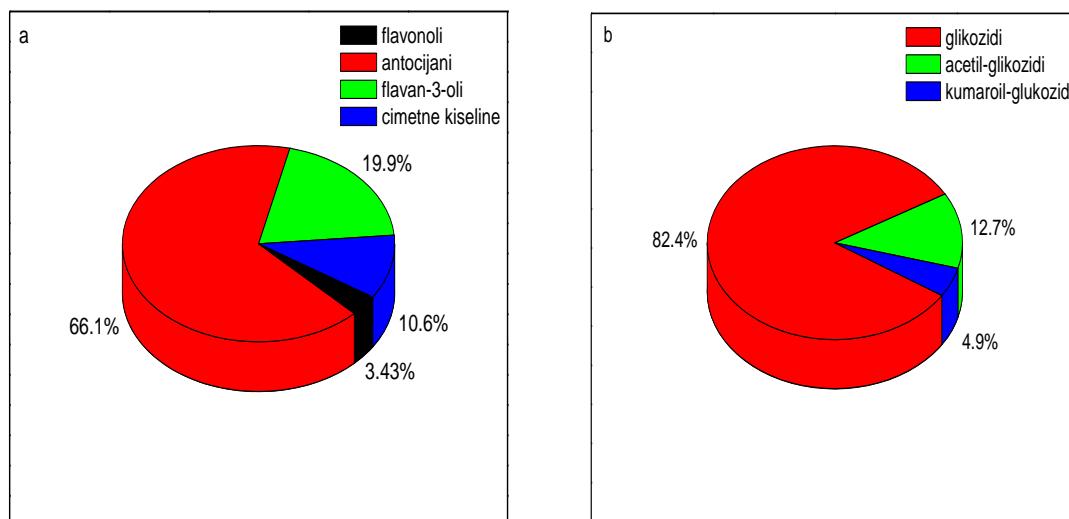
Podaci iz tabele 4.14 i slika 4.15– 4.17 ukazuju na veliku zastupljenost antocijana u mladim crvenim vinima Vranac (66,1–71,7%). Podaci na slikama 4.15-4.17 pokazuju da među antocijanima su najzastupljeniji glukozidi (82,4-84,2%), slede acetil-glukozidi (11,8-12,7%) i na kraju kumaroil-glukozidi (3,8-5,7%). Najzastupljeniji glukozid je glukozid malvidina, koji je prisutan sa 60,24% (srednja vrednost) u odnosu na ukupan sadržaj antocijana, najzastupljeniji acetil-glukozid je takođe malvidin-3-acetil-glukozid (9,44% u odnosu na ukupan sadržaj antocijana) i na kraju ista je situacija i sa malvidin-3-kumaroil-glukozidom (3,87%). Zastupljenost antocijana u ispitivanim uzorcima vina Vranac sledi niz:

$$\text{Mv-3-G} > \text{Mv-3-AG} > \text{Pn-3-G} > \text{Pt-3-G} > \text{Dp-3-G} > \text{Mv-3-CG}$$

Sa izuzetkom u vinu Vranac iz Srbije gde je $\text{Mv-3-CG} > \text{Dp-3-G}$. Sličan niz, sa uočenim izuzetkom predložen je u referentnoj literaturi (*Kallithraka i sar.*, 2007).

Nađeno je da se sadržaj *flavonola* u ispitivanim uzorcima vina Vranac kreće u intervalu od 18,13 do 23,60 mg/L (3,13-4,02% u odnosu na ukupni sadržaj određenih fenolnih komponenti), što je u skladu sa rezultatima drugih autora. *Rodriguez-Delgado i sar.* (2002) su pronašli da su u 9 španskih mladih crvenih vina sa različitog područja flavonoli prisutni u intervalu od 10,80 do 32,14 mg/L.

U grčkim (*Arinous i sar.*, 2001) i mađarskim (*Nikfardjam i sar.*, 2006) crvenim vinima sadržaj *flavan-3-ola* iznosi 145,9 (n=10), osnosno 182,4 (n=67), dok je u našim crvenim vinima određen manji sadržaj i on iznosi 113,25 mg/L (n=3). Međutim, crvena vina Vranac sadrže više hidroksicimetnih kiselina (50,29 mg/L, srednja vrednost) u odnosu na mađarska vina (12,0 mg/L), ali istovremeno manje u odnosu na grčka vina (501,6 mg/L).

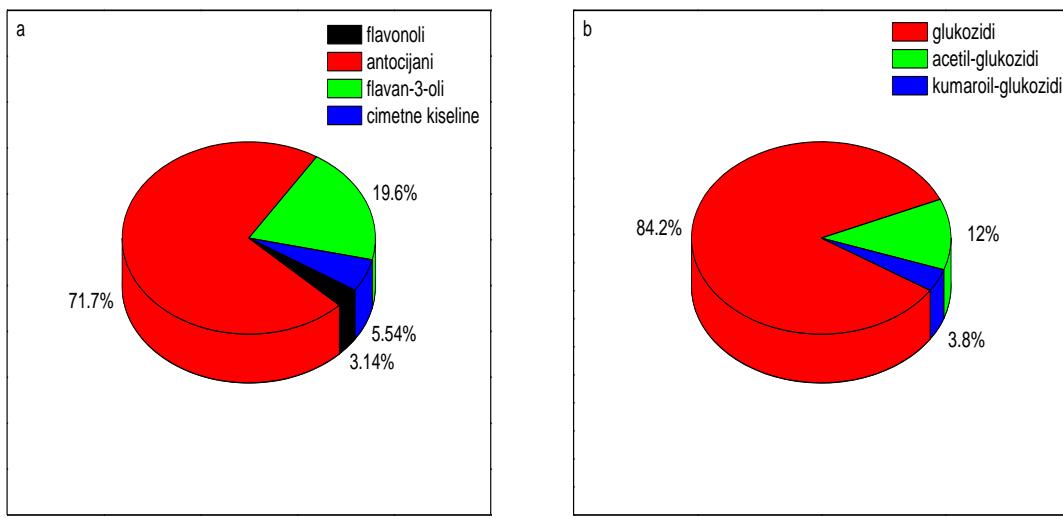


Slika 4.15. Zastupljenost pojedinih klasa jedinjenja (a) i antocijana u obliku glukozida, acetil glukozida i kumaroil glukozida (b) u vinu Vranac-Srbija.

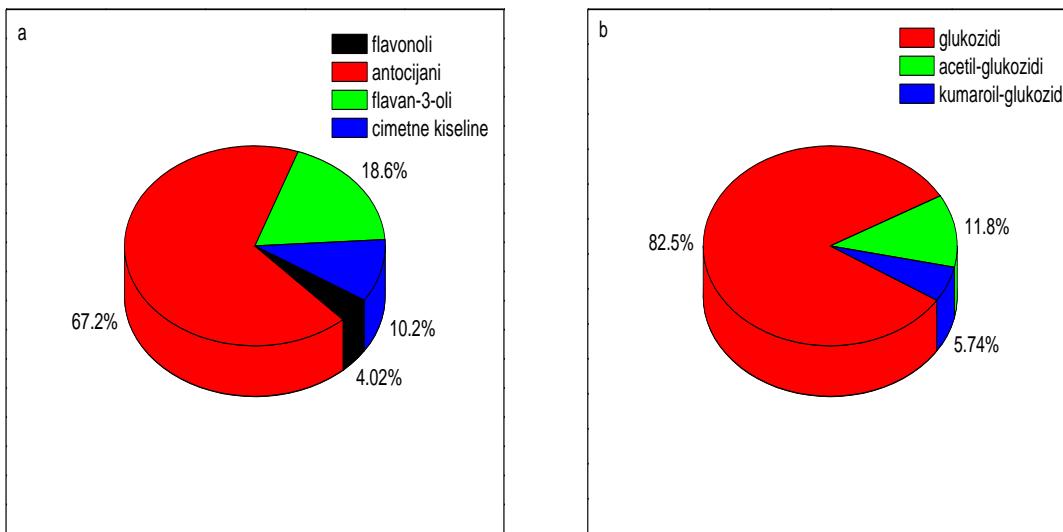
Tabela 4.14. Sadržaj (mg/L)¹ antocijana, flavonola, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina u crvenim vinima određen HPLC metodom.

vino	I	II	III
Zemlja	Srbija	Crna Gora	Makedonija
Naziv	Vranac	Grnogorski vranac	Makedo. crveno
Vrsta grožđa	Vranac	Vranac	Vranac, Pinot Noir
Godina	2009 alk. 11,5%	2009 alk. 11,5%	2009 alk. 11,5%
Antocijani			
Dp-3-glukozid	10,95±0,72	18,83±0,52	20,18±0,93
Cy-3-glukozid	3,25±0,41	4,88±0,11	2,85±0,06
Pt-3-glukozid	28,53±0,83	36,51±0,85	25,62±0,75
Pn-3-glukozid	29,05±0,62	36,54±0,78	30,89±0,99
Mv-3-glukozid	205,38±0,98	280,21±1,36	238,72±1,52
Vitisin A	10,58±0,18	9,01±0,82	8,37±0,23
Cy-3-acetyl-glukozid	1,93±0,09	2,26±0,11	2,58±0,11
Pt-3-acetyl-glukozid	5,07±0,11	4,69±0,09	3,26±0,18
Pn-3-acetyl-glukozid	2,85±0,08	2,38±0,07	3,02±0,22
Mv-3-acetyl-glukozid	32,73±0,76	45,46±0,78	36,58±0,48
Pt-3-kumaroil-glukozid	1,83±0,23	1,65±0,05	2,13±0,08
Pn-3-kumaroil-glukozid	1,12±0,12	1,38±0,04	1,49±0,06
Mv-3-kumaroil-glukozid	13,52±0,09	14,03±0,14	18,52±0,18
Ukupno ²	349,79±0,40	457,81±0,44	394,21±0,45
Flavonoli			
Miricetin-3-glukozid ³	2,05±0,31	1,85±0,38	2,18±0,28
Kvercetin-3-glukozid ⁴	2,95±0,28	3,15±0,09	4,79±0,25
Kvercetin-3-glukuronid ⁴	7,23±0,52	9,18±0,52	8,28±0,35
Miricetin	2,65±0,18	1,63±0,08	2,39±0,11
Kvercetin	3,25±0,25	4,25±0,11	5,96±0,09
Ukupno	18,13±0,31	20,06±0,24	23,60±0,22
Flavan-3-oli			
Katehin	62,05±0,92	55,38±0,85	76,78±0,62
Procijanidin-B ² ⁵	23,78±0,38	30,28±0,73	14,50±0,38
Epikatehin	19,53±0,72	39,70±0,28	14,74±0,18
Ukupno	105,36±0,67	125,36±0,62	109,02±0,39
Hidroksicimetne kiseline			
t-kaftarna ⁶	27,34±0,53	15,34±0,62	32,52±0,57
GRP ⁶	2,87±0,28	4,18±0,18	4,69±0,32
t-kutarna ⁷	17,56±0,18	2,45±0,18	9,52±0,25
kafena	3,12±0,20	6,95±0,22	1,03±0,09
p-kumarina	3,96±0,11	2,81±0,11	1,52±0,07
Ferulna	0,98±0,09	3,62±0,14	10,43±0,58
Ukupno	55,83±0,23	35,35±0,24	59,71±0,31

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg malvidin-3-glukozid ekvivalenta /L vina; ³mg miricetin ekvivalenta /L vina; ⁴ mg kvercetin ekvivalenta /L vina; ⁵mg katehin ekvivalenta /L vina; ⁶mg ekvivalenta kafene kiseline/L vina; ⁷mg ekvivalenta p-kumarne kiseline/L vina.



Slika 4.16. Zastupljenost pojedinih klasa jedinjenja (a) i antocijana u obliku glukozida, acetil glukozida i kumaroil glukozida (b) u vinu Vranac-Crna Gora.



Slika 4.17. Zastupljenost pojedinih klasa jedinjenja (a) i antocijana u obliku glukozida, acetil glukozida i kumaroil glukozida (b) u vinu Makedonsko crveno-Makedonija.

4.1.3. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti belih vina

U tabeli 4.15 prikazan je naziv, sorte grožđa i područje proizvodnje ispitivanih belih vina.

Tabela 4.15. Naziv, sorte grožđa i područje proizvodnje ispitivanih belih vina.

Vino	Naziv(godina)	Sorte grožđa	Područje
1	Građevina (2007)	Italijanski rizling	
2	Smederevka (2007)	Smederevka	Zapadno-
3	Chardonnay (2007)	Chardonnay	moravski
4	Chardonnay-Terra Lazarica (2007)	Chardonnay	region
5	Međaš beli (2007)	Chard., Sauvig., M. Otonel	
6	Župski rizling (2003)	Italij.rizling	
7	Car Konstantin-Semillon (2003)	Semillon	
8	Traminac (2004)	Traminac	Banatski
9	Banatski rizling (2007)	Ita.rizling, smederevka	regiom
10	Muscat Otonel (2007)	Muscat Otonel	

Za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti belih vina korišćene su spektrofotometrijska i HPLC metoda.

4.1.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti belih vina

U tabeli 4.16. su prikazani rezultati spektrofotometrijskih određivanja *ukupnih fenola* u 10 ispitivanih belih vina. Kako sastav belih vina dosta zavisi i od vremena čuvanja u boci, to će se za dalju analizu u diskusiji uzimati u obzir vina koja su flaširana u istoj godini. Od svih proizvedenih vina u 2007 godini, Međaš beli i Terra-Lazarica Chardonnay imaju najveći sadržaj fenolnih jedinjenja (420,6 i 358,0 mg GAE/L), potom slede Banatski Rizling, Graševina, Chardonnay, Muscat Otonel i na kraju Smederevka. Količina ukupnih fenola u vinu Međaš beli je signifikantno veća i različita u odnosu na količine fenola u ostalim

ispitivanim vrstama belih vina. Dobijene vrednosti sadržaja ukupnih fenola u ispitivanim belim vinima proizvedenih u Srbiji su uporedive sa literaturnim podacima datim u tabeli 4.17.

Tabela 4.16. Sadržaj ukupnih fenola (TP) i flavonoida (TF) ispitivanih belih vina i njihov odnos.

Vino	Naziv	TP ¹ (mg GAE/L)	TF ² (mgCE/L)	TF/TP
1	Građevina	268,8±8,0 ³ b ⁴	46,50±1,16 a	0,17
2	Smederevka	238,3±6,6 a	45,30±1,29 a	0,19
3	Chardonnay	253,8±7,8 ab	46,29±1,43 a	0,18
4	Chardonnay-T.L.	358,0±10,2 dc	65,00±1,86 c	0,18
5	Međaš beli	420,6±12,0 e	81,32±2,36 d	0,19
6	Župski rizling	380,0±12,1 d	63,99±1,92 c	0,17
7	Semillon	261,5±7,8 ab	48,25±1,38 a	0,18
8	Traminac	270,2±7,9 b	50,02±1,55 a	0,18
9	Banatski rizling	330,2±9,4 c	56,29±1,66 b	0,17
10	Muscat Otonel	252,0±7,5 ab	47,88±1,35 a	0,18

¹mg ekvivalenta galne kiseline/L vina; ²mg katehin ekvivalenta/L vina; ³srednja vrednost ± SD (n=3); ⁴brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržja *ukupnih flavonoida* u belim vinima, prikazani su takođe u tabeli 4.16. Sadržaj ukupnih flavonoida u belim vinima kreće se od 45,30 do 81,32 mg CE/L, pri čemu je i u ovom slučaju vino Međaš beli bilo najbogatije flavonoidima, dok je vino Smederevka imalo najmanji sadržaj. Statistički parametri ukazuju da se značajno razlikuju u pogledu sadržaja flavonoida vina Međaš beli, Terra-Lazarica Chardonnay, Banatski Rizling i Župski rizling od ostalih belih vina. Međutim, razlike u pogledu sadržaja flavonoida ne postoje između vina Graševina, Smederevka, Chardonnay, Car Konstantin-Semijon, Traminac i Muscat Otonel. Velki broj istraživanja ukazuju da je sadržaj i sastav flavonoida genetski uslovljen, ali da i uslovi gajenja i kasnija tretiranja grožđa pri proizvodnji vina u značajnoj meri utiču na sadržaj flavonoida, što se pokazalo i u ovom slučaju. Udeo flavonoida u odnosu na sadržaj ukupnih fenola belih vina kreće se od 0,17 do 0,19, i znatno je manji u odnosu na crvena vina (0,63-0,73, tabela 4.10). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora (*Katalinić i sar., 2004*).

Tabela 4.17. Literaturni podaci.

Zemlja	Ukupni fenoli (mg GAE/L)	Literatura
Hrvatska	161-431 (n=15)	<i>Katalinic i sar., 2008</i>
Hrvatska	301-402 (n=4)	<i>Katalinic i sar., 2004</i>
Hrvatska	231-273 (n=2)	<i>Budic-Leto i sar., 2002</i>
Hrvatska	191-652 (n=3)	<i>Rastija i sar., 2009</i>
Grčka	162-286 (n=12)	<i>Salacha i sar., 2008</i>
Grčka	213-277 (n=5)	<i>Roussis i sar., 2008</i>
Španija	89-407 (n=17)	<i>Fernandez-Pachon i sar., 2004</i>
Španija	178-293 (n=5)	<i>Sanchez-Moreno i sar., 1999</i>
Italija	170-260 (n=16)	<i>Stevanato i sar., 2004</i>
Italija	96-146 (n=3)	<i>Simonetti i sar., 1997</i>
Češka Republika	103-125 (n=7)	<i>Stratil i sar., 2008</i>
Južna Afrika	242-292 (n=4)	<i>De Beer i sar., 2003</i>

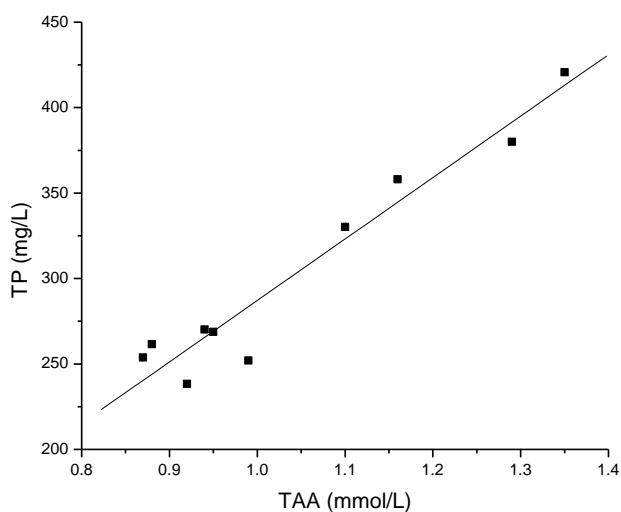
Kao što se vidi iz tebele 4.18 analiza *radikal „skevindžer“ kapaciteta* i *antioksidativne aktivnosti*, urađena korišćenjem DPPH radikala upućuje da se procenat RSC različitim belih vina kreće od 12,73 do 19,05%, odnosno TAA od 0,87 do 1,35 mmol TE/L, i da je najveća kod vina Medaš beli a najmanja kod belog vina Chaedonnay. Uvažavajući rezultate Duncan-ovog testa višestrukih intervala, jasno se uočavaju razlike u ukupnoj antnioksidativnoj aktivnosti između ispitivanih belih vina. *Katalinić i sar. (2004)* su odredili da se RSC hrvatskih belih vina kreće od 10,30% za Traminac do 16,16% za belo vino Maraština. *Fernandez-Pachon i sar. (2004)* su za 17 španskih belih vina odredili da se antioksidativna aktivnost kreće od 0,30 do 2,68 mmol TE/L, dok su *Höner i sar. (2002)* za 16 nemačkih belih vina odredili da se antioksidativna aktivnost kreće od 0,2 do 1,9 mmol TE/L, što je u saglasnosti sa našim rezultatima (0,87 – 1,35 mmol TE/L).

Tabela 4.18. Radikal „skevendžer“ kapacitet (RSC) i ukupna antioksidativna aktivnost (TAA) ispitivanih belih vina.

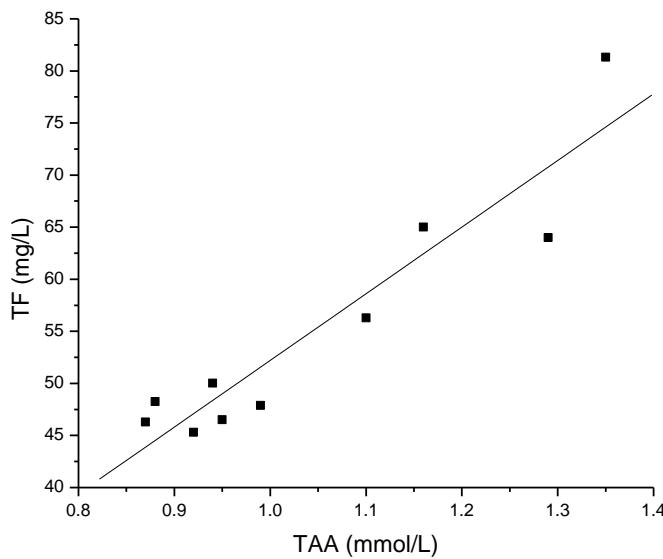
Vino	Naziv	RSC (%)	TAA ¹ (mmol TE/L)
1	Građevina	14,00	0,95±0,02 ² ab ³
2	Smederevka	13,50	0,92±0,03 a
3	Chardonnay	12,73	0,87±0,03 a
4	Chardonnay-T.L.	16,30	1,16±0,05 cd
5	Međaš beli	19,05	1,35±0,06 e
6	Župski rizling	18,64	1,29±0,03 de
7	Semillon	12,83	0,88±0,03 a
8	Traminac	13,82	0,94±0,05 a
9	Banatski rizling	16,04	1,10±0,04 bc
10	Muscat Otonel	14,95	0,99±0,06 ab

¹mmol troloks ekvivalenta/L vina; ²srednja vrednost ± SD (n=3); ³brojevi označeni različitim slovima u koloni se značajno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Analza korelacije između koncentracije ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ispitivanih belih vina pokazuje da je koeficijent korelacije 0,938 (slika 4.18), dok je koeficijent korelacije između koncentracije ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti takođe visok i iznosi 0,938 (slika 4.19), što je u skladu sa rezultatima drugih autora (*Höner i sar., 2002*).



Slika 4.18. Grafik korelacije sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih belih vina.



Slika 4.19. Grafik korelacije sadržaja ukupnih flavonoida i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih belih vina.

4.1.3.2. HPLC određivanje hidroksicimetnih kiselina u belom vinu

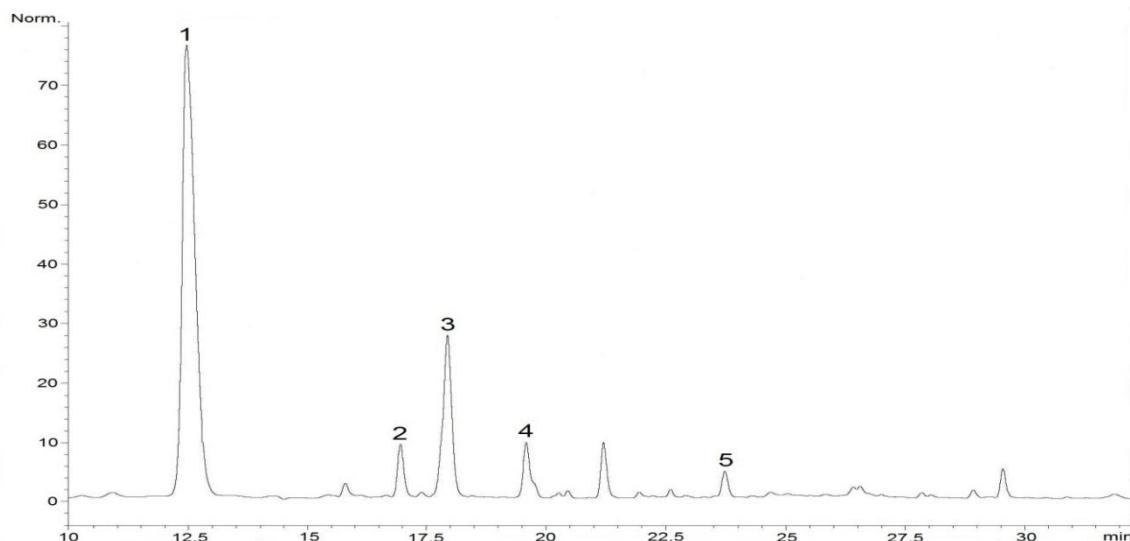
Za bela vina je karakteristično prisustvo hidroksicimetnih kiselina. Njihov sadržaj je određen HPLC metodom. Hidroksicimetne kiseline imaju apsorpcionu traku na $\lambda=320$ nm. Na slici 4.20 je dat hromatogram za belo vino Banatski rizling.

U ispitivanim belim vinima utvrđeno je i kvantifikovano prisustvo t-kaftarne kiselne, GRP, t-kutarne, kafene i p-kumarne kiseline. U poređenju sa ostalim kvantifikovanim jedinjenjima, svojim sadržajem se ističe t-kaftarna kiselina (tabela 4.19), sledi t-kutarna, kafena i na kraju p-kumarna. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. *Kallithraka i sar. (2009b)* su u 11 belih grčkih vina odredili da sadrže: kafenu kiselinu (0,55 mg/L), p-kumarnu (0,18), kaftarnu (29,62), kutarnu (4,36) i ferulnu (0,32) kiselinu.

Tabela 4.19. Sadržaj (mg/L)¹ hidroksicimetnih kiselina u belim vinima

Vino	Kafena	p-kumarna	t-kaftarna	t-kutarna	GRP ²
	kiselina	kiselina	kiselina ²	kiselina ³	
Chardonnay	1,57±0,18	nd	14,71±1,05	2,66±0,74	1,13±0,15
Bant.rizling	3,39±0,65	0,62±0,09	43,53±1,51	5,74±0,76	2,39±0,35
Graševina	2,27±0,82	0,71±0,08	21,96±1,20	3,71±0,90	nd
Traminac	7,70±0,98	2,02±0,65	7,56±0,85	1,36±0,53	1,91±0,48
Semillon	3,88±0,80	1,72±0,06	nd	1,21±0,22	4,14±0,52

¹srednja vrednost ± SD (n=3)., ²mg ekvivalenta kafene kiseline/L vina., ³mg ekvivalenta p-kumarne kiseline/L vina.



Slika 4.20. HPLC hromatogram (320 nm) hidroksicimetnih kiselina u belom vinu Banatski rizling: t-kaftarna kiselina(1); GRP (2); t- kutarna kiselina(3); kafena kiselina (4) i p-kumarna kiselina (5).

4.1.4. Određivanje sadržaja polifenola, metala i antioksidativne aktivnosti višnje

Za određivanje sadržaja polifenola, metalnih jona i antioksidativne aktivnosti korišćene su tri sorte višanja: Marela, Cigančica i Oblačinska višnja. Analiza je vršena primenom spektrofotometrijske, HPLC i ICP-OES metoda.

4.1.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti višnje

U tabeli 4.20 su prikazani rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana i antioksidativne aktivnosti ekstrakata višnji (dobijenih po proceduri datoj u delu 3.3.1.1) za tri sezone 2008., 2009. i 2010. Dobijeni rezultati preračunati su na masu polaznog uzorka.

Tabela 4.20. Sadržaj ukupnih fenola(TP), ukupnih flavonoida (TF),ukupnih antocijana (TA) i ukupne antioksidativne aktivnosti (TAA) ispitivanih sorti višnjanja.

	Sorta	2008	2009	2010
TP ¹	Marela	72,05±0,45 ⁵ c ⁶ ,c ⁷	87,83±1,82 c,a	78,98±1,70 c,b
mg GAE/100g	Oblačinska	140,76±3,04 a,b	159,03±3,97 a,a	146,12±2,80 a,b
sv.v.	Cigančica	91,02±0,52 b,c	122,10±3,60 b,a	112,83±4,62 b,b
TF ²	Marela	65,51±1,64 b,a	65,99±2,86 c,a	64,38±2,15 c,a
mg CE/100g	Oblačinska	75,58±0,79 a,c	124,51±0,82 a,a	110,87±6,55 a,b
sv.v.	Cigančica	75,86±1,13 a,b	87,82±1,84 b,a	93,70±5,40 b,a
TAA ³	Marela	39,02±1,28 b,b	48,24±1,67 b,a	45,24±1,11 c,a
mgC3GE/100g	Oblačinska	54,14±2,06 a,c	64,43±0,57 a,b	81,55±1,78 a,a
sv.v.	Cigančica	55,76±1,24 a,c	62,30±0,98 a,b	66,72±1,55 b,a
TAC ⁴	Marela	3,12±0,08 b,ab	3,36±0,11 b,a	2,87±0,10 b,b
mmol TE/100g	Oblačinska	3,47±0,07 a,a	3,80±0,18 ac,a	3,40±0,04 a,a
sv.v.	Cigančica	3,49±0,13 a,a	3,51±0,08 cb,a	3,00±0,16 b,b

sv.v.-sveže voće, ¹mg ekvivalenta galne kiseline/100 g svežeg voća; ²mg katehin ekvivalenta/100 g svežeg voća; ³mg cijanidin-3-glukozid ekvivalenta/100 g svežeg voća; ⁴mmol troloks ekvivalenta/100 g svežeg voća; ⁵srednja vrednost ± SD (n=3); ⁶brojevi označeni različitim slovima u koloni (za jednu grupu jedinjenja) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05); ⁷brojevi označeni različitim slovima u redu (za jednu grupu jedinjenja i jednu sortu višnje u različitim godinama branja) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da se sadržaj *ukupnih fenola* u uzorcima višnji menja u zavisnosti od vrste višnje i godine branja i kreće se u granicama od 87,83 mg GAE/100g svežeg voća (sv.v.) u višnji Marela do 159,03 mg GAE/100g sv.v. u Oblačinskoj višnji za 2009. godinu, kada su zabeležene najveće vrednosti.

Kao što se vidi iz tabele 4.20. isti je slučaj i kod *ukupnih flavonoida*, pa se može reći da je sadržaj flavonoida u uzorku Oblačinske višnje veća u odnosu na preostale vrste višnji. Naime, najveći sadržaj ukupnih flavonoida nađena je u Oblačinskoj višnji (124,51 mg CE/100 g sv.v., za 2009.godinu) što odgovara i najvećem sadržaju polifenola u ovoj vrsti višnje.

Korišćenjem Duncan-ovog testa višestrukih intervala (tabela 4.20) jasno se uočavaju razlike u sadržaju ukupnih fenola i flavonoida u ispitivanim vrstama višnje tokom iste sezone, odnosno jedne sorte višnje u tri različite sezone. Poznato je da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiče genotip, mesto i tehnika gajenja, kao i razlike u zrelosti voća. Takođe spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature, prisustvo hranljivih materija u zemljištu mogu uticati na sastav polifenolnih jedinjenja. Rezultati ispitivanja sadržaja ukupnih fenola u višnji gajenoj u Srbiji uglavnom su slični sa podacima koji se mogu naći u referentnoj literaturi. Sadržaj polifenola u hrvatskoj višnji Maraska i Cigančica iznose 78,0 i 144,7 mg GAE/100g sv.v. (*Dragović-Uzelac i sar., 2007*), dok se u američkim ova vrednost kreće od 92,1 do 312,4 mg GAE/100g sv.v. (*Kim i sar., 2005*).

Što se tiče analize koncentracije *monomernih antocijana* po pH diferencijalnoj metodi (opisanoj u delu 3.3.2.3), takođe se primećuje da Oblačinska višnja ima veće vrednosti koncentracije u odnosu na ostale dve vrste višnji. Sadržaj monomernih antocijana se kreće od 45,24 do 81,55 mg C3GE/100g sv.v., pri čemu je ekstrakt Marele bio najsirošniji antocijanima. *Kim i sar. (2005)*, ispitujući sadržaj antocijana u četiri sorte višanja pokazali su da se sadržaj antocijana u njima kreće u intervalu od 49,1 do 109,2 C3GE/100g sv.v.

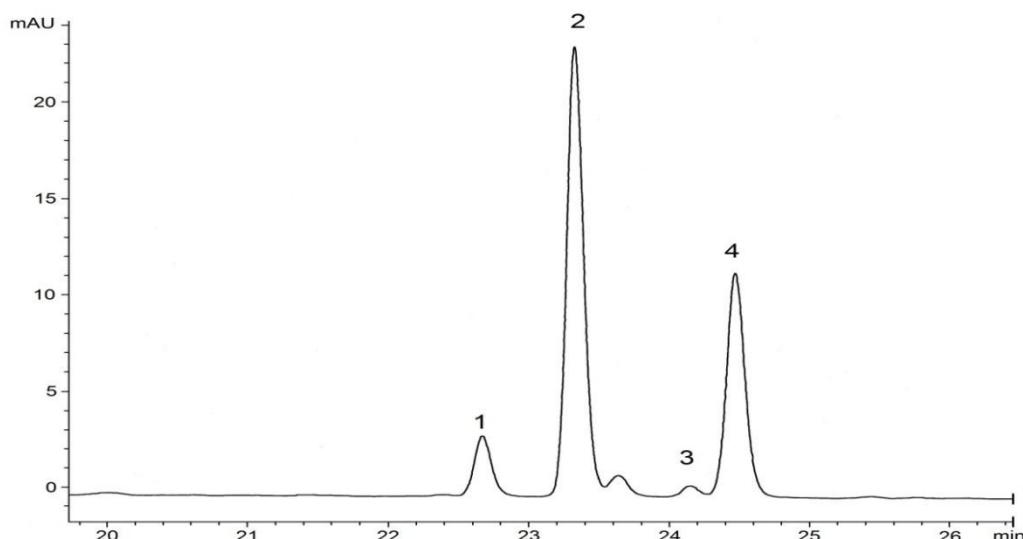
Metoda na DPPH⁺ radikale je primenjena za određivanje *antioksidativne aktivnosti* ekstrakata ispitivanih vrsta višnji. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 4.20. Najveću antioksidativnu vrednost pokazuje Oblačinska višnja, sledi višnja Cigančica i na kraju višnja Marela. Vrste koje pokazuju znatnu antioksidativnu aktivnost imaju i veliki sadržaj ukupnih fenola. Uvažavajući rezultate Duncan-ovog testa višestrukih intervala, jasno se uočavaju značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti između Oblačinske višnje i drugih ispitivanih vrsta. Upoređenja radi, navećemo samo podatak da su *Dragović-Uzelac i sar. (2007)* našli da Maraska i Cigančica imaju vrednosti za TAA od 4,3 i 3,2 mmol TE/100g sv.v.

4.1.4.2. HPLC određivanje antocijana i hidroksicimetnih kiselina u višnji

HPLC metoda je primenjena za kvalitativno i kvantitativno određivanje antocijana i hidroksicimetnih kiselina. Za ovo određivanje korišćena je metoda direktnog injektovanja uzorka ekstrakata višnji. Na slici 4.21 prikazan je HPLC hromatogram ekstrakta Oblačinske višnje (berba 2010.).

Antocijani prisutni u uzorcima višnji su identifikovani poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za cijanidin-3-glukozida i literarnih podataka (*Blano i sar.*, 2004).

U ekstraktima višnji određeno je prisustvo i kvantifikovano četiri antocijanina: (1) cijanidin-3-soforozid, (2) cijanidin-3-glukozil-rutinozid, (3) cijanidin-3-glukozid, (4) cijanidin-3-rutinozid, što je u saglasnosti sa rezultatima *Blando i sar.* (2004). Međutim, neki autori su pored derivata cijanidina našli još i peonidin-3-glukozid (*Kirakosyan i sar.*, 2009), peonidin-3-rutinosid (*Kim i sar.*, 2005), odnosno pelargonidin-3-glukozid i pelargonidin-3-rutinozid (*Pedesić i sar.*, 2010). Sadržaj identifikovanih antocijana određen HPLC metodom prikazan je u tabeli 4.36. Sadržaj monomernih antocijana u višnjama se kreće od maksimalne vrednosti 79,31 mg/100 g sv.v., koliko iznosi za Oblačinsku višnju, do 40,03 mg/100 g sv.v. za višnju Marelu. Iz tabele se može uočiti da u svim uzorcima višnji, najzastupljeniji antocijanin je cijanidin-3-glukozil-rutinozid. Sadržaj antocijana u višnjama, određen od strane gore pomenutih autora kretao se od 45,57 do 98,64 mg/100g sv.v., pri čemu je u svim slučajevima cijanidin-3-glukozil-rutinozid bio najzastupljeniji antocijan.



Slika 4.21. HPLC hromatogram (520 nm) antocijanina u ekstraktu Oblačinske višnje : (1) cijanidin-3-soforozid, (2) cijanidin-3-glukozil-rutinozid, (3) cijanidin-3-glukozid, (4) cijanidin-3-rutinozid.

Na slici 4.22 je dat hromatogram za ekstrakt Oblačinske višnje (berba 2010) snimljen na 320 nm. HPLC hromatogram prikazuje hidroksicimetne kiseline prisutne u uzorcima višnji. Ove kiseline su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom halogenske kiseline, p-kumarne i ferulne kiseline (Prilog, slike 9.11-9.14).

Rezultati određivanja hidroksicimetnih kiselina HPLC metodom u ispitivanim vrstama višnje prikazani su u tabeli 4.21. Rezultati u tabeli pokazuju da najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina ima Oblačinska višnja (17,23 mg/100 g sv.v.), sledi Marela (13,62 mg/100 g sv.v.) i na kraju Cigančica (11,82 mg/100 g sv.v.), pri čemu je neohlorogenska kiselina prisutna u najvećoj količini (9,37-12,64 mg/100g sv.v., odnosno 73,36-79,43%). Kim i sar. (2005) su odredili sadržaj hidroksicimetnih kiselina u 4 sorte višnji od 16,57 do 33,63 mg/100g sv.v., a procenat učešća neohlorogenske kiseline kretao se od 40,67 do 89,58%.

Tabela 4.21. Sadržaj (mg/100g svžeg voća) antocijana i hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima višnjanja.

	Marela	Oblačinska	Cigančica
Antocijan¹			
Cy-3-soforozid	4,93±0,22 ⁴	2,96±0,18	8,13±0,36
Cy-3-glukozil-rutinozid	24,73±0,72	62,09±1,95	38,42±1,35
Cy-3-glukozid	0,88±0,09	1,31±0,10	1,24±0,11
Cy-3-rutinozid	9,49±0,52	12,95±0,78	17,13±1,02
Hidroksicimetne kiseline			
neohlorogenska kiselina ²	10,51±0,83	12,64±0,65	9,37±0,88
derivat p-kumarne kis. ³	1,05±0,12	1,73±0,08	1,54±0,20
p-kumarna kiselina	1,22±0,09	2,08±0,05	0,58±0,11
ferulna kiselina	0,84±0,05	0,78±0,02	0,33±0,02

¹mg cijanidin-3-glukozid ekvivalenta/100 g svežeg voća; ²mg ekvivalenta hlorogenske kiseline/100 g svežeg voća; ³mg ekvivalenta p-kumarne kiseline/100 g svežeg voća; ⁴srednja vrednost ± SD (n=3).

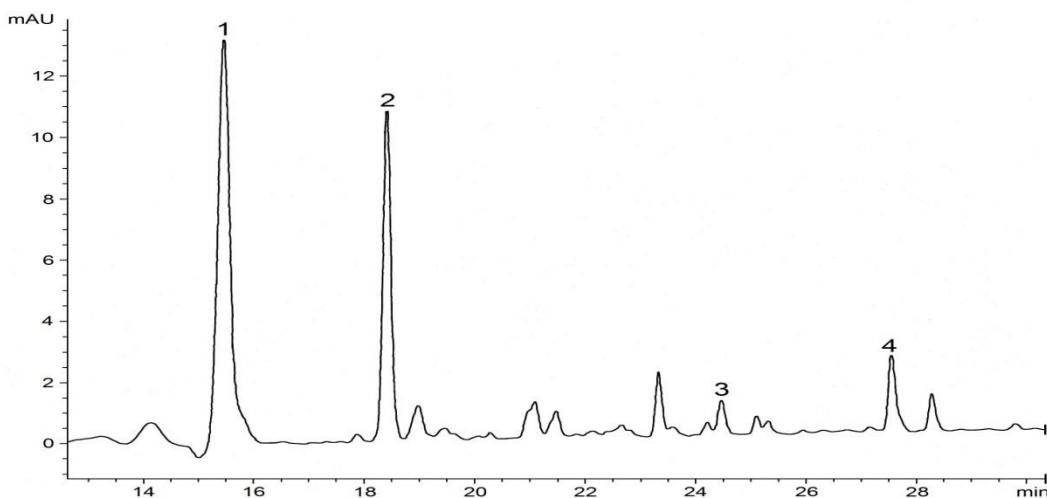
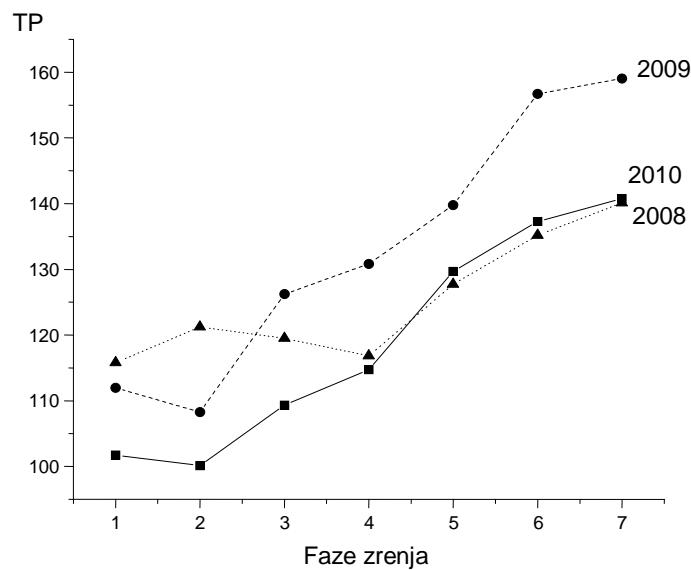


Fig. 4.22. HPLC hromatogram (320 nm) hidroksicimetnih kiselina u ekstraktu Oblačinske višnje: (1) neohlorogenska kiselina, (2) derivat p-kumarne kiseline, (3) p-kumarna kiselina, (4) ferulna kiselina.

4.1.4.3. Promene sadržaja fenolnih jedinjenja u višnji tokom zrenja

Na slici 4.23. prikazane su promene ukupnih fenola Oblačinske višnje tokom zrenja za uzorke ove vrste višnje branih u 7 različitih faza zrenja tokom 2008, 2009 i 2010 godine. Uočava se povećanje sadržaja ukupnih fenola tokom zrenja. Sa slike se takođe može uočiti da se tokom prvih faza branja može desiti da dođe do opadanja ukupnog sadržaja fenola. Fenoli su veoma kompleksna jedinjenja čija se biosinteza odvija tokom celog perioda zrenja voća, pri čemu dolazi do degradacije jednih i sinteze drugih jedinjenja što uslovljava promene u sastavu i količini fenolnih jedinjenja. Povećanje sadržaja polifenola tokom zrenja uočili su i drugi autori (*Kallay i sar., 2008; Pedesić i sar., 2007*).



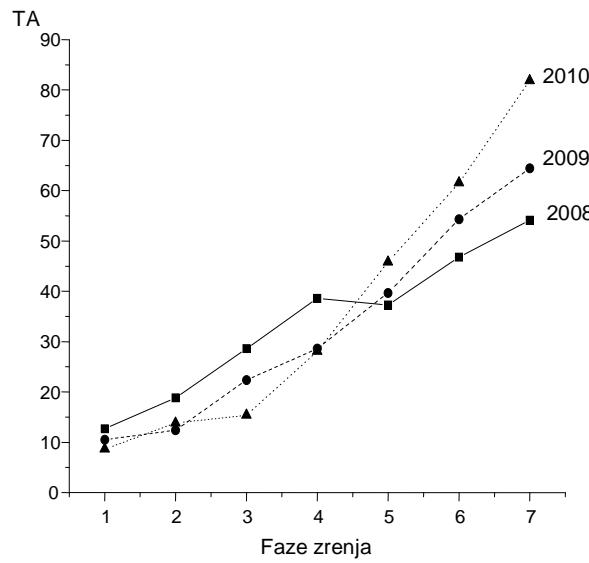
Slika 4.23. Promene sadržaja ukupnih fenola tokom zrenja Oblačinske višnje u ▲: 2008; ●: 2009; i ■: 2010 godini.

Antocijani spadaju u one fenolne komponente koji se stalno stavaraju tokom zrenja, pa se njihova količina konstantno povećava, pri čemu je zabeleženo naglo povećanje u kasnijim fazama zrenja. Pri tome su zabeležene i izvesne anomalije u pogledu promena sadržaja antocijanina u višnji (3 i 4 faza branja, slika 4.24). Položaj voća na stablu može biti uzrok ove anomalije. Voće na stablu izloženo suncu brže sazревa od voća unutar krošnje stabla. Pored toga i klimatski uslovi i period branja znatno utiču na sadržaj antocijana u voću. Najveće naglo povećanje sadržaja ukupnih antocijanina je zabeleženo u 2010. godini, što se objašnjava najvećom prosečnom temperaturom u drugoj dekadi juna 2010. godine (tabela 4.22), odnosno, najpovoljnijim uslovima za biosintezu antocijana.

Tabela 4.22. Prosečne temperature po dekadama u aprilu, maju i junu 2008, 2009 i 2010.

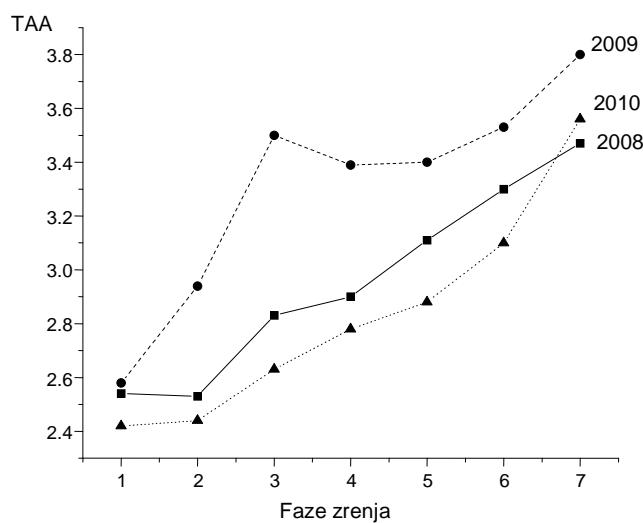
Sezona	April		Maj		Jun	
	I dekada	II dekada	I dekada	II dekada	I dekada	II dekada
2008	10,4	13,7	12,8	17,3	18,5	20,7
2009	12,9	12,0	17,6	14,3	20,7	21,6
2010	12,9	12,0	17,1	13,9	19,0	24,5

Podaci Meteorološke stanice, Knjaževac



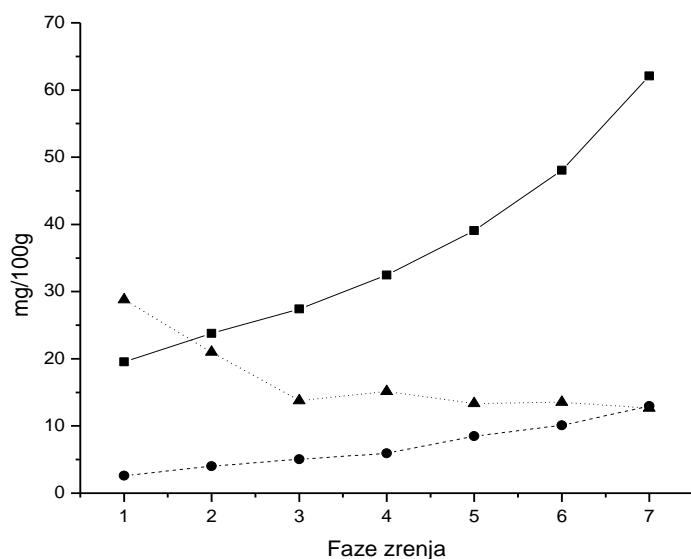
Slika 4.24. Promene sadržaja ukupnih antocijanina tokom zrenja Oblačinske višnje u ■: 2008; ●: 2009; i ▲: 2010 godini.

Generalno antioksidativna aktivnost raste tokom zrenja (slika 4.25), međutim, između antioksidativne aktivnosti i ukupnih fenola, kao i ukupnih antocijanina ne postoji direktna korelacija, što se može uočiti upoređenjem slika 4.23,4.24 i 4.25. Tokom zrenja različiti fenoli se sintetizuju, a oni imaju različite antioksidativne aktivnosti, pa samim tim intenzitet promene antioksidativne aktivnosti neće uvek pratiti intenzitet promene sadržaja ukupnih fenola.



slika 4.25. Promene antioksidativne aktivnosti tokom zrenja Oblačinske višnje u ■: 2008; ●: 2009; i ▲: 2010 godini.

HPLC metoda je iskorišćena i za ispitivanje sezonskih promena sadržaja pojedinačnih antocijana i hidroksicimetnih kiselina tokom zrenja. Sadržaj cijanidin-3-glukozil-rutinozida i cijanidin-3-rutinozida, kao najzastupljenijih antocijana se stalno povećava tokom zrenja (slika 4.26), pri tome se sadržaj prvog antocijanina povećao za 3,2 puta, a drugog za 4,9 puta. *Pedesić i sar.. (2010)* su u slučaju višnje Maraske gajene u regionu Zadra našli da se sadržaj cijanidin-3-glukozil-rutinozida, u toku 4 faze zrenja povećao samo 1,05 puta a cijanidin-3-rutinozida 3,3 puta, dok se u istoj sorti višnje gajene u regionu Splita, sadržaj cijanidin-3-glukozil-rutinozida povećao 4,8 a cijanidin-3-rutinozida 1,6 puta. Naši i rezultati drugih autora potvrđuju da je sastav antocijana bitno uslovljen klimatskim uslovima područja na kome je gajeno voće i vremenom branja. Međutim, sadržaj neohlorogenske kiseline se smanjuje tokom zrenja. Ovaj podatak je i u ovom slučaju u skladu sa literaturnim podacima. *Häkkinen (2000)* je u svojoj doktorskoj disertaciji naveo podatak da je koncentracija hidroksicimetnih kiselina velika u zelenom voću, da naglo opada a zatim znatno sporije tokom zrenja i skladištenja voća.



Slika 4.26. Promene sadržaja cijanidin-3-glikozil rutinozida (■), cijanidin-3-rutinozida (●) i neohlorogenske kiseline (▲) tokom zrenja.

4.1.4.4. ICP-OES određivanje metala u višnji

U plodovima voća ima različitih minerala koji se pretežno nalaze u obliku soli organskih kiselina. Ukupna količina mineralnih materija u voću kreće se od 0,15 do 0,80%, a višnja sadrži oko 0,50% mineralnih materija.

U tabeli 4.6. prikazane su odabrane talasne dužine za svaki element, koeficijent korelacije i granice detekcije c_L i c_Q za određivane elemente.

Elementi koji su identifikovani i kvantifikovani u tri sorte višnje, odnosno u Oblačinskoj višnji, Mareli i Cigančici, mogu se podeliti na makroelemente (tabela 4.23) i mikroelemente (tabela 4.24). Od makroelemenata kalijum je najzastupljeniji u svim uzorcima, za njim slede natrijum i kalcijum, dok se magnezijum nalazi u manjoj količini. Količine kalijuma i kalcijuma direktno utiču na kvalitet i čuvanje plodova. Najveća vrednost kalijuma je pronađena u Oblačinskoj višnji. Ispitivane sorte višnji ne pokazuju signifikantne razlike u pogledu sadržaja kalcijuma i magnezijuma. U našim višnjama pronađene su manje količine K, Ca i Mg (124,20; 9,14 i 7,90 mg/100g sv.v.) a nešto veće količine Na (10,75) u odnosu na mađarske (227,09; 48,46; 18,70 i 6,25 mg/100g sv.v.)(Papp i sar., 2008).

Tabela 4.23. Sadržaj maktoelemenata (mg/100g svežeg voća)¹ u uzorcima višnje.

Metal	Sorta višnje	Količina u uzorku	Dodato	određeno	Rikaveri
				(%)	
Na	Ob	11,31 ± 0,26 ac ²	5,00	16,90± 0,18 ac	105
	Ma	8,48 ± 0,14 b	5,00	13,20± 0,12 b	97
	Ci	12,45 ± 0,35 c	5,00	17,10± 0,28 c	97
K	Ob	156,96 ± 3,07 a	50,00	210,50± 4,10 a	102
	Ma	117,13 ± 1,69 b	50,00	160,20±1,20 b	94
	Ci	98,53 ± 1,48 c	50,00	141,62± 1,52 c	93
Ca	Ob	9,14 ± 0,66 a	5,00	13,92± 0,58 a	98
	Ma	9,12 ± 0,19 a	5,00	13,80± 0,22 a	96
	Ci	9,16 ± 0,26 a	5,00	13,74± 0,18 a	95
Mg	Ob	7,62 ± 0,12 a	5,00	13,12± 0,16 a	107
	Ma	8,16 ± 0,22 a	5,00	13,32± 0,28 a	102
	Ci	7,93 ± 0,27 a	5,00	12,74± 0,22 a	98

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05). Ob-Oblačinska, Ma-Marela, Ci-Cigančica.

Tabela 4.24. Sadržaj mikroelemenata ($\mu\text{g}/100 \text{ g svežeg voća}$)¹ u uzorcima višnje.

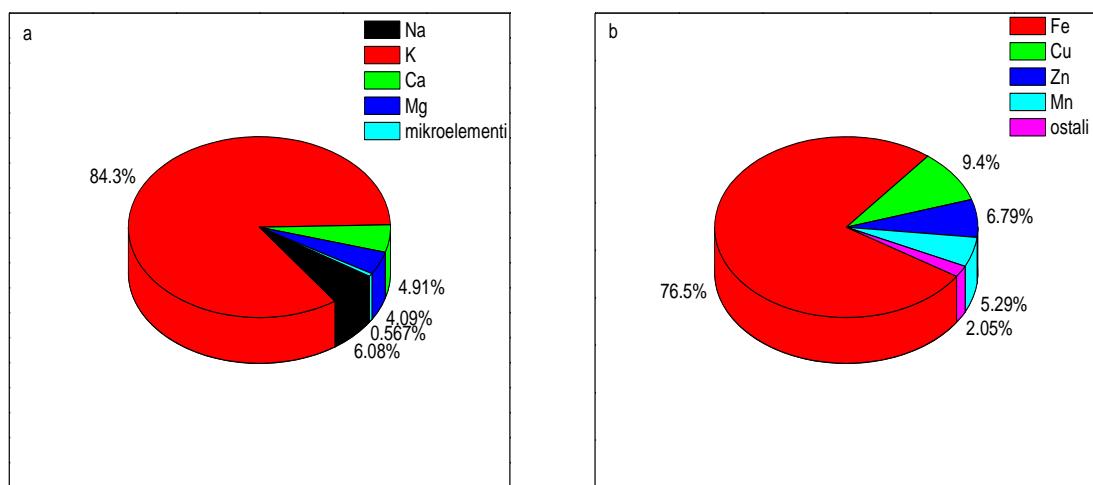
Metal	Sorta višnje	Količina u uzorku	Dodata	Određeno	Rikaveri (%)
Fe	Ob	807,99 \pm 3,52ab ²	300	1150,22 \pm 3,22ab	105
	Ma	848,26 \pm 9,63b	300	1198,76 \pm 9,08b	106
	Ci	630,66 \pm 4,28c	300	940,88 \pm 3,98c	102
Cu	Ob	99,29 \pm 1,23a	30	124,22 \pm 1,08a	95
	Ma	68,09 \pm 3,14b	30	97,10 \pm 2,86b	98
	Ci	55,56 \pm 4,20c	30	84,66 \pm 3,80c	98
Zn	Ob	71,69 \pm 1,20a	30	103,06 \pm 1,08a	102
	Ma	53,46 \pm 2,35b	30	85,66 \pm 1,88b	104
	Ci	65,09 \pm 2,63c	30	96,50 \pm 2,22c	102
Mn	Ob	55,86 \pm 1,82a	30	84,22 \pm 2,02a	97
	Ma	42,47 \pm 2,36b	30	73,44 \pm 2,56b	102
	Ci	46,19 \pm 1,28b	30	77,20 \pm 1,68b	102
Cr	Ob	10,59 \pm 0,32a	5	14,88 \pm 0,22a	93
	Ma	6,86 \pm 0,17b	5	11,48 \pm 0,24b	94
	Ci	6,09 \pm 0,09b	5	10,98 \pm 0,19b	98
Cd	Ob	0,09 \pm 0,01a	1	1,10 \pm 0,03a	111
	Ma	0,06 \pm 0,00b	1	1,07 \pm 0,05b	117
	Ci	0,39 \pm 0,02c	1	1,42 \pm 0,03c	108
Co	Ob	1,43 \pm 0,03a	3	4,34 \pm 0,04a	94
	Ma	1,23 \pm 0,02b	3	4,22 \pm 0,08b	99
	Ci	6,96 \pm 0,05c	3	10,08 \pm 0,12c	102
Pb	Ob	3,46 \pm 0,28a	3	6,58 \pm 0,22a	103
	Ma	6,93 \pm 0,62b	3	10,08 \pm 0,58b	102
	Ci	7,19 \pm 0,42b	3	10,48 \pm 0,48b	104
Ni	Ob	6,06 \pm 0,33a	3	8,88 \pm 0,28a	97
	Ma	2,93 \pm 0,21b	3	6,12 \pm 0,22b	106
	Ci	6,06 \pm 0,41a	3	9,40 \pm 0,28b	106

¹srednja vrednost \pm SD (n=3); ²brojevi označeni različitim slovima u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05). Ob-Oblačinska, Ma-Marela, Ci-Cigančica.

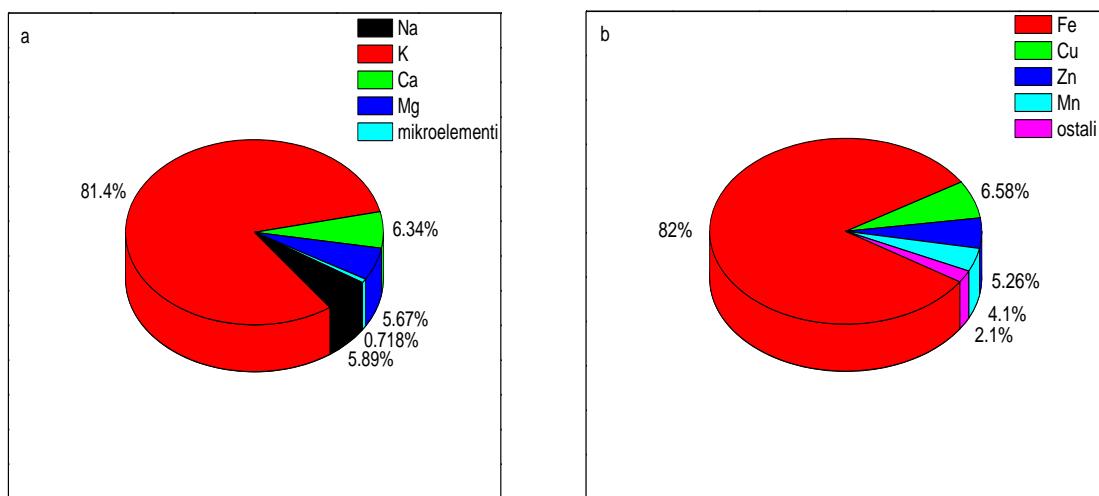
Mikroelementi imaju veoma važnu ulogu u mnogim procesima. Oni imaju značajnu ulogu u razmeni materija, a utiču i na obrazovanje proteina i ugljenih hidrata i njihove transformacije u plodovima, porast plodova, ubrzavaju obrazovanje vitamina C i fotosintezu. Iz tabele 4.24. se vidi da su višnje bogat izvor esencijalnih elemenata kao što su: gvožđe,

bakar, cink i mangan. Teški metali, koji mogu imati toksične efekte, poput olova i kadmijuma, prisutni su u vrlo malim količinama. U pogledu sadržaja najzastupljenijih mikroelemenata višnje sa našeg područja sadrže znatno više gvožđa (762,30 u odnosu na 283 µg/100g sv.v.), manje bakra (74,31 u odnosu na 175 µg/100g sv.v.) i uporedive količine cinka (63,41 u odnosu na 70,0 µg/100g sv.v.) u odnosu na višnje iz Mađarske.

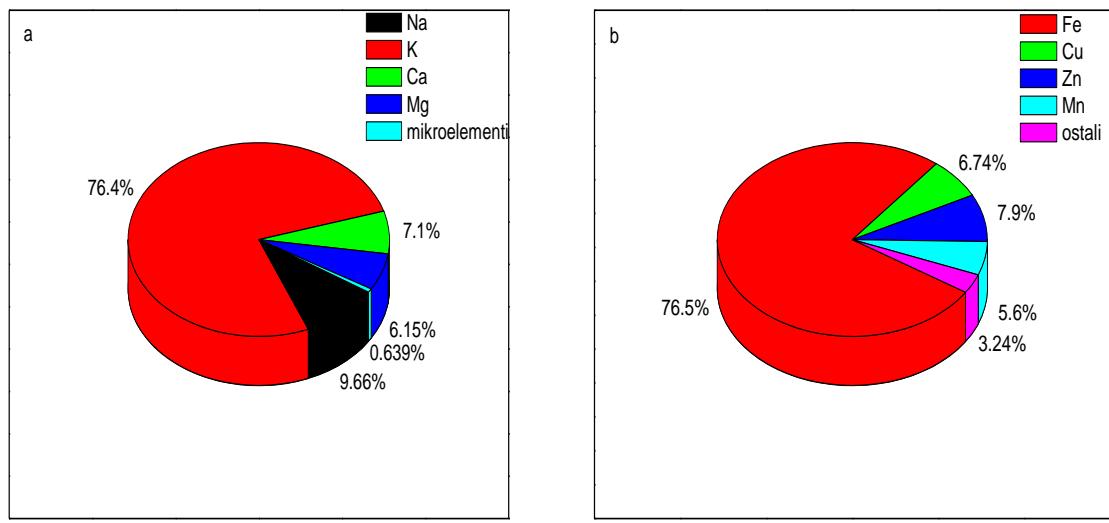
Zastupljenost makro i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima višnji prikazana je na slikama 4.27, 4.28 i 4.29.



Slika 4.27. Zastupljenost makro- (a) i mikroelemenata (b) u Oblačinskoj višnji.



Slika 4.28. Zastupljenost makro- (a) i mikroelemenata (b) u Mareli.



Slika 4.29. Zastupljenost makro- (a) i mikroelemenata (b) u Cigančici.

4.1.5. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti komercijalnih sokova

Konzumiranje višnje u svežem stanju je moguće početkom leta, kada sazревa, a tokom godine se u ishrani koristi u zamrznutom stanju ili u vidu mnogobrojnih prerađevina, kao što su đžemovi, kompoti, sokovi i voćna vina. S obzirom da se od svih prerađevina najviše koriste sokovi, to su predmet našeg daljeg rada bili komercijalni sokovi od višanja tri različita proizvođača. Sastav fenolnih komponenti komercijalnih sokova od višanja upoređen je sa sastavom komercijalnih sokova od crnog grožđa i crne ribizle, takođe tri različita proizvođača. Prema deklaraciji proizvođača komercijalni sokovi su sadržali min. 50, odnosno 52% voća.

Za određivanje sastava i sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ispitivanih komercijalnih sokova korišćene su spektrofotometrijska i HPLC metoda.

4.1.5.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti komercijalnih sokova

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja *ukupnih fenola* u komercijalnim sokovima višnje, crne ribizle i crnog grožđa, prikazani su u tabeli 4.25. Dobijeni rezultati preračunati su na zapreminu polaznog uzorka. Najmanji sadržaj ukupnih fenola određen je u komercijalnim sokovima crnog grožđa (2182,10 – 2480,17 mg GAE/L), nešto veći u komercijalnih sokovima višnje (2329,97 – 2258,77 mg GAE/L), dok je najveći određen u komercijalnim sokovima crne ribizle (2698,64 – 2813,05 mg GAE/L). Ovo je u skladu sa rezultatima *Piljac-Žegarac i sar. (2009)* koji su u komercijalnom soku crne ribizle (sa 25% voća) odredili znatno veći sadržaj ukupnih fenola (1919,8 mg/L) u odnosu na komercijalni sok višnje (sa 40% voća, 1106,2 mg/L), odnosno, rezultatima *Bermudez-Soto i Tomas-Barberana (2004)* koji su za komercijalne koncentrat sokove crnog grožđa, višnje i crne ribizle dobili vrednosti od 11600, 13500 i 23400 mg/L fenola.

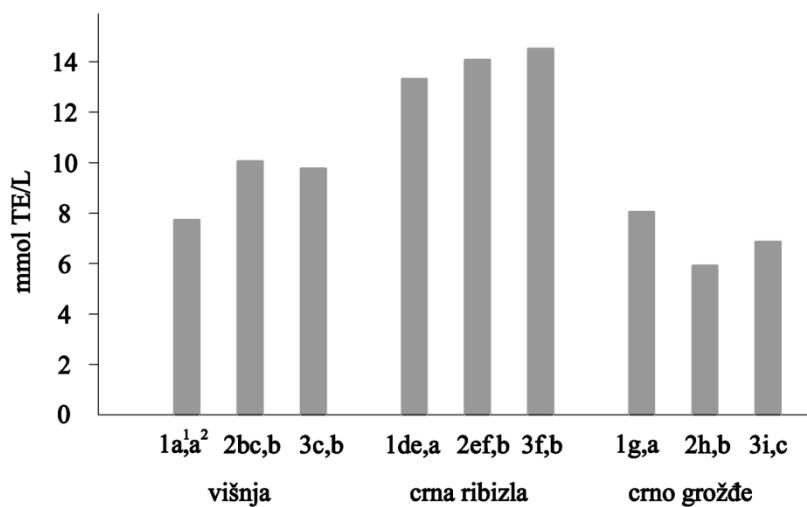
Tabela 4.25. Sadržaj ukupnih fenola (TP), flavonoida (TF) i antocijana (TA) u komercijalnim sokovima.

Sok	Br.	TP ¹ (mg GAE/L)	TF ² (mg CE/L)	TA ³ (mg C3GE ili mg M3GE/L)
	Uzorka			
Višnja	1	2329,97±84,96 ⁴ abd ⁵ ,a ⁶	510,10±15,66 a,a	261,61±16,11 a,a
	2	2480,17±22,15 a,a	580,16±60,20 ab,a	503,18±19,35 b,b
	3	2428,43±53,30 ac,a	618,05±7,53 b,b	430,09±17,71 c,c
Crna ribizla	1	2698,63±43,29 b,a	888,95±16,33 c,a	757,36±49,93 d,a
	2	2750,07±28,48 b,ab	938,28±13,40 c,b	871,03±14,09 e,dc
	3	2813,05±32,21 b,a	975,09±12,87 c,b	920,92±10,86 e,c
Crno grožđe	1	2258,77±52,18 cd,a	405,24±39,55 d,a	256,43±14,10 a,a
	2	2182,10±22,64 d,a	322,12±9,27 d,b	148,92±6,21 f,b
	3	2250,32±47,74 d,a	378,09±6,77 d,ab	220,65±3,97 af,c

¹mg ekvivalenta galne kiseline/L soka; ²mg katehin ekvivalenta/L soka; ³mg cijanidin-3-glukozid (ili malvidin-3-glukozid za sokove od crnog grožđa) ekvivalenta/L soka; ⁴srednja vrednost ± SD (n=3); ⁵brojevi označeni različitim slovima u koloni (za sve ispitivane sokove) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05); ⁶brojevi označeni različitim slovima u koloni za sokove od istog voća se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

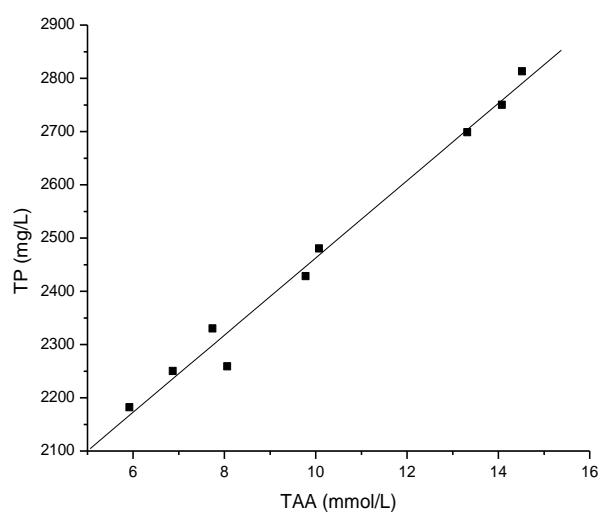
Rezultati spektrofotometrijsog određivanja sadržaja *ukupnih flavonoida* u ispitivanim komercijalnim sokovima, takođe su prikazani u tabeli 4.25. Statistički parametri ukazuju na to da se sokovi višnje znatno razlikuju od sokova crne ribizle i crnog grožđa. Međutim, ako se razlike razmatraju na nivou iste vrste soka, razlike su znatno manje izražene. Ovo potvrđuje podatak, do koji su došli drugi autori, da je u prvom redu sadržaj flavonoida genetski uslovljen. Slični rezultati su dobijeni za sadržaj *ukupnih antocijana*, koji je određen spektrofotometrijskom "singl" pH metodom, s tom razlikom što su sada mnogo više izražene razlike između uzoraka sokova jedne vrste voća. Sadržaj antocijana je dakle mnogo više uslovljen uslovima gajenja i vremenom branja voća. Tokom sazrevanja voća, kao što smo pokazali, koncentracija antocijana se povećava do pune zrelosti, a počinje da opada u fazi prezrelosti. Ova pravilnost važi za većinu voća i regionala, s tim što maksimalne količine antocijana variraju od vrste voća, od klime i okruženja.

Ispitivanja *antioksidativne antivnosti* ispitivanih komercijalnih sokova (slika 4.30) su pokazala da najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju sokovi crne ribizle, zatim sokovi višnje i na kraju sokovi crnog grožđa. Sokovi koji pokazuju znatnu antioksidativnu aktivnost imaju i veliki sadržaj ukupnih fenola. Piljac-Žegarac i sar. (2009) su za sok višnje odredili vrednost od 3,60 mmol TE/L, dok je za komercijalni sok crne ribizle određena vrednost od 5,68 mmol TE/L.

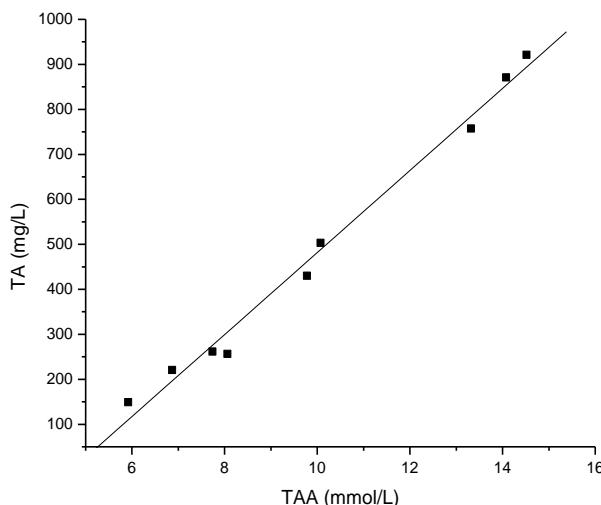


Slika 4.30. Antioksidativna aktivnost ispitivanih vrsta komercijalnih sokova. Sokovi označeni različitim slovima se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala ($p<0,05$).

Da bi se potvrdila veza između antioksidativne aktivnosti sokova i sadržaja ukupnih fenola i ukupnih antocijana urađena je *koreaciona analiza*. Analiza je pokazala visoku korelaciju između ukupnih fenola ($R^2=0,992$) i ukupne antioksidativne aktivnosti (slika 4.31), kao i između ukupnih antocijana ($R^2=0,994$) i ukupne antioksidativne aktivnosti (slika 4.32), što je u dobroj saglasnosti sa drugih autorima (0,93 i 0,95, *Bermudez-Soto i Tomas-Barberan, 2004*).



Slika 4.31. Grafik korelacije sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih komercijalnih sokova.



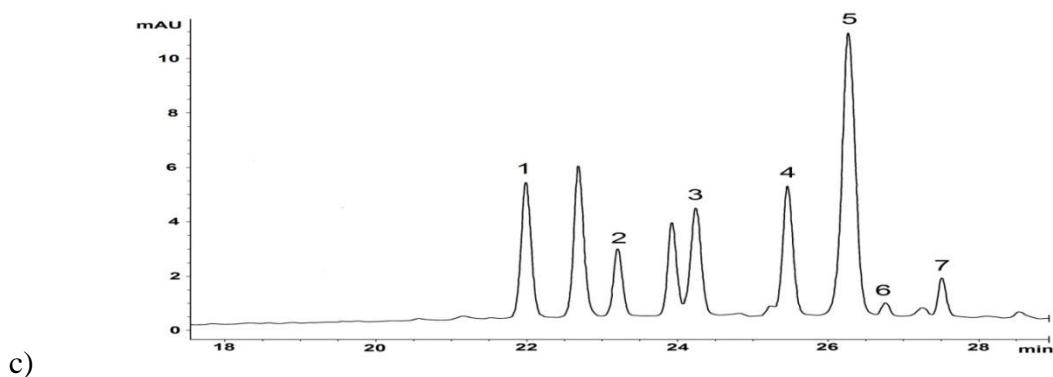
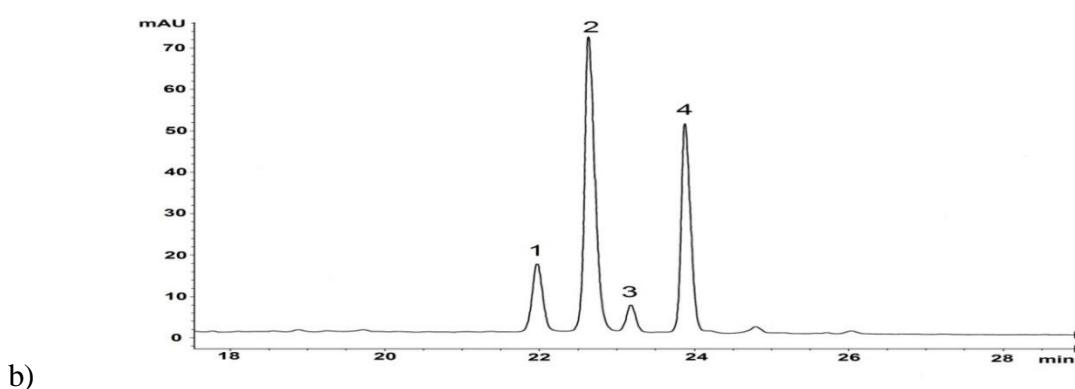
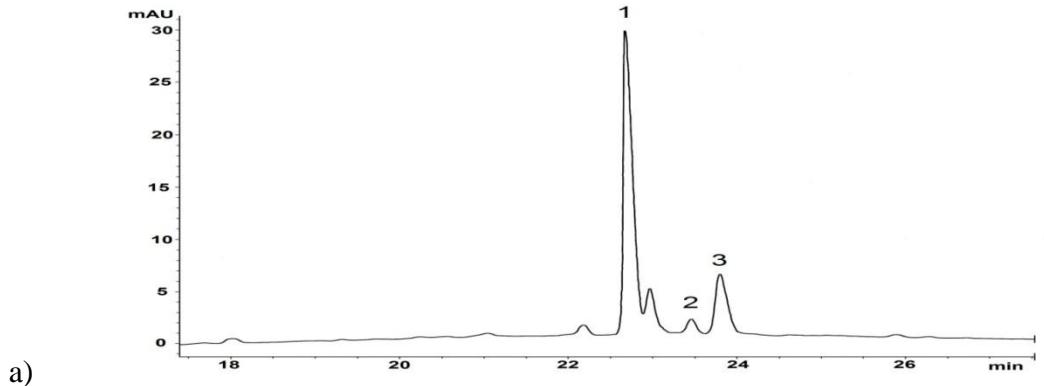
Slika 4.32. Grafik korelacije sadržaja ukupnih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih komercijalnih sokova.

4.1.5.2. HPLC određivanje antocijana i hidroksicimetnih kiselina u komercijalnim sokovima

Za određivanje antocijana i hidroksicimetnih kiselina HPLC metodom korišćena je metoda direktnog injektovanja predhodno profiltriranih uzoraka komercijalnih sokova.

U tabeli 4.26. prikazani su rezultati određivanja *antocijana* HPLC metodom u uzorcima komercijalnih sokova višnje, crne ribizle i crnog grožđa. Antocijani prisutni u uzorcima su identifikovani poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara na hromatogramu (slika 4.33) sa retencionim vremenima i spektrima na hromatogramu standard i na osnovu literaturnih podataka.

U komercijalnim sokovima višnje identifikovana su i kvantifikovana tri glikozida cijanidina, i to cijanidin-3-glukozil-rutinozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid, s obzirom da prvi pik, koji je identifikovan kao cijanidin-3-soforozid nije kvantifikovan zbog malog sadržaja. U sokovima crvene ribizle identifikovana su i kvantifikovana po dva glikozida cijanidina i delfnidina, dok su u sokovima crnog grožđa pored vitisina A određeni glukozidi pet antocijana: delfnidina, cijanidina, peonidina, petunidina i malvidina. Najzastupljeniji antocijan u soku višnje je cijanidin-3-glukozil-rutinozid (zastupljen sa 79,44 - 83,84%), u soku crne ribizle delfnidin-3-rutinozid (zastupljen sa 52,40 - 54,74%), dok je u soku crnog grožđa najzastupljeniji malvidin-3-glukozid (zastupljen sa 42,66 - 46,04%). Jakobek i sar. (2007) su odredili da je u prirodnom soku višnje cijanidin-3-glukozil-rutinozid zastupljen sa 61,4%, dok je u soku crne ribizle delfnidin-3-rutinozid zastupljen sa 43,9% a cijanidin-3-rutinozid sa 36,0%.



Slika 4.33. HPLC hromatogram (520nm) u soku a) višnje: cijanidin-3-glukozil-rutinozid (1); cijanidin-3-glukozid (2); cijanidin-3-rutinozid; b) crne ribizle: delfnidin-3-glukozid (1); delfnidin-3-rutinozid (2); cijanidin-3-glukozid (3); cijanidin-3-rutinozid (4) i c) crnog grožđa: delfnidin-3-glukozid (1); cijanidin-3-glukozid (2); petunidin-3-glukozid (4); malvidin-3-glukozid (5); delfnidin-3-acetil-glukozid (6); vitisin A (7).

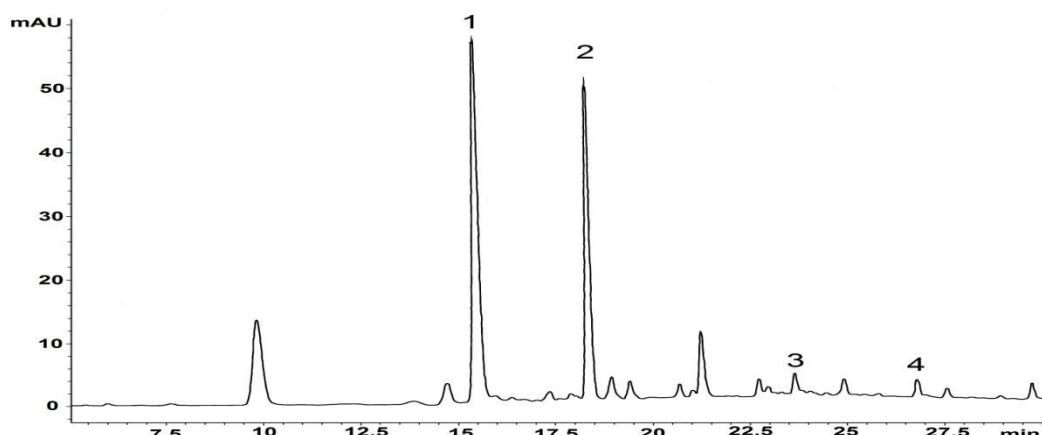
Tabela 4.26. Sadržaj antocijana i procenat njihove zastupljenosti u ispitivanim komercijalnim sokovima.

Sok	Sadržaj ¹ mg/L (%)		
Višnja	1	2	3
Cy-3-glukozil-rutinozid ²	186,79±0,98(79,44)	227,88±1,03 (83,02)	208,64±1,72 (83,84)
Cy-3-glukozid	6,44±0,08 (2,74)	6,43±0,05 (2,34)	7,58±0,21 (3,05)
Cy-3-rutinozid ²	41,89±0,92 (17,82)	40,18±0,08 (14,64)	32,64±0,52 (13,11)
Ukupno	235,12 (100,00)	274,49 (100,00)	248,85 (100,00)
Crna ribizla	1	2	3
Dp-3-glukozid ²	55,22±1,17 (12,67)	48,52±1,08 (10,06)	68,52±1,35 (13,36)
Dp-3-rutinozid ²	238,49±1,37(54,74)	252,68±2,01(52,40)	272,36±1,75(53,12)
Cy-3-glukozid	17,63±0,11 (4,06)	22,35±0,15 (4,64)	18,93±0,09 (3,69)
Cy-3-rutinozid ²	124,30±0,96(28,53)	158,65±0,88 (32,90)	152,92±1,05 (29,83)
Ukupno	435,64 (100,00)	482,20 (100,00)	512,73 (100,00)
Crno grožđe			
Dp-3-glukozid ³	16,64±0,32 (17,64)	15,32±0,18 (16,59)	17,82±0,22 (16,89)
Cy-3-glukozid ³	6,51±0,05 (6,90)	3,48±0,07 (3,76)	5,69±0,11 (5,39)
Pt-3-glukozid ³	12,50±0,21 (132)	13,68±0,16 (14,81)	15,83±0,22 (15,01)
Pn-3-glukozid ³	14,21±0,35 (15,09)	13,99±0,17 (15,15)	12,62±0,32 (11,96)
Mv-3-glukozid	40,24±0,58 (42,66)	42,52±0,47 (46,04)	48,35±0,63 (45,82)
Mv-3-acetil-glukozid ³	1,03±0,03 (1,09)	0,98±0,01 (1,06)	1,52±0,05 (1,44)
Vitisin A ³	3,18±0,10 (3,37)	2,39±0,09 (2,59)	3,68±0,07 (3,49)
Ukupno	94,31 (100,00)	92,36 (100,00)	105,51 (100,00)

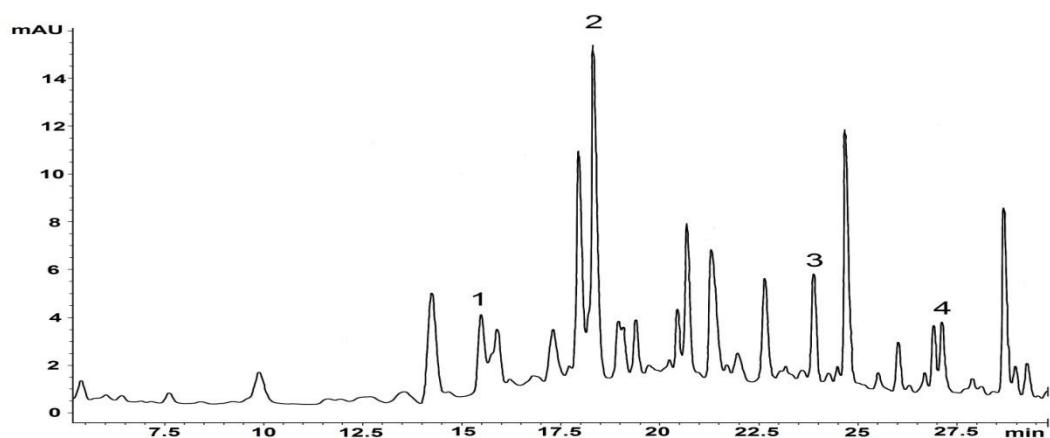
¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg cijanidin-3-glukozid ekvivalenta/L soka; ³mg malvidin-3-glukozid ekvivalenta/L soka.

Na slici 4.34 su dati hromatogrami komercijalnih sokova višnje, crne ribizle i crnog grožđa snimljeni na 320 nm. Rezultati identifikacije i kvantitativnog određivanja hidroksicimetnih kiselina HPLC metodom u ispitivanim komercijalnim sokovima prikazani su u tabeli 4.27. Rezultati pokazuju da najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina imaju sokovi višnje. Za crvene sokove najčešće se HPLC metodom određuju antocijani, tako da je u literaturi prisutno veoma malo podataka za sastav i sadržaj hidroksicimetnih kiselina u njima. Videli smo, da hidroksicimetne kiseline koje su prisutne u grožđu, prisutne su i u vinu, a iz podataka tabele 4.27 možemo zaključiti da su prisutne i u soku crnog grožđa. Isto važi i za ekstrakt višnje i sok višnje (tabela 4.21 i tabela 4.27). Kako nije određivan hemijski sastav crne ribizle, da bi se uporedili podaci koristiće se literatura. Naši rezultati pokazuju da komercijalni sokovi crne ribizle sadrže: neohlorogensku, kafenu, p-kumarnu i ferulnu kiselinu. *Häkkinen i sar.* (1999a) su u crnoj ribizli identifikovali i kvantifikovali p-kumarnu, kafenu i ferulnu kiselinu, dok su *Chrzanowski i sar.* (2007) pored p-kumarne, kafene i ferulne kiseline našli i hlorogensku kiselinu.

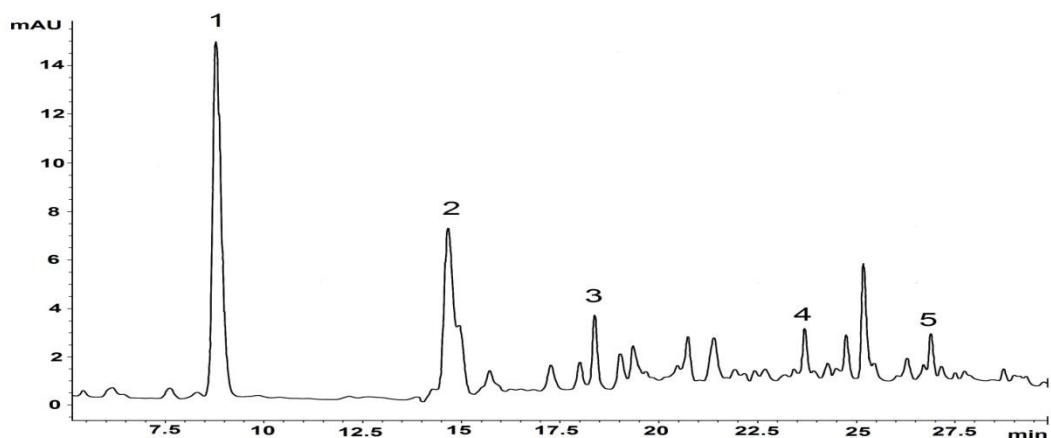
a)



b)



c)



Slika 4.34. HPLC hromatogram (320nm) u soku a) višnje: neohlorogenska kiselina (1); derivat p-kumarne kiseline (2); p-kumarna kiselina (3); ferulna kiselina (4); b) crne ribizle: neohlorogenska kiselina (1); kafena kiselina (2); p-kumarna kiselina (3); ferulna kiselina (4) i c) crnog grožđa: t-kaftarna kiselina (1); t-kutarna kiselina (2); kafena kiselina (3); p-kumarna kiselina (4); ferulna kiselina (5).

Table 4.27. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina i procenat njihove zastupljenosti u ispitivanim komercijalnim sokovima.

Sok	Sadrža ¹ mg/L (%)		
Višnja	1	2	3
Neohlorogenska kiselina ²	65,12±1,08 (80,47)	78,39±1,32 (83,80)	58,32±1,05 (76,93)
p-kumarna kiselina derivat ³	11,76±0,09 (14,53)	12,52±0,12 (13,38)	14,28±0,18 (18,83)
p-kumarna kiselina	3,05±0,05 (3,78)	1,58±0,05 (1,70)	2,36±0,02 (3,12)
Ferulna kiselina	0,99±0,01 (1,22)	1,05±0,02 (1,12)	0,85±0,02 (1,12)
Ukupno	80,92 (100,00)	93,54 (100,00)	75,81 (100,00)
Crna ribizla	1	2	3
Neohlorogenska kiselina ²	3,12±0,06 (34,51)	5,83±0,07 (38,45)	3,32±0,10 (33,9)
Kafena kiselina	4,28±0,11 (47,34)	6,38±0,18 (42,08)	3,69±0,12 (37,01)
p-kumarna kiselina	1,07±0,07 (11,85)	2,03±0,05 (13,40)	1,91±0,08 (19,17)
Ferulna kiselina	0,57±0,02 (6,30)	0,92±0,05 (6,07)	1,05±0,03 (10,53)
Ukupno	9,04 (100,00)	15,16 (100,00)	9,97 (100,00)
Crno grožđe	1	2	3
t-kaftarna kiselina ³	6,93±0,17 (33,94)	7,32±0,18 (36,09)	6,52±0,09 (28,81)
t-kutarna kiselina ²	1,86±0,03 (9,11)	2,08±0,07 (10,25)	1,53±0,10 (6,76)
Kafena kiselina	0,76±0,09 (3,72)	0,66±0,09 (3,25)	1,05±0,06 (4,64)
p-kumarna kiselina	10,41±0,38 (50,98)	9,63±0,65 (47,50)	12,75±0,89 (56,35)
Ferulna kiselina	0,46±0,03 (2,25)	0,59±0,07 (2,91)	0,78±0,09 (3,44)
Ukupno	20,42 (100,00)	20,28 (100,00)	22,63 (100,00)

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg ekvivalenta hlorogenske kiseline/L soka; ³mg ekvivalenta p-kumarne kiseline/L soka; ³mg ekvivalenta kafene kiseline/L soka.

4.1.6. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti voćnih vina

U ovom delu biće prikazani rezultati određivanja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti spektrofotometrijskom metodom, kao i sadržaja antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina određenih HPLC metodom u voćnim vinima od višanja. Sastav i antioksidativna aktivnost voćnih vina od višanja upoređiće se sa sastavom i antoksidativnom aktivnošću voćnih vina od kupina i malina.

4.1.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti voćnih vina

Rezultati spektrofotometrijskih određivanja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti u 12 uzoraka voćnih vina prikazani su u tabeli 4.28. Rezultati pokazuju da je najveći sadržaj *ukupnih fenola* u voćnom vinu od kupine (uzorak 1). Najmanji sadržaj uočen je u voćnom vinu od malina (uzorak 2). Svi ispitivani uzorci voćnih vina od višanja se međusobno značajno razlikuju ($p<0,5$), dok uzorci 1 i 4 voćnih vina od kupina i uzorci 1 i 3 voćnih vina od malina ne pokazuju značajne razlike u pogledu sastava ukupnih fenola.

U pogledu sadržaja ukupnih fenola naša ispitivanja su pokazala da važi niz: voćna vina od kupina > voćna vina od višanja > voćna vina od malina. U literaturi se mogu naći različiti podaci u pogledu sadržaja polifenola. Za voćne sokove postavljen je niz: sok višnje > sok kupine > sok maline (Jakobek i sar. 2007a), a za voća: kupina > višnja > malina. (Jakobek i sar., 2007b). Tukben i sar. (2010) su ispitivali 5 sorti malina i 4 sorti kupina i pri tome utvrdili da znatno veći sadržaj ukupnih fenola ima kupina, što je u skladu sa našim rezultatima.

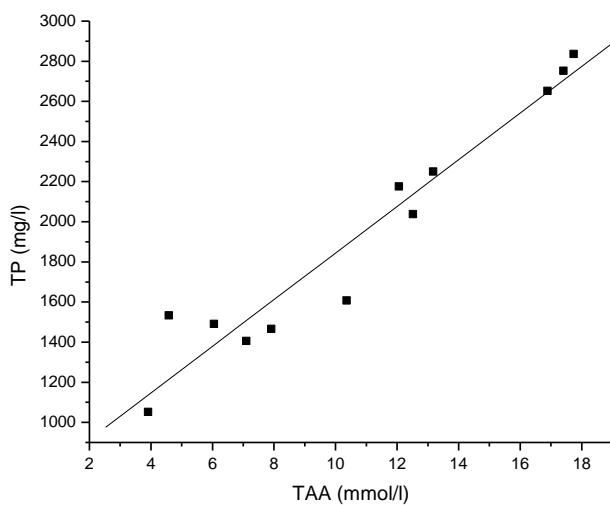
Analiza antioksidativne aktivnosti ispitivanih voćnih vina, urađena korišćenjem DPPH radikala ukazuje da se *antioksidativna aktivnost* kreće od 3,91 do 17,74 mmol TE/L, i da je najmanja kod voćnog vina od malina (uzorak 2) a najveća kod voćnog vina od kupina (uzorak 1).

Tabela 4.28. Sadržaj ukupnih fenola (TP) i antioksidativne aktivnosti (TAA) u voćnim vinima.

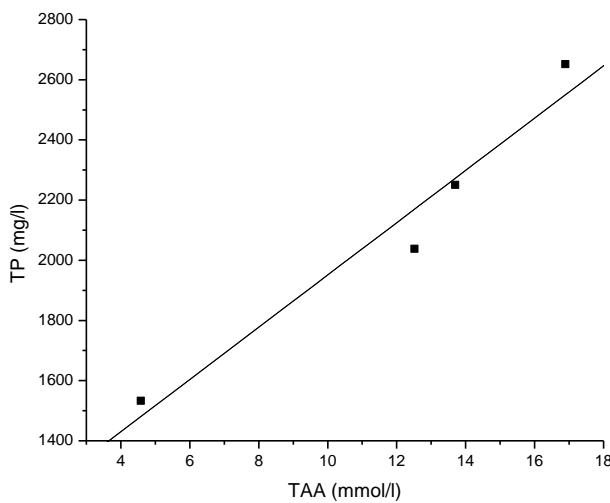
Vino	Broj uzorka	TP ¹ (mg GAE/l)	TAA ² (mmol TE/l)
Višnja			
komercijalno	1	2250,20±56,66 ³ a ⁴	13,17±0,20 a
komercijalno	2	1533,20±15,15 b	4,58±0,53 b
domaće	3	2037,77±19,35 c	12,52±0,78 a
domaće	4	2651,87±32,10 d	16,89±0,51 c
Kupina			
komercijalno	1	2836,17±44,71 a	17,74±0,95 a
komercijalno	2	1607,93±43,54 b	10,36±0,38 b
domaće	3	2176,07±25,78 c	12,06±0,53 b
domaće	4	2752,03±33,93 a	17,41±0,51 a
Malina			
komercijalno	1	1466,47±14,18 a	7,91±0,82 a
komercijalno	2	1051,90±10,58 b	3,91±0,15 b
domaće	3	1490,40±10,06 a	6,05±0,13 c
domaće	4	1405,40±30,38 c	7,10±0,18 ac

¹mg ekvivalenta galne kiseline/L voćnog vina; ²mmol troloks ekvivalenta/L voćnog vina; ³srednja vrednost ± SD (n=3); ⁴brojevi označeni različitim slovima u koloni (vina od iste vrste voća) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

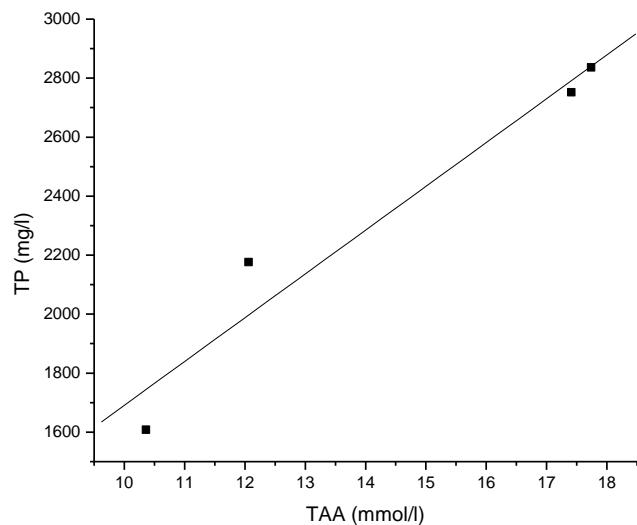
Analiza korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti svih ispitivanih voćnih vina pokazuje da je koeficijent korelacije 0,960 (slika 4.35). Međutim, analiza korelacije između sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti voćnih vina od višanja pokazuje bolju korelaciju ($R^2=0,975$) u odnosu na voćna vina od kupine ($R^2=0,972$) i voćna vina od maline ($R^2=0,857$), što se može videti na slikama 4.36, 4.37 i 4.38.



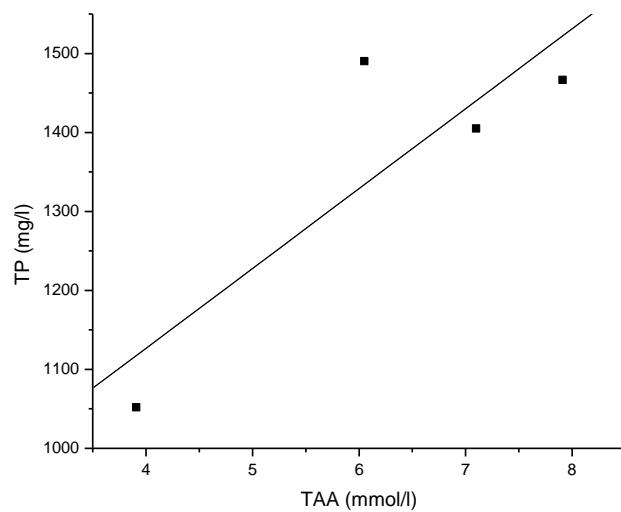
Slika 4.35. Grafik korelacije sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih voćnih vina.



Slika 4.36. Grafik korelacije sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih voćnih vina od višanja.



Slika 4.37. Grafik korelacije sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih voćnih vina od kupina.



Slika 4.38. Grafik korelacije sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih voćnih vina od malina.

4.1.6.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u voćnim vinima

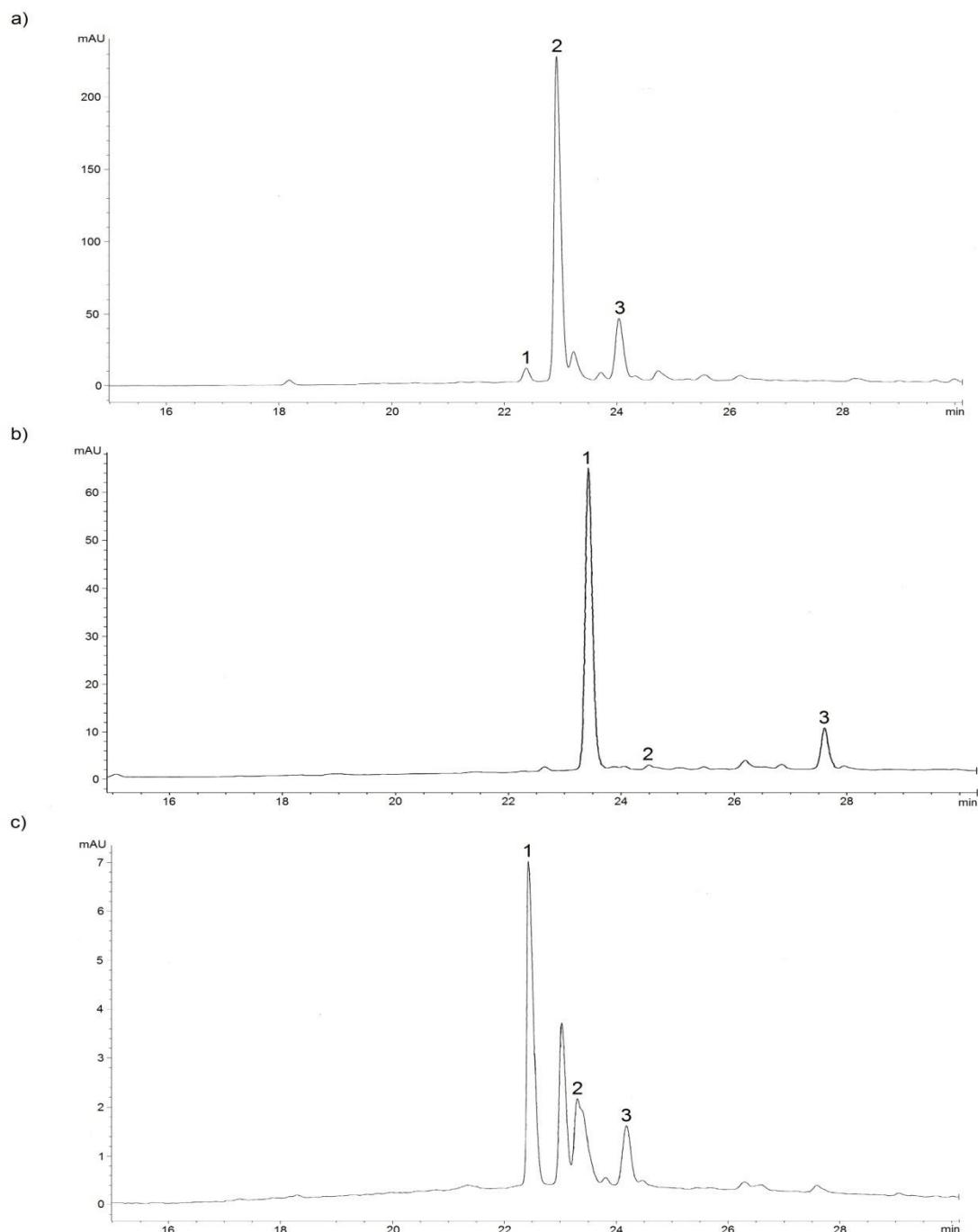
Za voćna vina od višanja, kupina i malina je karakteristično prisustvo antocijana, jedinjenja koja daju karakterističnu boju ovih vina. Njihov sadržaj je određen HPLC metodom i prikazan u tabeli 4.29. Na slici 4.39 dati su hromatogrami za voćna vina od višanja, kupina i malina sa identifikovanim antocijanima. Podaci u tabeli 4.29 pokazuju da je cijanidin-3-glukozil-rutinozid najzastupljeniji antocijanin u voćnim vinima od višanja, dok je cijanidin-3-soforozid identifikovan jedino u domaćim voćnim vinima (uzorci 3 i 4). U uzorcima 1,3 i 4 voćnih vina od kupina najzastupljeniji je cijanidin-3-glukozid, dok je u uzorku 2 dominantno prisustvo cijanidin-3-ksilozida. U svim ispitivanim uzorcima voćnih vina od malina predominantan je cijanidin-3-soforozid. I drugi autori su našli da su u kupini prisutni samo derivati cijanidina i da je najzastupljeniji cijanidin-3-glukozid sa 90% (u odnosu na ukupan sastav antocijana) (*Jakobek i sar.*, 2007a), odnosno sa 53% (*Fan-Chiang i sar.* 2005). Međutim, na osnovu literaturnih podataka možemo zaključiti da je sastav antocijana maline veoma različit. U ispitivanim uzorcima voćnih vina od malina nađeni su samo derivati cijanidina. *Jakobek i sar.* (2007a) i *De Ancos i sar.* (1999) su pored cijanidin-3-soforozida, koji je najzastupljeniji i cijanidin-3-glukozida našli i pelargonidin-3-soforozid, dok su *Goiffon i sar.* (1999) pored derivata cijanidina našli i derivate malvidina i delfnidina.

Analiza korelacije između sadržaja monomernih antocijana određenih HPLC metodom i ukupne antioksidativne aktivnosti određene spektrofotometrijskom metodom pokazuje najveći korelacioni koeficijent za voćna vina od maline ($R^2=0,985$, slika 4.42), zatim sledi korelacioni koeficijent za voćna vina od kupine ($R^2=0,929$, slika 4.41), i na kraju za voćna vina od višnje ($R^2=0,569$, slika 4.40). Takođe, analiza korelacije između sadržaja ukupnih monomernih antocijana i antioksidativne aktivnosti svih ispitivanih voćnih vina pokazuje zadovoljavajući koeficijent korelacije i on iznosi 0,840 (slika 4.43).

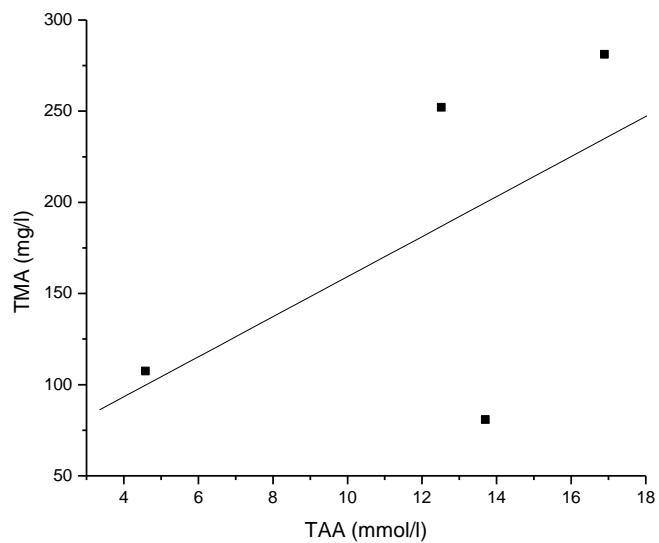
Tabela 4.29. Sadržaj antocijana i procenat njihove zastupljenosti u ispitivanim voćnim vinima.

Vino	Sadržaj ¹ mg/l (%)			
Višnja	1	2	3	4
Cy.-3-soforozid	nd ³	nd	9,1±0,7(3,6)	8,5±0,4(3,1)
Cy-3-G-rutinozid	208,5±1,3(74,2)	86,8±1,2(80,8)	196,1±1,6(77,8)	215,3±1,7(76,6)
Cy-3-rutinozid	72,3±0,9(25,8)	20,6±0,8(19,2)	46,9±0,9(18,6)	57,3±1,2(20,3)
Ukupno²	80,8±2,2(100,0)	107,4±2,0(100,0)	252,1±3,2(100,0)	281,1±3,3(100,0)
Kupina	1	2	3	4
Cy-3-glukozid	403,8±2,0(86,7)	35,4±0,2(20,3)	209,3±0,7(80,6)	305,7±1,8(87,7)
Cy-3-rutinozid	nd	39,3±0,5(22,5)	nd	nd
Cy- 3-ksilozid	61,9±1,1(13,3)	99,7±1,1(57,2)	50,3±0,4(19,4)	42,8±0,4(12,3)
Ukupno²	465,7±3,1(100,0)	174,4±1,8(100,0)	259,6±1,1(100,0)	348,5±2,2(100,0)
Malina	1	2	3	4
Cy-3-soforozid	178,9±1,5(69,5)	91,8±1,6(88,9)	153,7±1,2(73,0)	201,5±1,0(83,8)
Cy-3-glukozid	45,8±0,3(17,8)	3,5±0,1(3,4)	38,2±0,4(18,1)	14,3±0,5(5,9)
Cy-3-rutinozid	32,8±0,3(12,7)	7,9±0,2(7,7)	18,5±0,3(8,9)	24,5±0,3(10,3)
Ukupno²	257,5±2,1(100,0)	103,2±1,9(100,0)	210,4±1,9(100,0)	240,3±1,8(100,0)

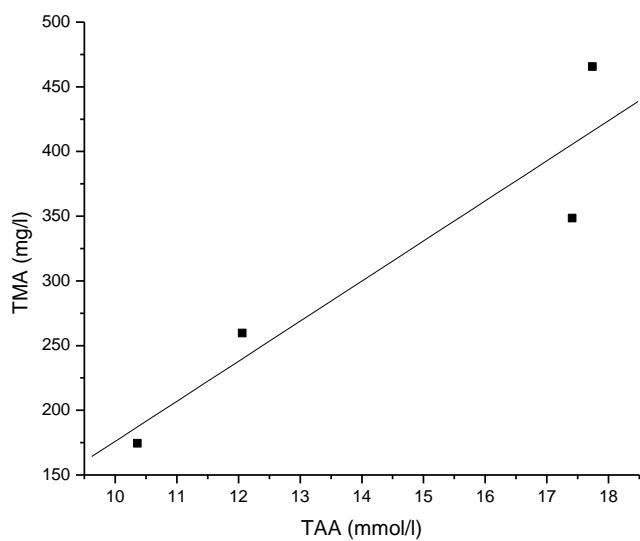
¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg cijanidin-3-glukozid ekvivalenta/L voćnog vina; ³nije određeno.



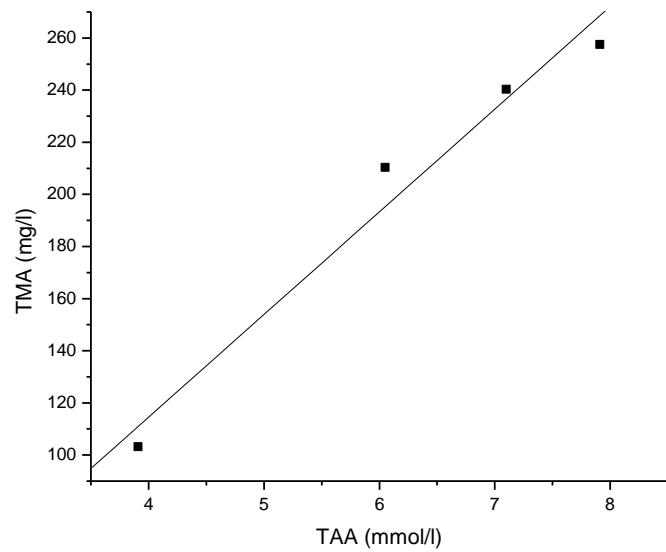
Slika 4.39. HPLC hromatogram u voćnom vinu od (a) višanja: cijaniding-3-soforozid (1), cijanidin-3-glukozil-rutinozid (2) i cijanidin-3-rutinozid (3); (b) kupina: cijanidin-3-glukozid (1), cijanidin-3-rutinivid (2) i cijaniding-3-ksilozid (3); (c) malina: cijanidin-3-soforozid (1), cijanidin-3-glukozid (2) i cijanidin-3-rutinivid (3).



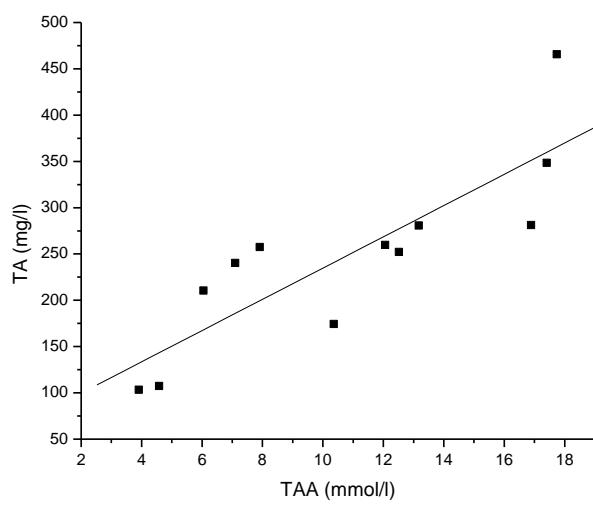
Slika 4.40. Grafik korelacije sadržaja ukupnih monomernih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti voćnih vina od višanja.



Slika 4.41. Grafik korelacije sadržaja ukupnih monomernih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti voćnih vina od kupina.



Slika 4.42. Grafik korelacije sadržaja ukupnih monomernih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti voćnih vina od malina.



Slika 4.43. Grafik korelacije sadržaja ukupnih monomernih antocijana i ukupne antioksidativne aktivnosti.

Tabela 4.30. Sadržaj flavonola u ispitivanim voćnim vinima.

Vino	Sadržaj ¹ mg/1			
Višnja	1	2	3	4
Kvercetin	3,74±0,22	1,13±0,12	2,63±0,22	3,05±0,18
Kemferol	2,76±0,18	0,82±0,08	1,58±0,18	2,16±0,16
Ukupno	6,51±0,20	1,95±0,10	4,21±0,20	5,21±0,17
Kupina	1	2	3	4
Kvercetin	4,07±0,28	3,87±0,19	4,90±0,32	4,72±0,19
Kemferol	0,45±0,05	0,30±0,05	0,40±0,05	0,85±0,07
Ukupno	4,52±0,16	4,17±0,12	5,30±0,18	5,57±0,13
Malina	1	2	3	4
Kvercetin	0,98±0,05	1,20±0,09	1,32±0,08	1,80±0,08
Kemferol	nd ²	nd	nd	nd
Ukupno	0,98±0,05	1,20±0,09	1,32±0,08	1,80±0,08

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²nije određeno.

U tabeli 4.30 su prikazani rezultati određivanja *flavonola* (mg/L) HPLC metodom u uzorcima voćnih vina. HPLC analiza ukazuje na prisustvo kvercetina i kemferola u voćnim vinima od višanja i kupina, odnosno kvercetina u voćnim vinima od malina. Miricetin nije identifikovan u svim ispitivanim uzorcima voćnih vina. Najveći sadržaj flavonoida zabeležen je u uzorcima voćnih vina od kupina, zatim slede voćna vina od višanja i na kraju voćna vina od malina. Isti niz u pogledu sadržaja flavonola u kupini, višnji i malini našli su i drugi autori (*Jakobek i sar., 2007*).

Rezultati identifikacije i kvantifikacije hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim voćnim vinima prikazani su u tabeli 4.31. Rezultati pokazuju da najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina imaju voćna vina od višanja (73.84 – 98.81 mg/L), dok su sličnog sadržaja voćna vina od kupina (6.42 – 30.94 mg/L) i voćna vina od malina (9.41 – 28.13 mg/L).

Tabela 4.31. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim voćnim vinima.

Vino	Sadržaj ¹ mg/l			
Višnja	1	2	3	4
Neohlorogenska ²	74,64±1,02	60,44±0,90	58,50±0,65	60,72±0,82
Kafena	13,79±0,38	11,52±0,32	12,83±0,42	9,85±0,30
p-Kumarna	10,38±0,29	1,88±0,22	9,63±0,18	7,38±0,25
Ferulna	nd ³	nd	nd	nd
Ukupno	98,81±0,56	73,84±0,48	80,96±0,42	77,95±0,46
Kupina	1	2	3	4
Neohlorogenska ²	12,39±0,40	1,79±0,18	13,55±0,23	17,82±0,52
Kafena	7,62±0,36	3,83±0,28	9,86±0,25	8,32±0,35
p-Kumarna	1,08±0,15	0,80±0,06	2,08±0,12	3,01±0,22
Ferulna	nd	nd	2,68±0,09	1,79±0,10
Ukupno	21,08±0,30	6,42±0,17	28,17±0,17	30,94±0,30
Malina	1	2	3	4
Neohlorogenska ²	22,82±0,83	nd	12,38±0,45	10,63±0,36
Kafena	5,31±0,16	2,99±0,12	7,38±0,52	6,82±0,24
p-Kumarna	nd	nd	1,08±0,15	1,85±0,20
Ferulna	nd	6,42±0,18	3,28±0,18	1,05±0,16
Ukupno	28,13±0,50	9,41±0,15	24,12±0,32	20,35±0,24

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg ekvivalenta hlorogenske kiseline/L voćnog vina; ³nije određeno.

4.1.7. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti crvene ribizle

Za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja korišćena je suva crvena ribizla gajena na trima različitim područjima: Niška Banja, Beograd i Velika Plana. Ekstrakcija je vršena prema proceduri dатој u delu 3.3.1.1. u različitim rastvaračima: aceton:voda:HCl (80:19:1), etanol:voda:HCl (80:19:1) i metanol:voda:HCl (80:19:1). Za određivanje sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti pripremljenih ekstrakata korišćene su spektrofotometrijske metode. Za određivanje sadržaja pojedinačnih antocijana, flavonola, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina korišćena je HPLC metoda.

4.1.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti crvene ribizle

U tabeli 4.32 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakta crvene ribizle. Ekstrakcija je vršena u različitim rastvaračima. Dobijeni rezultati preračunati su na masu polaznog uzorka, odnosno suvog voća.

Sadržaj *ukupnih fenola* u ekstraktu, kao i sastav ekstrakta u velikoj meri zavisi od načina ekstrakcije, kao i tipa i polarnosti rastvarača. *Keinänen* (2003) je koristio rastvarače: aceton, methanol i etanol, kao absolutne i u smeši sa vodom (80% etanol, methanol i aceton). Isti autor je pokazao da je ekstrakcija rastvaračima koji sadrže vodu efikasnija od ekstrakcije absolutnim rastvaračima. Takođe, mnogi autori su pokazali da se efikasnost ekstrakcije povećava u prisustvu 0,1% HCl (*Seeram i sar.*, 2006) ili 2% HCl (*Jakobek i sar.*, 2007b). Iz gore navedenih razloga za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz uzorka suve crvene ribizle, a u daljem radu i uzorka suve maline, korišćena je smeša 80% rastvarača (metanola, etanola ili acetona) + 19% vode + 1% HCl.

Sadržaj ukupnih fenola u acetonskim ekstraktima suve crvene ribizle kreće se od 6,15 mg GAE/g suvog voća (su.v.) u crvenoj ribizli – Velika Plana do 12,68 mg GAE/g su.v. u crvenoj ribizli – Beograd. *Pantelidis i sar.* (2007) su za dve sorte crvenih ribizli našli da sadrže 11,15 i 11,93 mg GAE/g su.v.

Tabela 4.32. Sadržaj ukupnih fenola (TP), flavonoida (TF) i antioksidativne aktivnosti (TAA) ekstrakata crvene ribizle u različitim rastvaračima.

TP ¹ (mg GAE/g suvog voća)	Crvena ribizla Niska Banja	Crvena ribizla Beograd	Crvena ribizla Velika Plana
Metanol	3,47±0,11 ⁴ a ⁵ ,a ⁶	3,96±0,10 a,b	3,26±0,06 a,ac
Etanol	3,91±0,14 b,a	6,57±0,09 b,b	3,05±0,10 ab,c
Aceton	7,46±0,09 c,a	12,68±0,04 c,b	6,15±0,12 c,c
TF ² (mg CE/g suvog voća)	Crvena ribizla Niska Banja	Crvena ribizla Beograd	Crvena ribizla Velika Plana
Metanol	1,34±0,07 a,a	1,85±0,13 a,b	1,25±0,08 a,ac
Etanol	1,45±0,07 ab,a	1,84±0,07 ab,b	1,42±0,09 ab,ac
Aceton	2,13±0,08 c,a	2,61±0,09 c,b	1,99±0,14 c,ac
TAA ³ (μmol TE/g suvog voća)	Crvena ribizla Niska Banja	Crvena ribizla Beograd	Crvena ribizla Velika Plana
Metanol	24,71±0,30 a,a	30,42±0,79 a,b	22,47±0,62 a,c
Etanol	23,22±0,41 ab,a	48,64±0,41 b,b	17,53±1,51 b,c
Aceton	61,11±1,09 c,a	104,63±4,62 c,b	44,11±1,73 c,c

¹mg ekvivalenta galne kiseline/g suvog voća; ²mg katehin ekvivalenta/g suvog voća; ³mmol troloks ekvivalenta/g suvog voća; ⁴srednja vrednost ± SD (n=3); ⁵brojevi označeni različitim slovima u koloni (za jednu grupu jedinjenja , za jedan uzorak u različitim rastvaračima) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05); ⁶brojevi označeni različitim slovima u redu (za jednu grupu jedinjenja , za različite uzorke u istom rastvraču) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

Korišćenjem Duncan-ovog testa višestrukih intervala (tabela 4.32) jasno se uočavaju razlike u sadržaju ukupnih fenola u uzorcima crvenih ribizli gajenih na različitim lokacijama, a takođe i istog uzorka crvene ribizle ekstrahovane različitim rastvaračima. Dobijeni rezultati pokazuju da je najefikasniji rastvarač aceton. Ovaj podatak je u saglasnosti sa rezultatima *Kähkönen-a i sar. (2001)*, koji su određivali sadržaj fenola u jabuci, borovnici, brusnici i malini u ekstraktima metanola i acetona, ili sa rezultatima *Alothmana-a i sar. (2009)*, koji su ispitivali sadržaj fenola u tropskom voću u ekstraktima metanola, etanola i acetona.

Prikazani rezultati sadržaja *ukupnih flavonoida* u ekstraktima različitih rastvarača crvene ribizle, pokazuju da njihov sadržaj dosta varira u zavisnosti od lokaliteta i upotrebljenog rastvarača za ekstrakciju. Tako je najveća količina flavonoida zabeležena u uzorcima sa lokalitetom Beograda i u ekstraktu acetona (tabela 4.32). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima *Alothman i sar. (2009)* koji su dokazali da je aceton najbolji rastvarač za

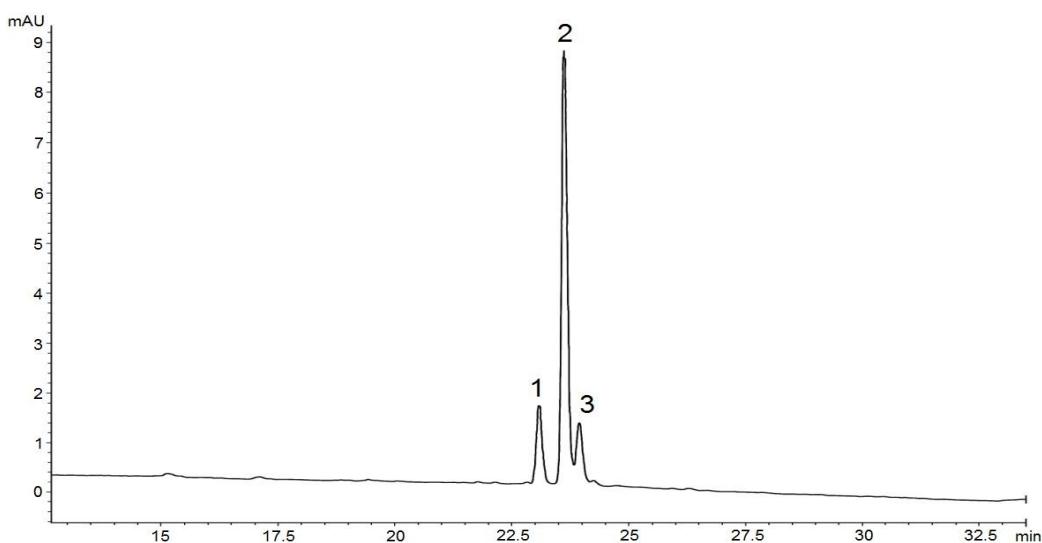
ekstrakciju flavonoida južnog voća, ali je suprotno rezultatima *Jagtap i sar.* (2010) koji su pokazali da su metanol i etanol bolji estragensi od acetona.

Dobijene vrednosti za *antioksidativnu aktivnost* su u intervalu od 44,11 do 104,63 $\mu\text{mol TE/g su.v.}$ Najveću antioksidativnu vrednost pokazuje crvena ribizla - Beograd, sledi crvena ribizla – Niška Banja i na kraju crvena ribizla – Velika Plana (tabela 4.32). *Jakobek i sar.* (2007b) su za crvenu ribizlu odredili vrednost antioksidativne aktivnosti od 13,73 $\mu\text{mol TE/g su.v.}$ Rezultati su uporedivi sa našim rezultatima, s obzirom da je odnos masa suvog voća/masa svežeg voća najčešće od 0,1 do 0,2. Takođe, najveće vrednosti su zabeležene u acetonu kao rastvaraču za ekstrakciju, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (*Alothman i sar.*, 2009).

4.1.7.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola, flavan-3-ola i hidroksicimetnih kiselina u crvenoj ribizli

Kao što se može videti sa hromatograma (slika 4.44) jasno se uočavaju izraženi pikovi za: cijanidin-3-soforozid (1), cijanidin-3-glukozil-rutinozid (2) i cijanidin-3-glukozid.

U tabeli 4.33. prikazani su rezultati određivanja *antocijana* (mg/100g suvog voća) HPLC metodom u uzorcima crvene ribizle na 520 nm u ekstraktima metanola, etanola i acetona. Pokazalo se da se antocijani najbolje ekstrahuju sistemom metanol + voda + kiselina, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora za crvena voća (*Kajdžanovska i sar.* 2011). Iz tabele 4.33. se može uočiti da je u ekstraktima crvene ribizle najzastupljeniji cijanidin-3-glukozil-rutinozid. Sadržaj ukupnih monomernih antocijanina u ispitivanim uzorcima crvene ribizle se kretao od 54,48 mg/100 g su.v. do 111,75 mg/100 g su.v. u metanolnom ekstraktu. *Kähkönen i sar.* (2001) su u našli da crvena ribizla sadrži 113 mg /100 g su.v. antocijana.



Slika 4.44. HPLC hromatogram antocijana (520 nm) u metanolnom ekstraktu uzorka crvene ribizle iz Beograda: cijanidin-3- soforozid (1), cijanidin-3-glukozil-rutinozid (2), cijanidin-3-glikozid (3).

Tabela 4.33. Sadržaj (mg/100g suvog voća)^{1,2} antocijana u ekstraktima crvenih ribizli u različitim rastvaračima.

Voće	Rastvarač	Cy-3-soforozid	Cy-3-glukozil-rutinozid	Cy-3-glukozid	Ukupno
Crvena ribizla	Metanol	35,81±0,45	65,56±1,02	10,38±0,02	111,75±0,50
	Etanol	22,92±0,86	39,37±1,09	5,22±0,01	67,51±0,65
	Aceton	12,21±0,38	44,20±0,99	5,77±0,07	61,58±0,48
Niška Banja	Metanol	7,38±0,29	40,55±0,85	6,55±0,08	54,48±0,41
	Etanol	5,67±0,22	34,32±0,78	4,55±0,11	44,54±0,37
	Aceton	4,10±0,18	22,81±0,69	4,98±0,23	31,89±0,37
Beograd	Metanol	4,43±0,10	22,87±0,53	5,45±0,62	32,75±0,42
	Etanol	3,68±0,29	13,50±0,28	4,32±0,18	21,50±0,25
	Aceton	2,42±0,09	5,32±0,17	2,56±0,52	10,30±0,26

¹srednja vrednost ± SD (n=3); ²mg cijanidin-3-glukozid ekvivalenta/100 g suvog voća.

U tabeli 4.34 su prikazani rezultati određivanja *flavonola* (mg/100g suvog voća) HPLC metodom u uzorcima crvene ribizle na 360 nm. Na slici 4.45 je dat hromatogram za uzorak ekstrakta crvene ribizle na 360 nm. HPLC analiza ekstraka crvene ribizle je ukazala na prisustvo kvercetina i kemferola. Miricetin nije identifikovan u ispitivanim uzorcima crvene

ribizle. Neki autori (*Määttä i sar., 2003; Häkkinen i sar., 1999b*) su našli da crvena ribizla sadrži kvercetin, miricetin i kemferol, pri čemu je najzastupljeniji kvercetin, dok su drugi autori (*Häkkinen i sar., 1999b*) pronašli samo kvercetin.

Tabela 4.34. Sadržaj (mg/100g suvog voća)¹ flavonola u ekstraktima crvenih ribizli u različitim rastvaračima.

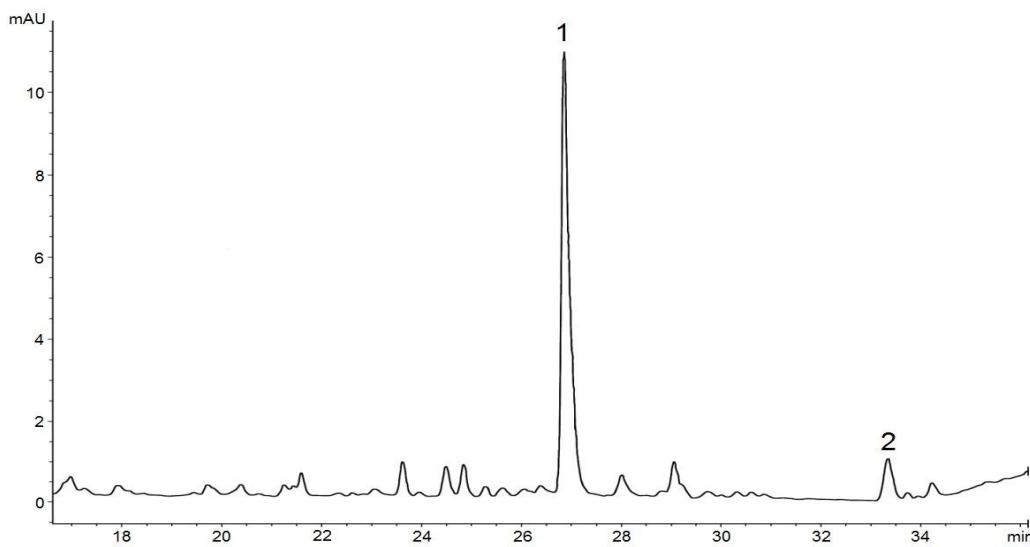
Voće	Rastvarač	Kvercetin	Kemferol	Ukupno
Crvena ribizla	Metanol	2,53±0,12	0,57±0,05	3,10±0,08
	Etanol	2,28±0,17	0,54±0,07	2,82±0,12
	Aceton	7,47±0,32	1,62±0,09	9,09±0,20
Crvena ribizla	Metanol	5,92±0,35	0,63±0,05	6,55±0,20
	Etanol	3,83±0,28	0,47±0,02	4,30±0,15
	Aceton	8,71±0,45	1,72±0,11	10,43±0,28
Crvena ribizla	Metanol	8,45±0,62	1,92±0,10	10,37±0,36
	Etanol	6,79±0,48	1,26±0,05	8,05±0,26
	Aceton	8,63±0,37	2,53±0,07	11,16±0,22

¹srednja vrednost ± SD (n=3).

U acetonskom ekstraktu crvene ribizle – Niška Banja određen je najmanji sadržaj ukupnih flavanola (9,09 mg/100 g su.v.), gde je ideo kvercetina iznosio 82,17 % od ukupne mase flavanola, dok je u istom ekstraktu crvene ribizle – Velika Plana određen najveći sadržaj ukupnih flavanola (11,16 mg/100 g su.v.) sa udelom kvercetina od 77,33 %. *Kähkönen i sar. (2001)* su u acetonskom ekstraktu crvene ribizle našli sadržaj od 9,5 mg/100 g su.v. flavanola.

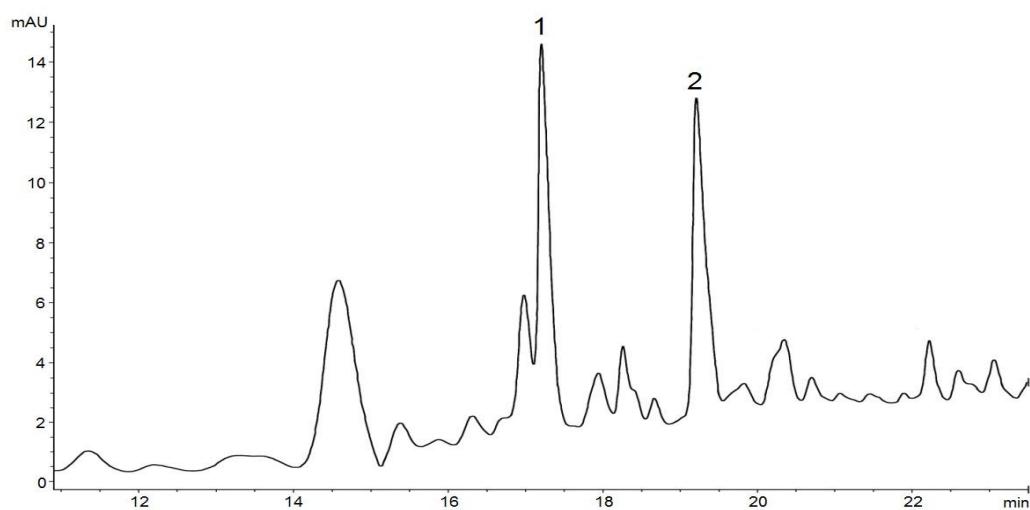
Kvalitativnom HPLC analizom ekstrakta crvene ribizle određeno je prisustvo katehina i epikatehina uz upotrebu fluorescentnog detektora (slika 4.46). U tabeli 4.35. prikazani su rezultati odredjivanja flavan-3-ola (mg/100g suvog voća) HPLC metodom u uzorcima crvene ribizle na 275/322nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

Sadržaj ukupnih *flavan-3-ola* u acetonskim ekstraktima se kretao od 139,28 do 165,65 mg/100 g su.v., pri čemu je ekstrakt crvene ribizle – Beograd bio najbogatiji flavan-3-olima, dok je ekstrakt crvene ribizle – Velika Plana imao najmanji sadržaj.



Slika 4.45. HPLC hromatogram flavanola (360 nm) u metanolnom ekstraktu uzorka crvene ribizle iz Beograda: kvercetin (1), kemferol (2.)

U tabeli 4.36 prikazani su rezultati odredjivanja hidroksicimetnih kiselina (mg/100g suvog voća) HPLC metodom u uzorcima crvene ribizle na 320 nm. Na slici 4.47 je dat hromatogram za metanolni ekstrakt crvene ribizle.



Slika 4.46. HPLC hromatogram flavan-3-ola (275/322nm , $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) u metanolnom ekstraktu uzorka crvene ribizle iz Beograda: katehin (1), epikatehin (2).

Tabela 4.35. Sadržaj (mg/100g suvog voća)¹ flavan-3-ola u ekstraktima crvenih ribizli u različitim rastvaračima.

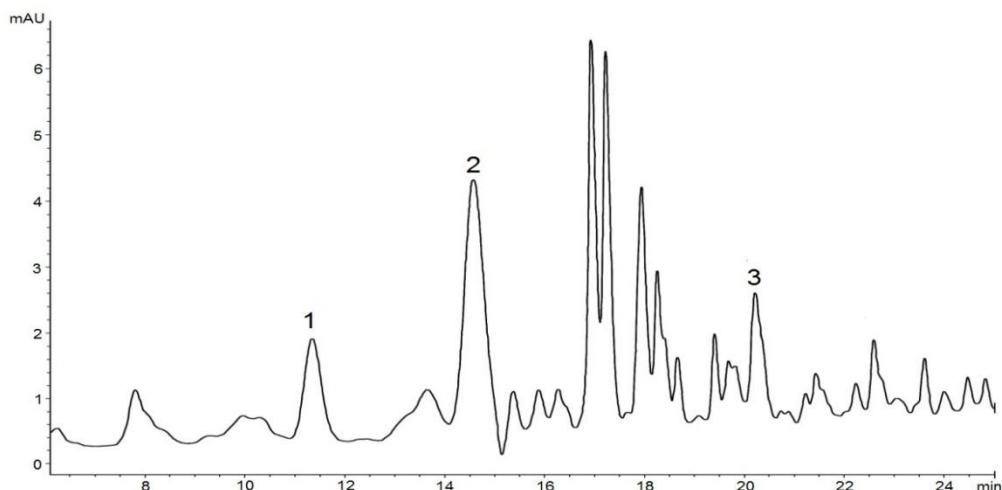
Voće	Rastvarač	Katehin	Epikatehin	Ukupno
Crvena ribizla	Metanol	52,32±0,82	69,12±0,98	121,44±0,90
	Etanol	37,58±0,78	53,31±0,85	90,89±0,81
	Aceton	60,92±1,05	82,03±0,83	142,95±0,94
Crvena ribizla	Metanol	58,63±0,62	64,62±1,10	123,25±1,17
	Etanol	43,72±0,69	47,13±0,97	90,85±0,83
	Aceton	67,50±0,46	98,47±0,56	165,97±0,51
Crvena ribizla	Metanol	50,87±0,32	55,78±0,45	106,65±0,38
	Etanol	45,92±0,17	48,92±0,37	94,84±0,27
	Aceton	59,45±0,28	79,83±0,28	139,28±0,28

¹srednja vrednost ± SD (n=3).

Tabela 4.36. Sadržaj (mg/100g suvog voća)¹ hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima crvenih ribizli u različitim rastvaračima.

Voće	Rastvarač	Kafena kiselina	p-Kumarna kiselina	Ferulna kiselina	Ukupno
Crvena ribizla	Metanol	1,22±0,09	2,34±0,12	2,43±0,14	5,99±0,12
	Etanol	0,42±0,06	0,92±0,07	0,95±0,05	2,29±0,06
Niška Banja	Aceton	nd	2,13±0,09	1,12±0,06	3,25±0,07
	Metanol	1,73±0,12	3,03±0,08	1,62±0,07	6,38±0,09
Beograd	Etanol	1,35±0,08	1,15±0,05	1,28±0,11	3,78±0,08
	Aceton	1,52±0,05	2,92±0,11	1,59±0,22	6,03±0,13
Crvena ribizla	Metanol	2,38±0,21	2,73±0,13	4,12±0,28	9,23±0,21
	Etanol	1,05±0,17	0,89±0,08	1,89±0,15	3,83±0,13
Velika Planina	Aceton	0,98±0,09	1,08±0,07	2,45±0,17	4,51±0,11

¹srednja vrednost ± SD.



Slika 4.47. HPLC hromatogram hidroksicimetnih kiselina (320 nm) u metanolnom ekstraktu uzorka crvene ribizle iz Beograda: kafena kiselina (1), p-kumarna kiselina (2) i ferulna kiselina(3).

Hidroksicimetne kiseline prisutne u uzorcima crvenih ribizli su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za kafenu, p-kumarnu i ferulnu kiselinu.

Rezultati pokazuju da najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina imaju crvene ribizle sa lokacije Velike Plane (9,23 mg/100 g su.v.), dok najmanji sadržaj imaju crvene ribizle sa lokacije Niške Banje (5,99 mg/100 g su.v.). Najzastupljenija komponenta u metanolnim ekstraktima crvenih ribizli sa područja Niške Banje i Beograda je p-kumarna kiselina, koja čini od 39,1 do 47,5 % ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Međutim, najzastupljenija komponenta u metanolnom ekstraktu crvene ribizle sa područja Velike Plane je ferulna kiselina, koja čini 44,3 % ukupnih hidroksicimetnih kiselina. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (*Määttä i sar., 2003*).

4.1.8. Određivanje sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti maline

Za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja korišćena je suva malina gajena na trima različitim područjima: Velika Plana, Niška Banja i Vlasina. Ekstrakcija je vršena prema proceduri dатој u delu 3.3.1.1 u različitim rastvaračima aceton:voda:HCl (80:19:1), etanol:voda:HCl (80:19:1) i metanol:voda:HCl (80:19:1). Za određivanje sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidativne aktivnosti pripremljenih ekstrakata korišćene su spektrofotometrijske metode. Za određivanje sadržaja pojedinačnih antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina korišćena je HPLC metoda.

4.1.8.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidativne aktivnosti maline

U tabeli 4.37 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstarakta suve maline. Ekstrakcija je vršena u različitim rastvaračima. Dobijeni rezultati preračunati su na masu polaznog uzorka. Rezultati pokazuju da je pri određivanju ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupne antiokidativne aktivnosti najbolje ekstrakciju vršiti sistemom aceton:voda:HCl (80:19:1).

Analizom dobivenih rezultata može se uočiti da se sadržaj *ukupnih fenola* u analiziranim uzorcima suve maline menja u zavisnosti od područja na kojem je gajena malina i kreće se od 14,36 mg GAE/g su.v. u acetonskom ekstraktu maline sa područja Niške Banje do 16,73 mg GAE/g su.v. u acetonskom ekstraktu maline sa područja Vlasine. Naši rezultati su uporedivi sa literaturnim podacima. Sadržaj polifenola u 4 sorte malina gajenih u Grčkoj kreće se od 10,52 do 24,94 mg/g su.v. (*Pantelidis i sar., 2007*), odnosno u tri sorte malina gajenih u Finskoj kreće se od 27,3 do 29,9 mg/g su.v. (*Kähkönen i sar., 2001*).

Ukupni *flavonoidi* u acetonskim ekstraktima se kreću od 5,23 do 5,99 mg/g su.v., sa procentnom zastupljenosti od 33,53 do 37,81% u odnodu na sadržaj ukupnih fenola.

Ispitivanje *antioksidativne aktivnosti* ekstrakata uzoraka suve maline gajenih na tri različita područja su pokazala da ova vrednost u acetonu iznosi 97,5 µmol TE/g su.v. i veća je od antioksidativne aktivnosti suve ribizle (69,95 µmol TE/g su.v.), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (*Jakobek i sar., 2007b*).

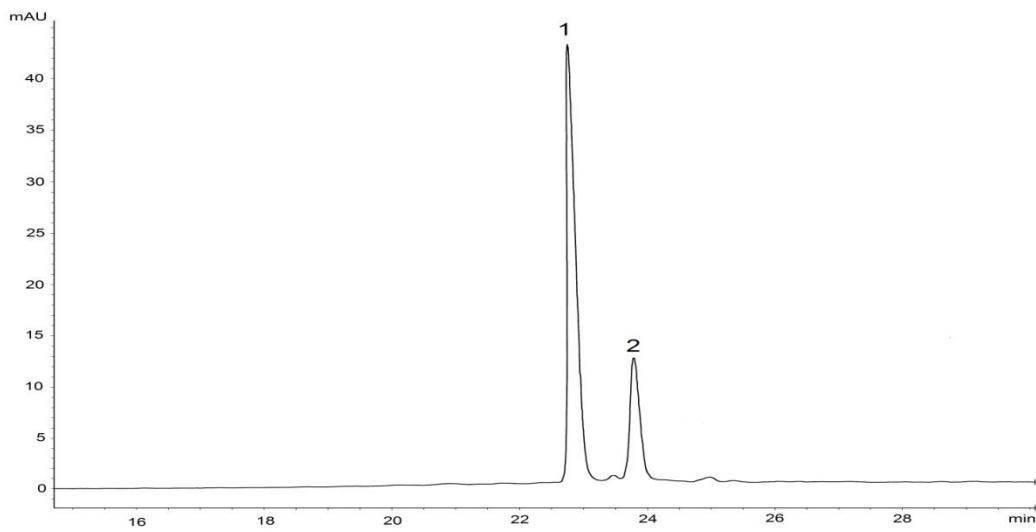
Tabela 4.37. Sadržaj ukupnih fenola (TP), flavonoida (TF) i antioksidativne aktivnosti (TAA) ekstrakata maline u različitim rastvaračima.

TP ¹ (mg GAE/g suvog voća)	Malina Velika Plana	Malina Niška Banja	Malina Vlasina
Metanol	14,65±0,13 ⁴ a ^{5,a⁶}	13,90±0,30 b,a	15,62±0,13 c,a
Etanol	9,82±0,08 ac,b	8,97±0,11 b,b	9,92±0,09 c,b
Aceton	15,84±0,08 a,c	14,36±0,13 b,c	16,73±0,09 c,c
TF ² (mg CE/g suvog voća)	Malina Velika Plana	Malina Niška Banja	Malina Vlasina
Metanol	4,95±0,11 ac,a	4,62±0,12 b,a	5,18±0,11 c,a
Etanol	4,36±0,18 ac,b	3,69±0,09 b,b	4,12±0,07 c,b
Aceton	5,99±0,15 a,c	5,23±0,13 b,c	5,61±0,08 c,c
TAA ³ (μmol TE/g suvog voća)	Malina Velika Plana	Malina Niška Banja	Malina Vlasina
Metanol	90,62±2,25 a,a	85,37±2,19 b,ac	96,94±0,25 c,a
Etanol	57,62±1,17 ac,b	53,28±0,37 b,b	56,36±0,63 c,b
Aceton	100,48±1,03 a,c	86,50±0,69 b,c	105,52±1,03 c,c

¹mg ekvivalenta galne kiseline/g suvog voća; ²mg katehin ekvivalenta/g suvog voća; ³mmol troloks ekvivalenta/g suvog voća; ⁴srednja vrednost ± SD (n=3); ⁵brojevi označeni različitim slovima u koloni (za jednu grupu jedinjenja, za jedan uzorak u različitim rastvaračima) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05); ⁶brojevi označeni različitim slovima u redu (za jednu grupu jedinjenja, za različite uzorke u istom rastvraču) se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, (p<0,05).

4.1.8.2. HPLC određivanje antocijana, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u malini

Kao što se može videti sa hromatograma (slika 4.48) jasno se uočavaju izraženi pikovi za: cijanidin-3-soforozid (1) i cijanidin-3-glukozid (2).



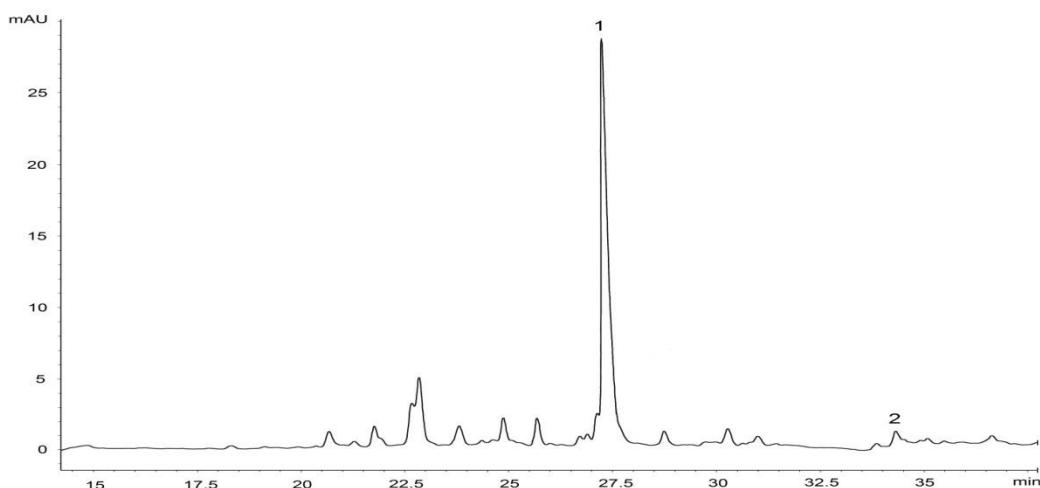
Slika 4.48. HPLC hromatogram antocijana (520 nm) u metanolnom ekstraktu uzorka maline iz Niške Banje: cijanidin-3-soforozid (1), cijanidin-3-glukozid (2).

Iz tabele 4.38. se može uočiti da je u ekstraktima maline najzastupljeniji cijanidin-3-soforozid. Ovaj podatak je u skladu sa rezultatima drugih autora (Seeram i sar., 2006). Sadržaj ukupnih antocijanova u ispitivanim uzorcima maline se kretao od 29,1 mg/100 g su.v. do 42,8 mg/100 g su.v. u metanolnom ekstraktu. Kähkönen i sar. (2001) su za tri sorte malina odredili da sadrže od 170 do 298 mg/100 g su.v. Naši rezultati ukazuju na znatno manji sadržaj antocijana u uzorcima suve maline, što može biti posledica uslova gajenja ali i postupka pripreme suvog voća.

Tabela 4.38. Sadržaj (mg/100g suvog voća)¹ antocijana u ekstraktima maline u različitim rastvaračima.

Uzorak	Rastvarač	Cy-3-soforosid	Cy-3-glukozil-rutinozid	Ukupno
Malina	Metanol	28,4±0.32	11,5±0.09	39,9±0.20
Velika	Etanol	24,1±0.27	9,7±0.08	33,8±0.17
Plana	Aceton	10,8±0.18	5,9±0.02	16,7±0.10
Malina	Metanol	22,3±0.42	6,8±0.04	29,1±0.23
Niška	Etanol	22,0±0.45	6,2±0.04	28,2±0.24
Banja	Aceton	8,6±0.09	3,3±0.03	11,9±0.06
Malina	Metanol	30,5±0.17	12,3±0.07	42,8±0.12
Vlasina	Etanol	28,5±0.38	11,8±0.06	40,3±0.22
	Aceton	12,2±0.12	6,5±0.03	18,7±0.07

¹srednja vrednost ± SD (n=3).



Slika 4.49. HPLC hromatogram flavanola (360 nm) u metanolnom ekstraktu uzorka maline iz Niške Banje: kvercetin (1), kemferol (2).

U tabeli 4.39 prikazani su rezultati odredjivanja flavanola (mg/100g suvog voća) HPLC metodom u uzorcima maline na 360 nm. Na slici 4.49 je dat hromatogram za uzorak ekstrakta maline na 360 nm. HPLC analiza ekstraka crvene ribizle je ukazala na prisustvo kvercetina i kemferola. Miricetin nije identifikovan u ispitivanim uzorcima maline.

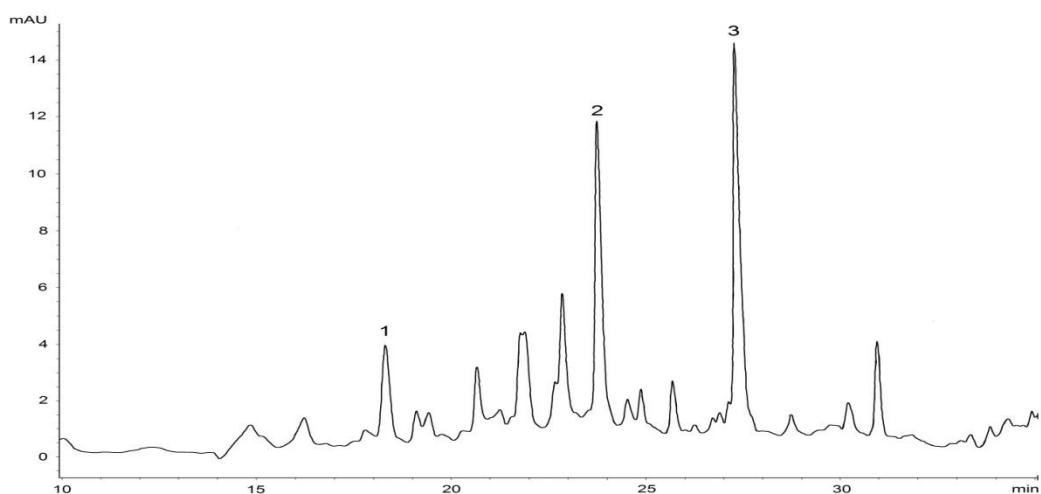
Tabela 4.39. Sadržaj (mg/100g suvog voća)¹ flavanola u ekstraktima maline u različitim rastvaračima.

Uzorak	Rastvarač	Kvercetin	Kemferol	Ukupno
Malina	Metanol	17,22±0,92	1,21±0,12	18,43±0,52
Velika su Plana	Etanol Aceton	16,48±0,95 20,23±0,72	1,13±0,28 1,92±0,35	17,61±0,61 22,15±0,53
Malina Niška Banja	Metanol Etanol Aceton	19,45±0,88 20,35±0,72 25,56±0,65	0,56±0,09 0,47±0,07 1,23±0,09	20,01±0,48 20,82±0,36 26,79±0,37
Malina Vlasina	Metanol Etanol Aceton	14,82±0,73 15,03±0,47 19,30±0,98	0,48±0,05 0,32±0,02 0,63±0,03	15,30±0,39 15,35±0,24 19,93±0,50

¹srednja vrednost ± SD (n=3).

U acetonskom ekstraktu maline – Vlasina određen je najmanji sadržaj ukupnih flavanola (19,93 mg/100 g su.v.), gde je udeo kvercetina iznosio 96,8% od ukupne mase flavanola, dok je u istom ekstraktu maline – Niška Banja određen najveći sadržaj ukupnih flavanola (26,79 mg/100 g s.v.) sa udelom kvercetina od 95,41%. Veoma male količine kemferola, pored predominantnog kvercetina odredili su *Häkkinen i sar.* (1999a), dok većina autora (*Häkkinen i sar.* (1999b), identificuje i kvantificuje samo kvercetin, i njegov sadržaj je reda veličine od 15 do 30 mg/100 g su.v.

U tabeli 4.40 prikazani su rezultati odredjivanja hidroksicinamičnih kiselina (mg/100g suvog voća) HPLC metodom u uzorcima maline na 320 nm. Na slici 4.50 je dat hromatogram za ekstrat maline.



Slika 4.50. HPLC hromatogram hidroksicimetnih kiselina (320 nm) u metanolnom ekstraktu uzorka maline iz Niške Banje: kafena kiselina (1), p-kumarna kiselina (2) i ferulna kiselina(3).

Rezultati pokazuju da najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina imaju maline sa lokacije Velike Plane (23,44 mg/100 g su.v.), dok najmanji sadržaj imaju maline sa lokacije Niške Banje (5,99 mg/100 g su.v.). *Kähkönen i sar.* (2001) su našli da maline sadrže od 16 – 30 mg/100 g su.v. Najzastupljenija hidroksicimetna kiselina u metanolnim ekstraktima malina je ferulna kiselina, koja čini od 40,56 do 45,22% ukupnih hidroksicimetnih kiselina prisutnih u suvoj malini. *Jakobek i sar.* (2007b) su takođe u uzorcima maline odredili prisustvo kafene kiselina, p-kumarne kiseline i ferulne kiseline, pri čemu je najzastupljenija ferulna kiselina sa oko 36,5%.

Tabela 4.40. Sadržaj (mg/100g svog voća)¹ hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima maline u različitim rastvaračima.

Uzorak	Rastvarač	Kafena kiselina	p-kumarna kiselina	Ferulna kiselina	Ukupno
Malina	Metanol	6,39±0,38	7,18±0,12	9,87±0,42	23,44±0,31
Velika Plana	Etanol	6,05±0,72	5,23±0,17	9,43±0,38	20,71±0,42
	Aceton	3,85±0,47	3,42±0,23	5,84±0,22	13,11±0,31
Malina	Metanol	2,38±0,09	8,11±0,28	8,66±0,18	19,15±0,18
Niška Banja	Etanol	2,30±0,12	6,38±0,37	8,61±0,47	17,29±0,32
	Aceton	1,85±0,08	4,14±0,23	6,05±0,32	12,04±0,21
Malina	Metanol	5,73±0,62	7,53±0,19	9,05±0,15	22,31±0,32
Vlasina	Etanol	5,68±0,48	6,98±0,38	8,85±0,38	21,51±0,41
	Aceton	4,93±0,23	5,12±0,42	6,23±0,17	16,28±0,27

¹srednja vrednost ± SD (n=3).

4.2. ISPITIVANJE KINETIKE DEGRADACIJE FENOLNIH JEDINJENJA HIDROKSIL RADIKALIMA

Održivost kvaliteta voća i proizvoda od voća je od velikog interesa, zbog njihove široke upotrebe, što podrazumeva sačuvati njihova antioksidativna svojstva i sačuvati ih od procesa oksidacije. Direktna oksidacija između kiseonika i fenola se ne može odigrati ili je ekstremno spora u kiselim sredinama, uglavnom zbog nepovoljnih termodinamičkih uslova. Međutim, pojedini prelazni metali, naročito gvožđe i bakar mogu promeniti reakcione mehanizme, smanjujući slobodnu energiju reakcije i povećavajući brzinu reakcije. Stoga Fe i Cu mogu odigrati važnu ulogu u prevazilaženju nepovoljnih termodinamičkih uslova i doprineti oksidaciji voća, vina, sokova (Danilewicz, 2003).

Hidroksil radikalni i druge kiseonične reaktivne vrste, uz veoma važnu ulogu bakra i gvožđa u inicijaciji neenzimske oksidacije, mogu biti osnova za razumevanje oksidacije fenolnih jedinjenja prisutnih u voću i proizvodima od voća. U tu svrhu ispitana je:

1. kinetika degradacije antocijana crvenih vina,
2. kinetika degradacije malvidin-3-glukozida i malvidin-3-acetil-glukozida crvenih vina,
3. kinetika degradacije katahina i epikatehina crvenih vina,
4. kinetika degradacije polifenola belih vina,
5. kinetika degradacije antocijana ceđenog soka višnje i
6. kinetika degradacije antocijana ceđenog soka crvene ribizle i maline

hidroksil radikalima koji nastaju u sistemu Cu/H₂O₂ u kiseloj sredini pri pH=3,5 koji je podešen vinskom kiselinom.

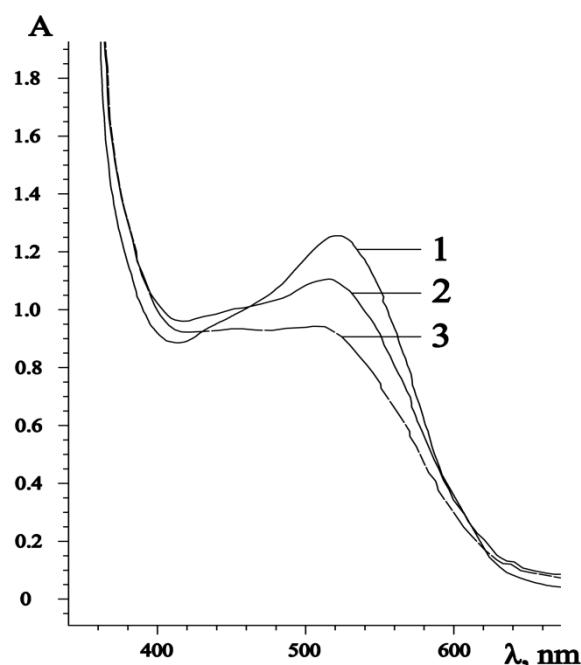
4.2.1. Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije antocijana crvenih vina

Kinetičko-spektrofotometrijska metoda se može primeniti za ispitivanje kinetike reakcije degradacije antocijana crvenih vina. Proučavanje kinetike degradacije antocijana crvenih vina obuhvata određivanje kinetičkih i termodinamičkih parametara proučavanog sistema, a u cilju razrade nove kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje antocijana u crvenim vinima, razvoj i validaciju metode.

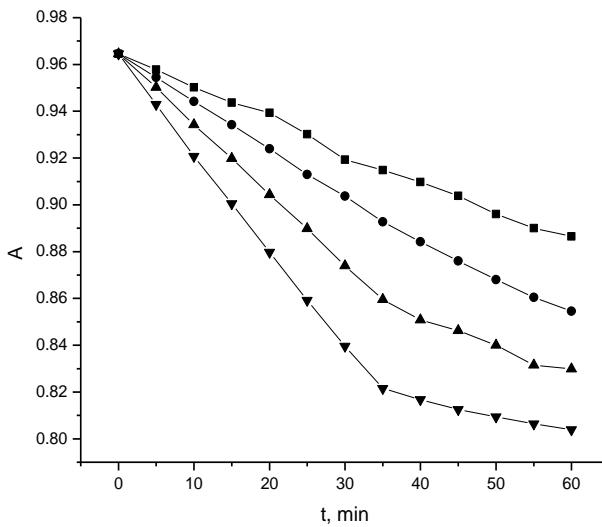
Za ispitivanje kinetike degradacije antocijana u crvenom vinu uzeto je mlado vino Vranac (Rubin-Kruševac).

4.2.1.1. Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema

U vidljivom delu apsorpcionog spektra crvenog vina uočava se apsorpcioni maksimum na 520 nm, koji odgovara antocijanima (slika 4.51, kriva 1). Dodatkom H_2O_2 dolazi do oksidacije antocijana u vinu, što dovodi do smanjenja apsorpcionog maksimuma (slika 4.51, kriva 2). Ako se uz istu koncentraciju vodonik peroksida dodaju i Cu(II) joni, proces oksidacije vina se znatno ubrzava (slika 4.51, kriva 3), pa se stoga može reći da Cu(II) joni pokazuju katalitičko dejstvo u pomenutoj reakciji oksidacije, zbog intenzivnog stvaranja hidroksil radikala, saglasno jednačinama 2.53 i 2.54 u delu 2.3.3.



Slika 4.51. Apsorpcioni spektar: 1) vodenog rastvora vina, 2) vodenog rastvora vina+ H_2O_2 , 3) vodenog rastvora vina+ H_2O_2 +Cu(II). Koncentracije reaktanata u rastvoru: Antocijani – $0.269 \cdot 10^{-3}$ mol/L; H_2O_2 – 0.098 mol/L; Cu(II) – $1,232 \cdot 10^{-4}$ mol/L, pH=3,5; t = $22 \pm 0,1^\circ C$

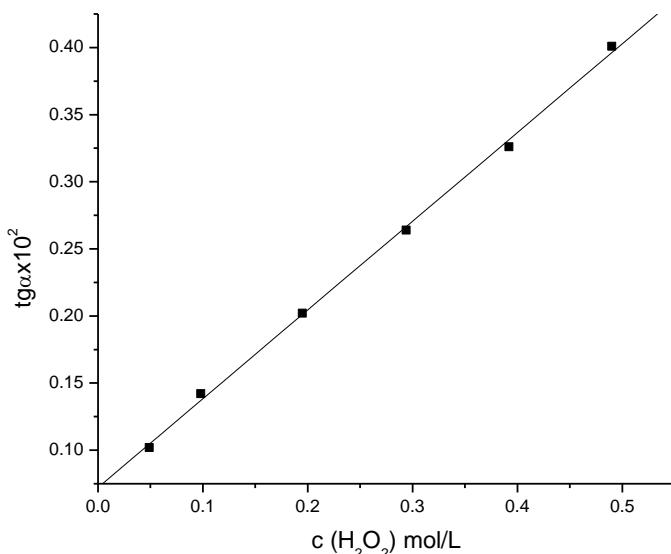


Slika 4.52. Promena apsorbance rastvora sa vremenom za različite temperature: ■- 22°C ; ●- -27°C ; ▲- -32°C . Koncentracije reaktanata u rastvoru: Antocijani – $0,179 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; H_2O_2 – $0,098 \text{ mol/L}$; Cu(II) – $1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, $\text{pH}=3,5$.

Oksidacijom antocijana u crvenom vinu u kiseloj sredini ($\text{pH}=3,5$, podešen vinskom kiselinom), nestaje crvena boja vina i zbog toga je moguće primeniti spektrofotometrijski postupak za praćenje reakcije, odnosno meriti promenu apsorbancije rastvora u funkciji vremena odigravanja reakcije na 520 nm. Za obradu kinetičkih podataka primenjena je diferencijalna varijanta tangensne metode (Perez-Bentito i Silva, 1988), jer je zavisnost između apsorbance rastvora i vremena (t) odigravanja reakcije linearna u toku prvih 40-60 min po mešanju reakcionih komponenti, a nagib kinetičke krive prema apscisi (t_{ga}) je proporcionalan brzini reakcije (slika 4.52). Za vino Vranac (Rubin, Kruševac) pH-diferencijalnom metodom je određeno da sadrži 442,35 mg (M3GE/L) monomernih antocijana, odnosno $0,896 \text{ mol/L}$.

U cilju ispitivanja kinetike i termodinamičkih karakteristika reakcije degradacije antocijana hidroksil radikalima koji nastaju u sistemu $\text{Cu(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$, neophodno je prvo pratiti zavisnosti brzine reakcije od koncentracije svih reaktanata (H_2O_2 , Cu(II) , antocijana u vinu Vranac) i temperature.

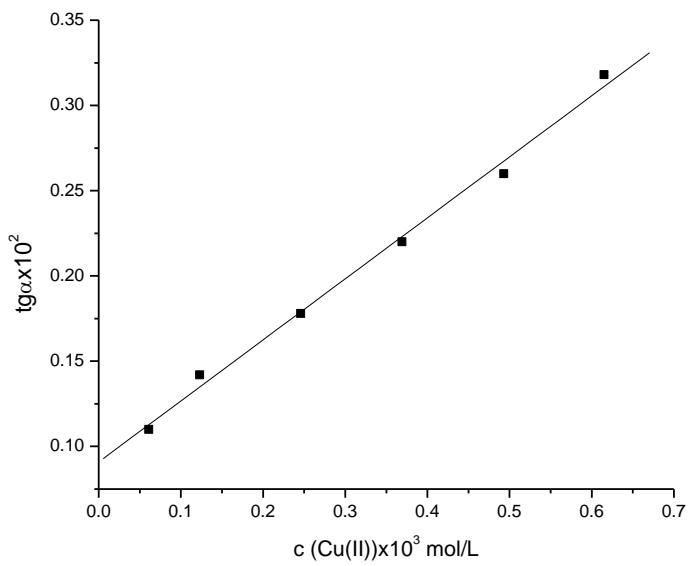
Uticaj koncentracije vodonik peroksida na brzinu reakcije degradacije antocijana u vinu prikazan je na slici 4.53. Iz slike 4.53 se vidi, da između brzine reakcije (nagib kinetičke krive prema apscisi) i koncentracije vodonik peroksida postoji linearna zavisnost, te je reakcija prvog reda u odnosu na koncentraciju H_2O_2 za ispitivani interval koncentracije od 0,049 do 0,490 mol/L. Za dalji rad je korišćen rastvor H_2O_2 koncentracije $0,098 \text{ mol/L}$.



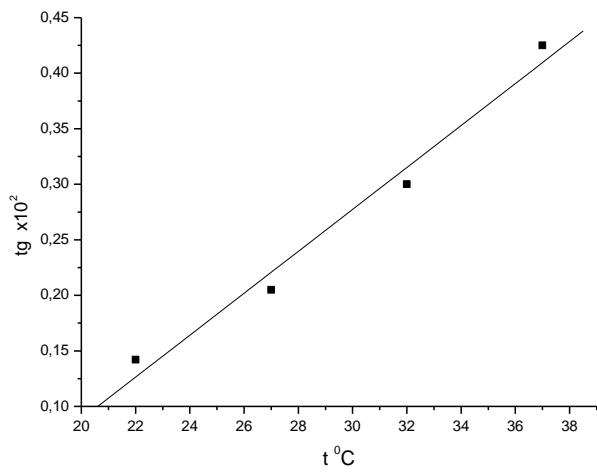
Slika 4.53. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije H_2O_2 . Koncentracije reaktanata u rastvoru: Antocijani - $0.179 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; Cu(II) - $1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 22 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II) jona je prikazana na slici 4.54. Iz ove slike se može videti da postoji linearna zavisnost između brzine reakcije i koncentracije Cu(II) jona te je zbog toga reakcija prvog reda u odnosu na koncentraciju Cu(II) jona, za ispitivani interval od $(0,615-6,150) \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Za dalji rad je korišćen rastvor Cu(II) čija je koncentracija u reakcionoj smeši $1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

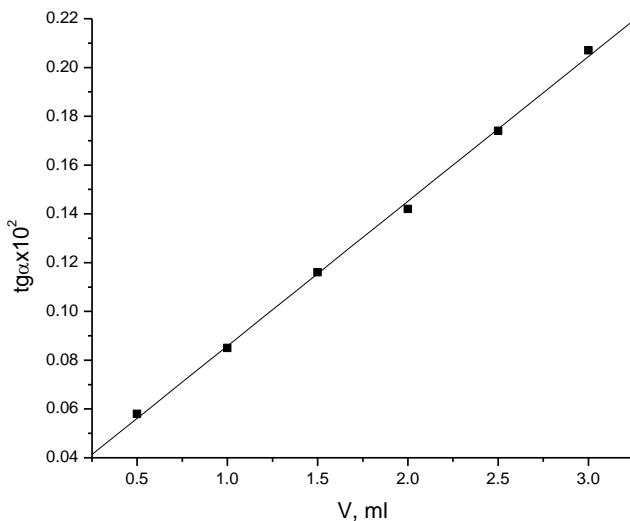
Ispitivanja zavisnosti brzine reakcije degradacije antocijana u vinu od temperature reakcione smeše (slika 4.55), su pokazala da brzina reakcije raste sa povećanjem temperature. Međutim, ako se predstavi zavisnost promene apsorbance rastvora sa vremenom pri različitim temperaturama, pri istim koncentacionim uslovima reaktanata (slika 4.50), uočava se da se sa povećanjem temperature znatno smanjuje vremenski interval u kome postoji linearna zavisnost između apsorbance rastvora i vremena odigravanja reakcije. Zato je najbolje vršiti merenja i ispitivati kinetiku degradacije antocijana hidroksil radikalima pri temperaturama manjim od 30°C , kada još uvek u dovoljno dugom vremenskom intervalu postoji linearost



Slika 4.54. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II). Koncentracije reaktanata u rastvoru: Antocijani - $0.179 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; H_2O_2 - $0,098 \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 22 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 4.55. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije reaktanata u rastvoru: Antocijani – $0.179 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; H_2O_2 – $0,098 \text{ mol/L}$; Cu(II) – $1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$.



Slika 4.56. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $H_2O_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $Cu(II) - 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$, $t = 22 \pm 0,1^\circ C$.

Zavisnost brzine reakcije degradacije od koncentracije antocijana u reakcionaloj smeši prikazana je na slici 4.56. Različite koncentracije antocijana su dobijene odmeravanjem različitih zapremina vina od 0,5 do 3,0 ml. Ukupna zapremina reakcione smeše je 10 ml. Brzina reakcije linerano raste sa povećanjem zapremine vina, odnosno koncentracije antocijana u reakcionaloj smeši, te je reakcija +1 reda u odnosu na koncentraciju antocijana. Slika 4.56. pokazuje ovu zavisnost, pri čemu je određeno da odsečak prave na osu tga iznosi $0,026 \cdot 10^{-2}$.

Na osnovu predhodno iznetih rezultata postavljena je kinetička jednačina za reakciju degradacije antocijana crvenih vina hidroksil radikalima u kiseloj sredini ($pH=3,5$) pri koncentraciji H_2O_2 od 0,049 do 0,490 mol/L i $Cu(II)$ od $0,615 \cdot 10^{-4}$ do $6,150 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{Cu(II)} \cdot c_{antocijani} \quad 4.1$$

Na osnovu poslednje jednačine izračunate su konstante brzine reakcije degradacije antocijana u crvenom vinu Vranac, uzimajući vrednost molarne mase od 493 g/mol i molarnog apsorpcionog koeficijenta od $28\,000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ za malvidin-3-glukozid (tabela 4.41), kao komponente čiji je sadržaj dominantan u odnosu na sadržaj svih ostalih antocijana prisutnih u crvenim vinima (tabela 4.14).

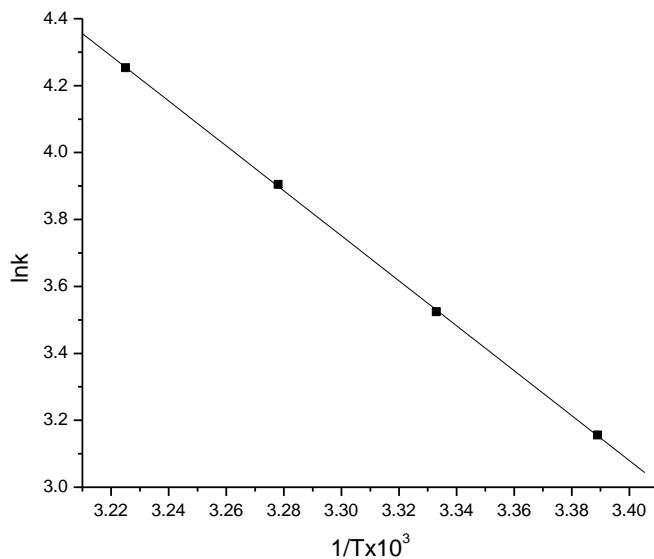
Tabela 4.41. Konstante brzine reakcije degradacije antocijana u crvenom vinu hidroksil radikalima na različitim temperaturama.

t°C	k ¹ , mol ² dm ⁻⁶ min ⁻¹
22	23,49±0,005 ¹
27	33,91±0,007
32	49,63±0,010
37	70,31±0,009

¹srednja vrednost ± SD (n=5).

Ukoliko se predstavi logaritam konstante brzine reakcije u funkciji recipročne vrednosti apsolutne temperature dobija se prava prikazana na slici 4.57, iz čijeg nagiba se može izračunati energija aktivacije E_a primenom jednačine (2.2):

$$E_a = \text{tg}\alpha \cdot 19,14 \text{ [kJmol}^{-1}] \quad 4.2$$



Slika 4.57. Zavisnost ln k od recipročne vrednosti apsolutne temperature.

Ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK^{*} vrednost aktiviranog kompleksa izračunati su primenom sledećih jednačina:

$$\Delta H^* = E_a - nR T \quad 4.3$$

gde je n – molekularnost,

odnosno,

$$\Delta H^* = E_a - R T \quad \text{za reakcije u rastvorima}$$

$$\Delta S^* = 19,14 (\log k - \log T - 10,3178 + \Delta H^*/19,14 T) \quad 4.4$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad 4.5$$

$$pK^* = \Delta G^*/19,14T \quad 4.6$$

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara aktiviranog stanja, primenom jednačina 4.2 – 4.6 prikazane su u tabeli 4.42.

Tabela 4.42. Termodinamički parametri aktiviranog kompleksa reakcije degradacije antocijana u crvenom vinu hidroksil radikalima na 295K.

Ea (kJmol ⁻¹)	ΔH [*] (kJmol ⁻¹)	ΔS [*] (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG [*] (kJmol ⁻¹)	pK [*]
56,37	53,91	-35,52	64,39	11,40

4.2.1.2. Validacija kinetičko-spektroforometrijske metode za određivanje antocijana crvenih vina

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, limita kvantifikacije, tačnosti i preciznosti metode.

Linearost

Uticaj antocijana na brzinu reakcije praćen je pri predhodno odabranim uslovima odigravanja reakcije pri temperature od 22°C. Različite koncentracije antocijana dobijene su odmeravanjem različitih zapremina vina Vranac, čije su koncentracije određene *metodom unutrađnjeg standarda (Kaštelan-Macan, 2003)*. Tangens ugla odsečka određen je na osnovu zavisnosti prikazane na slici 4.56, i on iznosi $0,026 \cdot 10^{-2}$. Koncentracija antocijana u dатој заприми crvenog vina određena je na osnovu zavisnosti date na slici 4.58, i na osnovu jednačine:

$$c_x = \frac{\operatorname{tg} \alpha_{uz.} - \operatorname{tg} \alpha_{ods.}}{\operatorname{tg} \alpha_{uz.+st.} - \operatorname{tg} \alpha_{uz.}} \cdot c_{st.} \quad 4.7$$

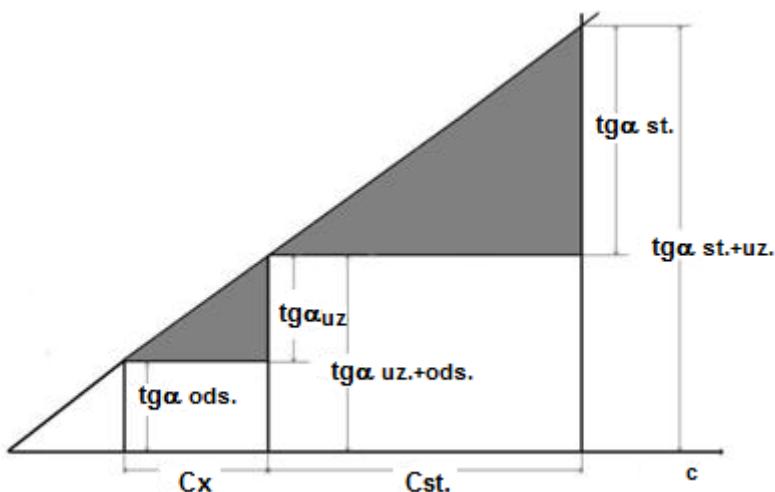
gde je: c_x - koncentracija antocijana u uzorku

c_{st} - koncentracija dodatog standarda (Mv-3-G)

$\operatorname{tg} \alpha_{ods}$ - tangens α odsečka kalibracione prace za $c=0$

$\operatorname{tg} \alpha_{uz}$ - tangens α uzorka

$\operatorname{tg} \alpha_{uz+st}$ - tangens α uzorka sa standardom

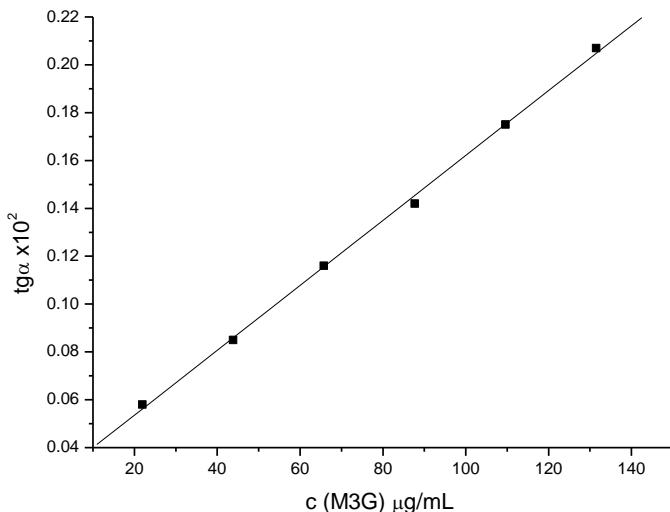


Slika 4.58. Grafički prikaz metode unutrašnjeg standarda.

Metodu unutrašnjeg standarda za određivanje komponenti u uzorcima vina koristili su i drugi autori (Kordiš-Krapež i sar. 2001). Na osnovu izračunatih vrednosti za antocijane u reakcionoj smeši, dobivena je linearna zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana u intervalu od 21,92 do 131,52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (slika 4.59), koja se može predstaviti jednačinom:

$$\operatorname{tg} \alpha = 0,001356 \cdot c_x + 0,02641 \quad 4.8$$

$$r = 0,998 \quad s_o = 0,0025$$



Slika 4.59. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $\text{Cu(II)} - 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $\text{H}_2\text{O}_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $p\text{H}=3,5$, $t = 22 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (c_L) i limit kvantifikacije (c_Q) izračunat je na osnovu jednačina 2.46 i 2.47.

Dobijene vrednosti su 6,08 i 18,44 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Preciznost i tačnost metode određivanja antocijana u crvenim vinima

Preciznost metode je određena odmeravanjem iste zapremine vina (1,0 ml) bez i sa dodatkom M3G (20,0; 30,0 i 50,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) iz pet ponavljanja. Za svaku reakcionu smešu izračunata je relativna standardna devijacija (RSD). Rezultati dobiveni statističkom obradom podataka dati su u tabeli 4.43.

Tabela 4.43. Preciznost određivanja antocijana u crvenim vinima.

Dodata Mv-3-G ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Ukupno antocijana ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD (n=5) %
0	43,36	3,88
20,0	63,13	2,34
30,0	73,16	2,99
50,0	93,36	2,43

Tačnost metode je definisana odnosom određene i dodate koncentracije standardnog rastvora Mv-3-G u istoj zapremini vina iz pet merenja. Izračunata je relativna greška, a rezultati prikazani u tabeli 4.44.

Tabela 4.44. Tačnost određivanja antocijana u crvenim vinima.

Dodato Mv-3-G (µg/ml)	odredeno Mv-3-G (µg/ml)	RG %
20,0	20,34	5,35
40,0	40,66	3,73
60,0	60,40	2,16

Rezultati iz tabela 4.43 i 4.44 pokazuju da se antocijani u crvenim vinima predloženom kinetičkom metodom mogu određivati sa zadovoljavajućom preciznošću i tačnošću.

Primena metode za određivanje antocijana

Predložena metoda je primenjena za određivanje sadržaja antocijana u crvenim vinima. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima koji su dobijeni HPLC metodom. Rezultati određivanja antocijana u crvenim mladim vinima prikazani su u tabeli 4.45.

Tabela 4.45. Određivanje sadržaja (mg/L)^{1,2} antocijana u crvenim vinima kinetičko-spektrofotometrijskom i HPLC metodom.

Vino	Kinetičko-spektrofotometrijska metoda	HPLC metoda	t- test ³	F- test ³
Vranac-Aleksandrovac	355,74±6,63	349,79±2,77	1,79	5,39
Crnogorski Vranac	462,81±5,95	457,81±2,83	1,69	4,41
Makedonsko crveno	399,76±6,00	394,21±2,85	1,87	4,43

¹srednja vrednost ± SD (n=5); ²mg malvidin-3-glukozid ekvivalenta/L vina; ³tabelarne F- i t-vrednosti pri 95%-nom nivou poverenja su 6,39 i 2,306.

Vrednosti F-testa i Studentovog t-testa pokazale su da nema značajnije razlike u rezultatima dobijenim kinetičko-spektrofotometrijskom i HPLC metodom za sve uzorake ($F_{eksp.} < F_{tab.}$ i $t_{eksp.} < t_{tab.}$), pa se može zaključiti da se razrađena kinetičko-spektrofotometrijska metoda može uspešno primeniti za oredjivanje sadržaja antocijana u crvenim vinima.

4.2.2. Ispitivanje kinetike reakcije degradacije antocijana crvenih vina HPLC metodom

Efekat temperature (*Verbeyst i sar., 2010, Ahmed i sar., 2004*) i H_2O_2 (*Özkan i sar., 2002*) na stabilnost antocijana je dobro ispitana. Međutim, istovremeni efekat Cu(II), H_2O_2 i temperature na stabilnost antocijana do sada nije ispitivan, a takođe i uticaj pomenutih faktora na stabilnost najzastupljenih antocijana u vinu malvidin-3-glukozida i malvidin-3-acetyl-glukozida. U daljem radu praćena je promena sadržaja malvidin-3-glukozida (Mv-3-G) i malvidin-3-acetyl-glukozida (Mv-3-AG) sa vremeom pod uticajem Cu(II), H_2O_2 i temperature HPLC metodom.

4.2.2.1. Validacija HPLC metode za određivanje Mv-3-G

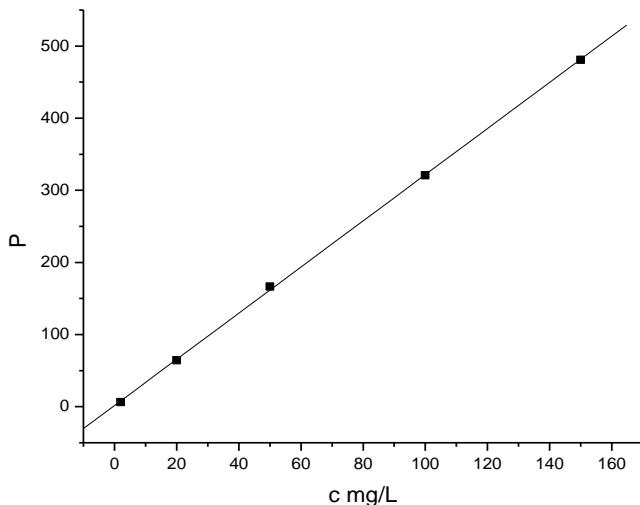
Pri validaciji HPLC metode za određivanje Mv-3-G vršeno je određivanje sledećih parametara: intervala linearnosti, limita detekcije, limita kvantifikacije, tačnosti i preciznosti.

Linearost

Određena je linearost površine pika za Mv-3-G prema njegovoj koncentraciji. Rastvori za linearnost su injektovani tri puta. Rastvori standarda za linearnost odgovaraju sadržaju od 2,0 do 150 mg/L. Na slici 4.60 prikazana je linearna zavisnost odgovora pika Mv-3-G (površina pika) prema njegovoj koncentraciji ($R^2=0,999$, nagib prave = 3,207)

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (c_L) i limit kvantifikacije (c_Q) izračunati su na osnovu jednačina 2.46 i 2.47. Standardna devijacija y-odsečka regresione linije za kalibracionu pravu koja pokriva područje od 2,0 do 150 mg/L je 0,508 za Mv-3-G. Ova vrednost je korišćena kao standardna devijacija odgovora. Izračunata vrednost za c_L je bila 0,52 mg/L, dok je za c_Q iznosila 1,58 mg/L.



Slika 4.60. Linearna zavisnost površine pika od koncentracije Mv-3-G.

Preciznost i tačnost HPLC metode

Preciznost i tačnost HPLC metode određene su za prvu koncentraciju sa kalibracione prave iz pet uzastopnih merenja (1) i pet merenja iste koncentracije Mv-3-G u toku jednog meseca sa vremenskim razmakom od 5 dana (2) pri istim uslovima i na istom aparatu (tabela 4.46). Relativna standardna devijacija u prvom slučaju iznosi 3,80, a u drugom 7,58%.

Tabela 4.46. Preciznost i tačnost HPLC metode.

Odmereno $\mu(\mu\text{g/ml})$	Nađeno(1) $x \pm SD^1$ $\mu\text{g/ml}$	Nađeno(2) $x \pm SD^1$ $\mu\text{g/ml}$	RSD(1) %	RSD(2) %	$(x - \mu)/\mu \cdot 100$ (1) %	$(x - \mu)/\mu \cdot 100$ (2) %
2,0	1,99 \pm 0,08	2,05 \pm 0,16	3,80	7,58	-0,10	+2,62

¹srednja vrednost \pm SD (n= 5).

4.2.2.2. Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema

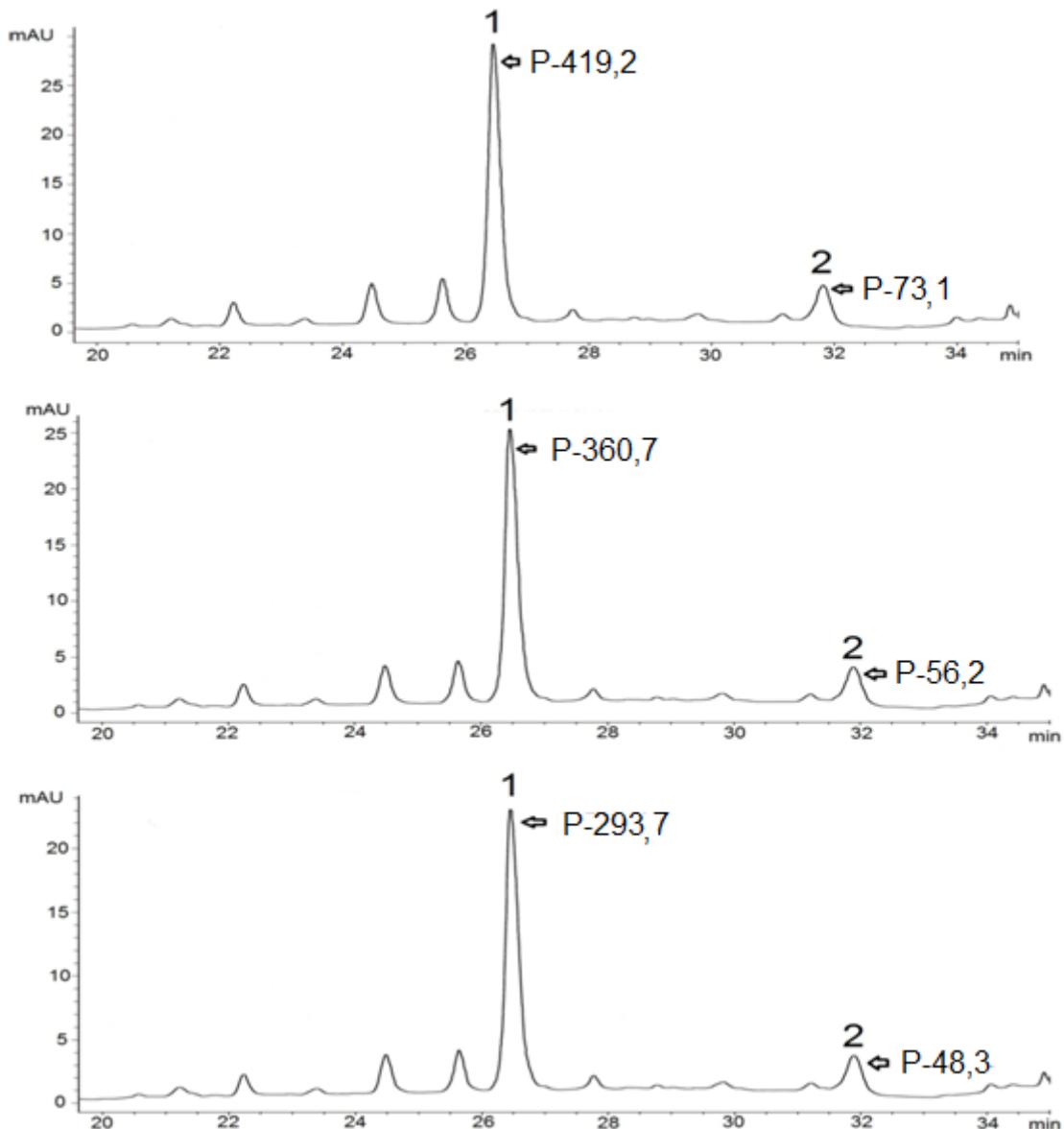
Mlado crveno vino Vranac (Rubin, Kruševac), koje je korišćeno za ispitivanje kinetike degradacije antocijana spektrofotometrijskom metodom, korišćeno je i za ispitivanje kinetike degradacije individualnih antocijana, tačnije malvidin-3-glukozida i malvidin-3-acetylglukozida, najzastupljenijih antocijana HPLC metodom. HPLC metodom je određeno da vino Vranac sadrži 281,31 mg/L Mv-3-G i 44,36 mg/L Mv-3-AG.

Da bi se pratila promena antocijana HPLC metodom bio je potreban znatno duži vremenski period (oko 180 min) u odnosu na spektrofotometrijsku metodu, pa je to bio razlog smanjenja početnih koncentracija H_2O_2 i Cu(II) jona i snimanja HPLC hromatograma u toku prvih 35 min po inektiranju. Početne koncentracije Mv-3-G i Mv-3-AG određene su na osnovu površine pikova ovih komponenti crvenog vina istog razblaženja (1:2), odnosno 140,65 mg/L Mv-3-G i 22,18 mg/L Mv-3-AG, što odgovara koncentraciji od $2,85 \cdot 10^{-4}$ mol/L, odnosno $4,49 \cdot 10^{-5}$ mol/L preračunato na molarnu masu Mv-3-G.

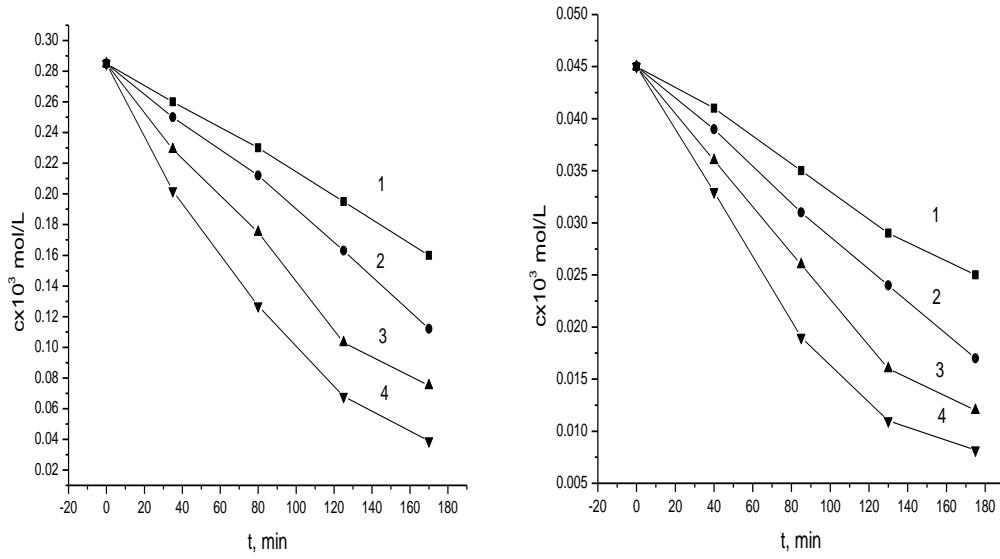
U cilju izučavanja kinetike degradacije antocijana snimljeni su hromatogrami sistema vino, vino+ H_2O_2 i vino+ $H_2O_2+Cu(II)$ u 35 min nakon pripremanja reakcionog rastvora. Dobijeni hromatogrami prikazani su na slici 4.28. Sa prikazanih hromatograma se uočava da se površine pikova za Mv-3-G (pik 1) i Mv-3-AG (pik 2) smanjuju u prisustvu H_2O_2 , što ukazuje na proces njihove oksidacije pod uticajem ovog oksidansa (slika 4.61, hromatogram 2). Kada se reakcionaloj smeši pored vodonik peroksida dodaju i Cu(II) joni, uočeno je da se proces oksidacije znatno ubrzava (slika 4.61, hromatogram 3), što ukazuje na katalitički efekat Cu(II) jona u reakciji stvaranja hidroksil radikala.

Praćenjem promene površine pikova, odnosno koncentracije Mv-3-G i Mv-3-AG sa vremenom u sistemu koji sadrži vino, H_2O_2 i Cu(II) jone, uočeno je linearno smanjenje koncentracije sa vremenom u toku prvih 120-180 min odigravanja reakcije degradacije (4.62), pa se mogla primeniti metoda inicijalne brzine. U cilju ispitivanja kinetike degradacije Mv-3-G i Mv-3-AG, ispitana je uticaj koncentracije reagujućih komponenata i temperature na brzinu reakcije degradacije. pH reakcionalih smeša bio je 3,5 (podešen vinskom kiselinom).

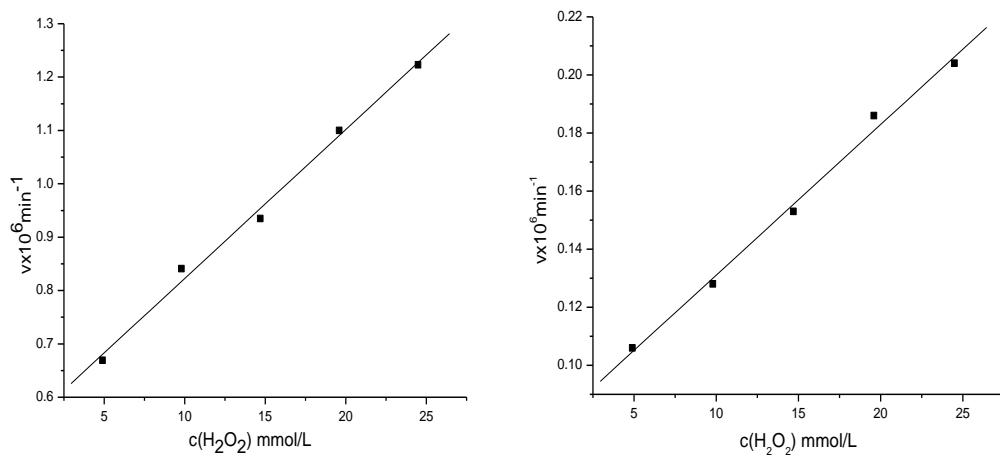
Zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik-peroksida u intervalu od 4,90 do 24,48 mmol/L prikazana je na slici 4.63. Brzine reakcija rastu sa povećanjem koncentracije ovog reaktanta, te su obe reakcije +1 reda u odnosu na H_2O_2 u ispitivanom intervalu koncentracija. Dalja merenja su vršena pri koncentraciji H_2O_2 od 14,69 mmol/L.



Slika 4.61. Hromatogram antocijana reakcione smeše 35 min nakon pripremanja: (1) vino+voda; (2) vino+ H_2O_2 +voda; (3) vino+ H_2O_2 +Cu(II)+voda. Pik 1- Mv-3-G, pik 2 -Mv-3-AG. Koncentracije reaktanata u rastvoru: Mv-3-G - $2,85 \cdot 10^{-4}$ mol/L ili Mv-3-AG - $4,49 \cdot 10^{-5}$ mol/L; Cu(II) - $1,85 \cdot 10^{-5}$ mol/L; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3}$ mol/L; pH=3,5; t = $25 \pm 0,1^\circ C$.

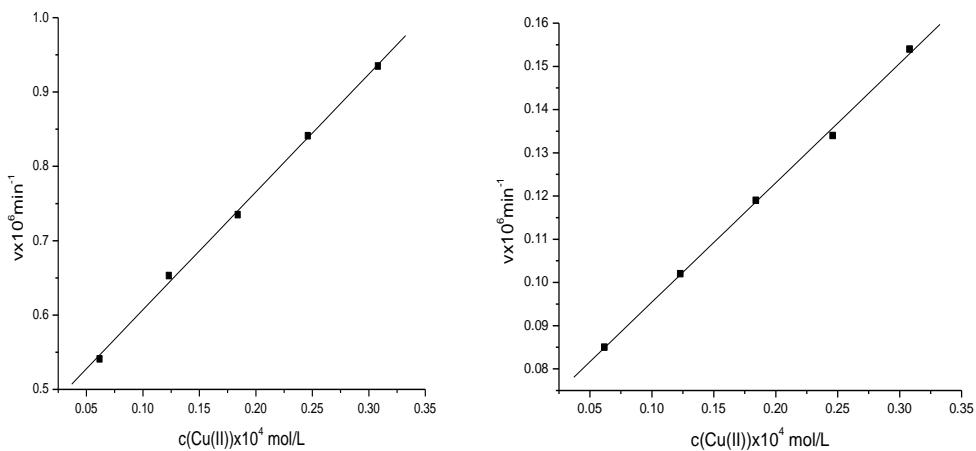


Slika 4.62. Promena apsorbance rastvora sa vremenom za različite temperature: ■- 25°C ; ●- -30°C ; ▲- -35°C ; ▼- -40°C ; a) za Mv-3-G, b) za Mv-3-AG. Koncentracije reaktanata u rastvoru: Mv-3-G - $2,85 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ili Mv-3-AG - $4,49 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; Cu(II)- $1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; $\text{pH}=3,5$.



Slika 4.63. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije H_2O_2 za Mv-3-G (a) i Mv-3-AG (b). Koncentracije reaktanata u rastvoru: Mv-3-G - $2,85 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ili Mv-3-AG - $4,49 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; Cu(II) - $3,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; $\text{pH}=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

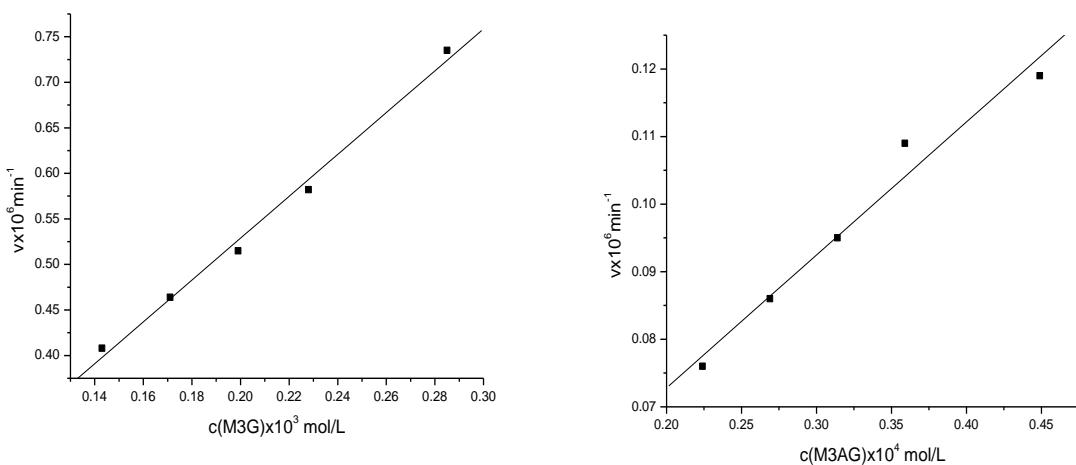
Uticaj koncentracije Cu(II) na brzinu reakcije degradacije Mv-3-G i Mv-3-AG hidroksil radikalima je posmatran u intervalu od $0,615 \cdot 10^{-5}$ do $3,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ (slika 4.64). Brzina reakcija raste sa povećanjem koncentracije ovog reaktanta. Reakcije su +1 reda u odnosu na Cu(II) u ispitivanom intervalu koncentracija. Koncentracija Cu(II) od $1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ je odabrana za dalji rad.



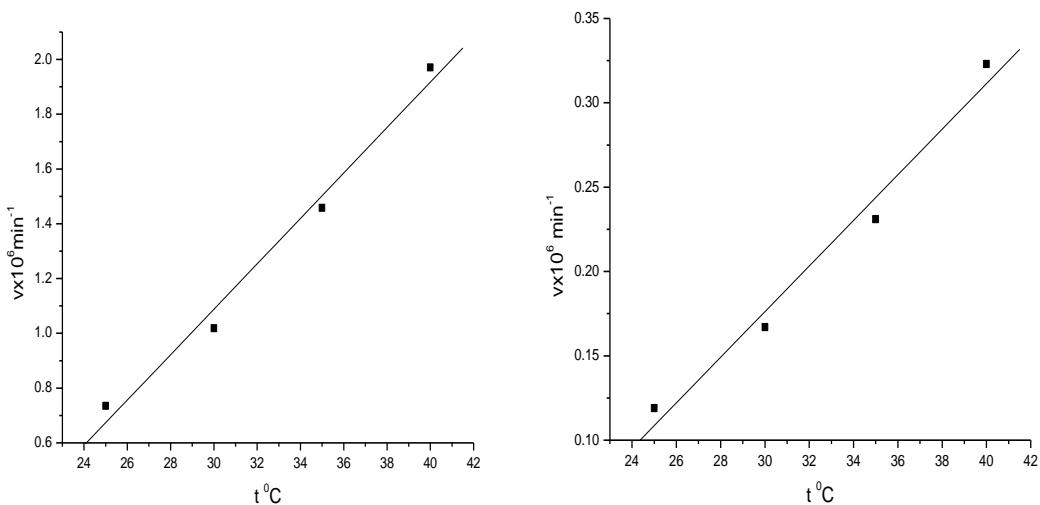
Slika 4.64. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II) za Mv-3-G (a) i Mv-3-AG (b). Koncentracije reaktanata u rastvoru: Mv-3-G - $2,85 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ili Mv-3-AG - $4,49 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; $p\text{H}=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Uticaj koncentracije M3G i M3AG (odmeravanjem različitih zapremina vina u reakcionu smešu koja je termostatirana na zadatoj temperaturi) na brzinu reakcije degradacije praćen je pri predhodno odabranim uslovima: $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 14,69 \text{ mmol/L}$; $c(\text{Cu(II)}) = 1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Dobijena je linearna zavisnost u intervalu koncentracija od $1,425 \cdot 10^{-4}$ do $2,850 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ za Mv-3-G i $2,245 \cdot 10^{-5}$ do $4,490 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ za Mv-3-AG (slika 4.65).

Brzine ispitivanih reakcija praćene su pri odabranim uslovima na četiri temperature: 25, 30, 35 i 40°C . Dobijene zavisnosti $c = f(t)$ su za temperature od 25 i 30°C linearne u celom ispitivanom vremenskom intervalu (slika 4.62), dok se na temperaturama od 35 i 40°C ovaj interval smanjuje. Grafičke zavisnosti brzine reakcije degradacije Mv-3-G i Mv-3-AG od temperature prikazane su na slici 4.66.



Slika 4.65. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Mv-3-G (a) i Mv-3-AG (b). Koncentracije reaktanata u rastvoru: Cu(II) - $1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 4.66. Zavisnost brzine reakcije od temperature za Mv-3-G (a) i Mv-3-AG (b). Koncentracije reaktanata u rastvoru: Mv-3-G - $2,85 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ili Mv-3-AG - $4,49 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; Cu(II) - $1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; pH=3,5; t = $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Na osnovu predhodno dobijenih zavisnosti brzina reakcija degradacije Mv-3-G i Mv-3-AG od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, kao i određivanog reda reakcije u odnosu na koncentraciju svakog reaktanta pojedinačno, mogu se postaviti kinetičke jednačine ovih procesa:

$$-\frac{dc}{dt} = k_{\text{M3G}} \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{Cu(II)}} \cdot c_{\text{Mv-3-G}} \quad 4.9$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_{M3AG} \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{Cu(II)} \cdot c_{Mv-3-AG} \quad 4.10$$

za interval koncentracija: $H_2O_2 = (4,90 - 24,48) \cdot 10^{-3}$ mol/L; $Cu(II) = (0,615 - 3,08) \cdot 10^{-5}$ mol/L; $Mv-3-G = (1,425 - 2,850) \cdot 10^{-4}$ mol/L, odnosno $Mv-3-AG = (2,245 - 4,490) \cdot 10^{-5}$ mol/L.

gde je: $-dc/dt$ – promena koncentracije antocijana; k_{M3G} i k_{M3AG} konstante brzine reakcije degradacije $Mv-3-G$, odnosno $Mv-3-AG$.

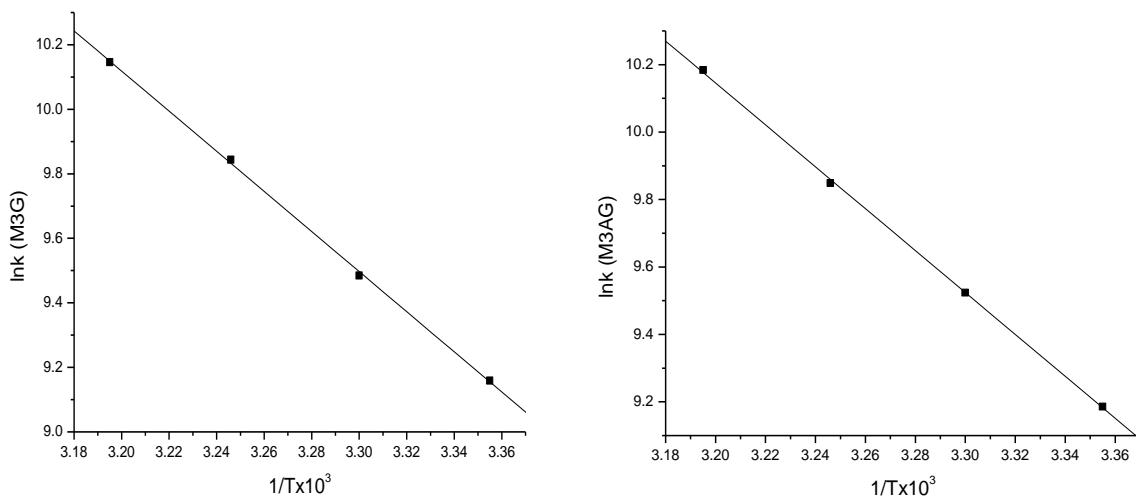
Na osnovu kinetičkih jednačina (4.9 i 4.10) izračunate su konstante brzine reakcija na četiri različite temperature (tabela 4.47).

Tabela 4.47. Konstante brzine reakcija degradacije $Mv-3-G$ i $Mv-3-AG$ u crvenom vinu hidroksil radikalima na različitim temperaturama.

t $^{\circ}\text{C}$	k^1 ($Mv-3-G$) $\text{mol}^{-2}\text{dm}^{-6}\text{min}^{-1}$	k^1 ($Mv-3-AG$) $\text{mol}^{-2}\text{dm}^{-6}\text{min}^{-1}$
25	$0,951 \times 10^4$	$0,976 \times 10^4$
30	$1,316 \times 10^4$	$1,369 \times 10^4$
35	$1,884 \times 10^4$	$1,895 \times 10^4$
40	$2,547 \times 10^4$	$2,649 \times 10^4$

$\overline{\text{srednja vrednost (n=5)}}$

Energije aktivacije, a potom i ostali termodinamički parametri reakcija degradacije antocijana u crvenom vinu hidroksil radikalima određeni su na osnovu vrednosti nagiba pravih prikazanih na slici 4.67.



Slika 4.67. Zavisnost $\ln k$ od recipročne vrednosti absolutne temperature za $Mv-3-G$ (a) i $Mv-3-AG$ (b).

Vrednosti izračunatih termodinamičkih parametara reakcija degradacije aktiviranog kompleksa, primenom jednačina 4.2-4.6, date su u tabeli 4.48.

Tabela 4.48. Termodinamički parametri reakcija degradacije Mv-3-G i Mv-3-AG u crvenom vinu hidroksil radikalima na 298K.

sistem	Ea (kJmol ⁻¹)	ΔH [*] (kJmol ⁻¹)	ΔS [*] (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG [*] (kJmol ⁻¹)	pK [*]
Mv-3-G+H ₂ O ₂ +Cu(II)	57,70	55,22	16,59	60,16	10,55
Mv-3-AG+H ₂ O ₂ +Cu(II)	57,74	55,26	16,94	60,31	10,57

4.2.3. Ispitivanje kinetike reakcije degradacije flavan-3-ola crvenih vina HPLC metodom

Katehini i njegovi polimeri su glavni nosioci ukusa crvenih vina. Izvori gorčine i astrigencije su pre svega monomeri katehina (*Singleton i sar., 1992*). Mlada crvena vina bogatija su monomernim anrocijanima, a siromašnija u taninima. Po mišljenju mnogih autora ta vina su bolji izvor antioksidanata od starih vina (*Pellegrini i sad., 1998*). Takođe, mnogi autori tvrde da je korelacija između sadržaja antocijana i antioksidativnog potencijala crvenih vina niska (*Burns i sar., 2000*), a kao snažni antioksidanti navode se katehin, epikatehin i proantocijanidi (*Anis i sar., 2002*). Ispitivanjem antioksidativnog delovanja epikatehina konstatovano je da epikatehin pod dejstvom slobodnih radikala biva konvertovan u jedinjenja slična antocijanima, koja takođe imaju antioksidativnu funkciju. Slika 2.32 prikazuje reakciju oksidacije katehina kiseonikom u prisustvu Cu(II) jona. Mi smo takođe ispitivali kinetiku degradacije katehina i epikatehina da bi se potvrdilo da su oni dobri „hvatači“ slobodnih radikala, tačnije hidroksil radikala koji nastaju u sistemu Cu(II)/H₂O₂. Mlado crveno vino Vranac je korišćeno za ispitivanje kinetike degradacije katehina i epikatehina. HPLC metodom je određeno da vino Vranac sadrži 25,60 mg/L katehina i 18,24 mg/L epikatehina.

4.2.3.1. Validacija HPLC metode za određivanje katehina i epikatehina

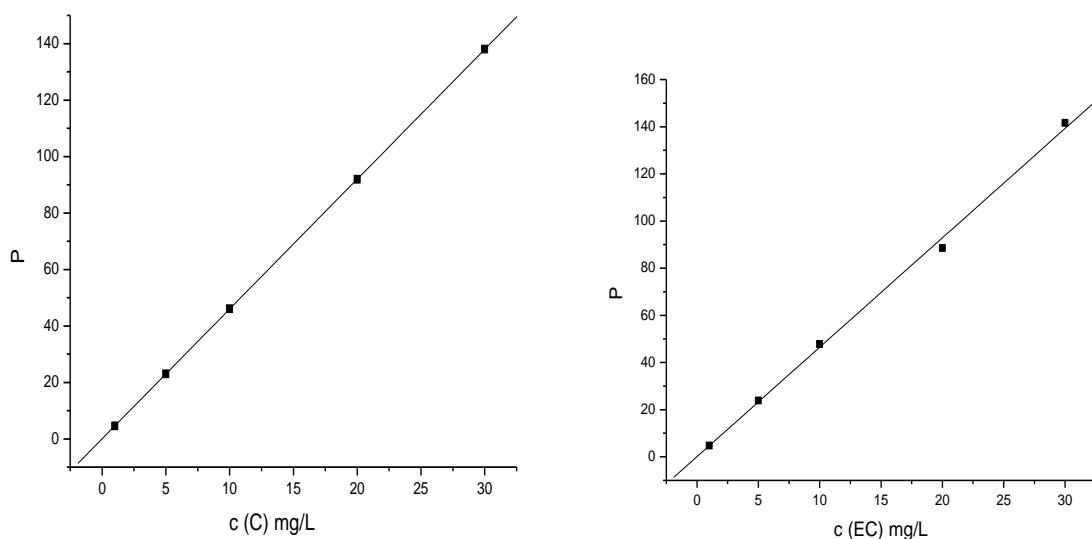
Pri validaciji HPLC metode za određivanje katehina i epikatehina vršeno je određivanje sledećih parametara: intervala linearnosti, limita detekcije, limita kvantifikacije, tačnosti i preciznosti.

Linearost

Određena je linearost površine pika za katehin i epikatehin prema njihovoj koncentraciji. Rastvori za linearost su injektovani tri puta. Rastvori standarda za linearost odgovaraju sadržaju od 1,0 do 30,0 mg/L za katehin i za epikatehin. Na slici 4.68 prikazana je linearna zavisnost površine pika katehina ($R^2=0,999$, nagib prave = 4,598) i epikatehina ($R^2=0,998$, nagib prave = 4,639) prema njegovoj koncentraciji.

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (c_L) i limit kvantifikacije (c_Q) izračunati su na osnovu jednačina 2.46 i 2.47. Standardna devijacija y-odsečka regresione linije za kalibracionu pravu koja pokriva područje od 1,0 do 30 mg/L je 0,320 za katehin i 0,393 za epikatehin. Ove vrednosti su korišćene kao standardne devijacije odgovora. Izračunate vrednosti za c_L i c_Q su 0,23 i 0,69 µg/ml za katehin, odnosno 0,28 i 0,85 µg/ml za epikatehin.



Slika 4.68. Zavisnost površine pika od koncentracije katehina (a) i epikatehina.

Preciznost i tačnost HPLC metode

Preciznost i tačnost HPLC metode određene su za jednu koncentraciju sa kalibracione prave iz pet uzastopnih merenja (1) i pet merenja iste koncentracije katehina, odnosno epikatehina u toku jednog meseca sa vremenskim razmakom od 5 dana (2) pri istim uslovima i na istom aparatu (tabela 4.49). Relativna standardna devijacija u prvom slučaju iznosi 2,18 i 2,54, a u drugom 4,43 i 4,57%.

Tabela 4.49. Preciznost i tačnost HPLC metode.

Odmereno $\mu(\mu\text{g/ml})$	Nađeno(1) $x \pm SD^1$ $\mu\text{g/ml}$	Nađeno(2) $x \pm SD^1$ $\mu\text{g/ml}$	RSD(1) %	RSD(2) %	$(x - \mu)/\mu \cdot 100$ (1) %	$(x - \mu)/\mu \cdot 100$ (2) %
Katehin						
5,0	5,03 \pm 0,11	5,08 \pm 0,22	2,18	4,43	+0,52	+1,60
Epikatehin						
5,0	4,96 \pm 0,11	5,02 \pm 0,23	2,54	4,57	-0,8	+0,40

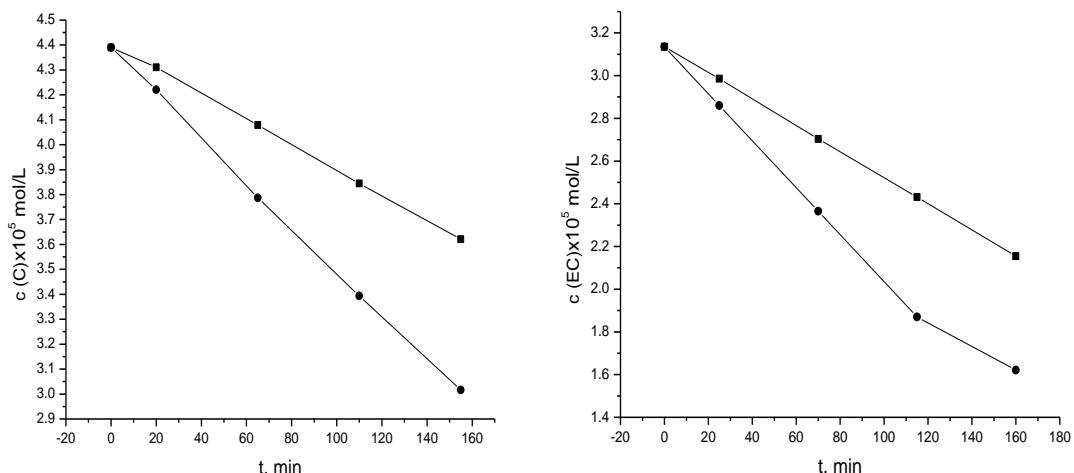
¹srednja vrednost \pm SD ($n=5$).

4.2.3.2. Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema

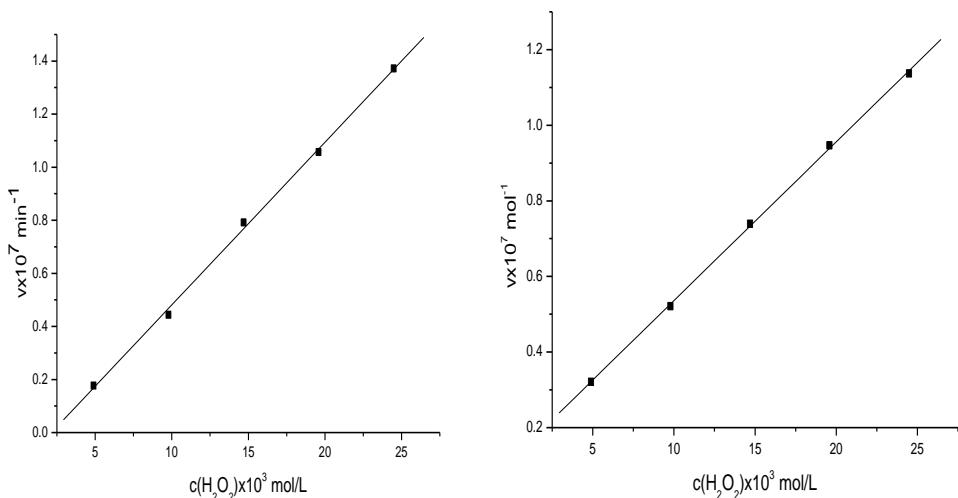
Za obradu kinetičkih podataka primenjena je metoda inicijalne brzine. Promena koncentracije katehina i epikatehina sa vremenom praćena je tokom 160 min nakon pripremanja reakcione smeše, prema postupku datom u delu 3.3.5.2. Dobijene zavisnosti $c=f(t)$ su linearne što se može videti na slici 4.69.

U cilju ispitivanja kinetike degradacije katehina i epikatehina hidroksil radikalima ($pH=3,5$ podešen vinskom kiselinom) bilo je potrebno odrediti uslove odigravanja reakcije. U tu svrhu praćena je promena brzine reakcije degradacije od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno (H_2O_2 , Cu(II), katehina, tj. epikatehina).

Na slici 4.70 se zapaža da su brzine reakcije degradacije katehina i epikatehina linearne u celom ispitivanom intervalu koncentracija vodonik peroksida, tako da su obe reakcije +1 reda. Za dalji rad odabrana je koncentracija H_2O_2 od $14,69 \cdot 10^{-3}$ mol/L.



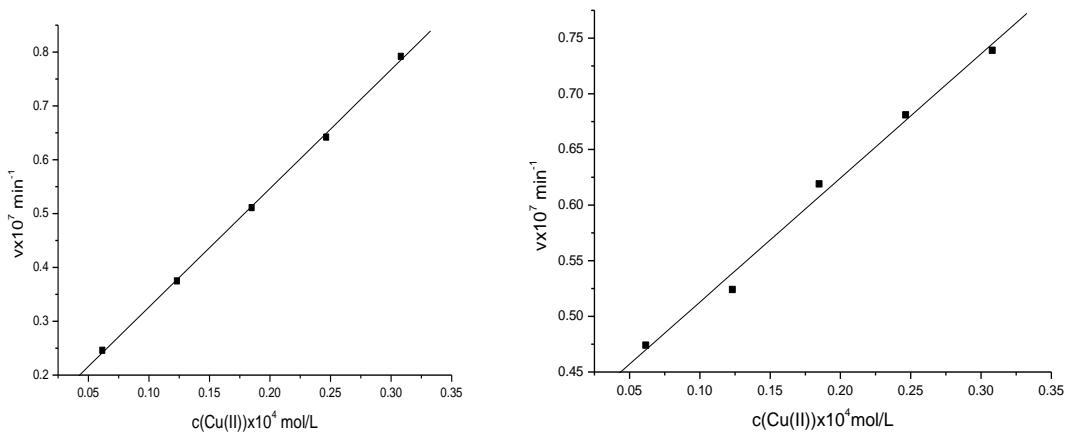
Slika 4.69. Promena koncentracije katehina (a) i epikatehina sa vremenom za različite temperature: ■- $25^\circ C$; ♦- $-35^\circ C$. Koncentracije reaktanata u rastvoru: katehin - $4,39 \cdot 10^{-5}$ mol/L ili epikatehin - $3,13 \cdot 10^{-5}$ mol/L; Cu(II) - $1,85 \cdot 10^{-5}$ mol/L; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3}$ mol/L; $pH=3,5$.



Slika 4.70. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije H_2O_2 za katehin (a) i epikatehin (b).

Koncentracije reaktanata u rastvoru: katehin - $4,39 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ ili epikatehin - $3,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; Cu(II) - $3,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; $\text{pH}=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ispitivanjem uticaja Cu(II) jona na brzinu degradacije katehina i epikatehina (slika 4.71), vidi se da su zavisnosti brzina reakcija linearne u celom ispitivanom intervalu koncentracija bakra, tako da su obe reakcije +1 reda. Za dalji rad je odabrana koncentracija bakra od $1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$.

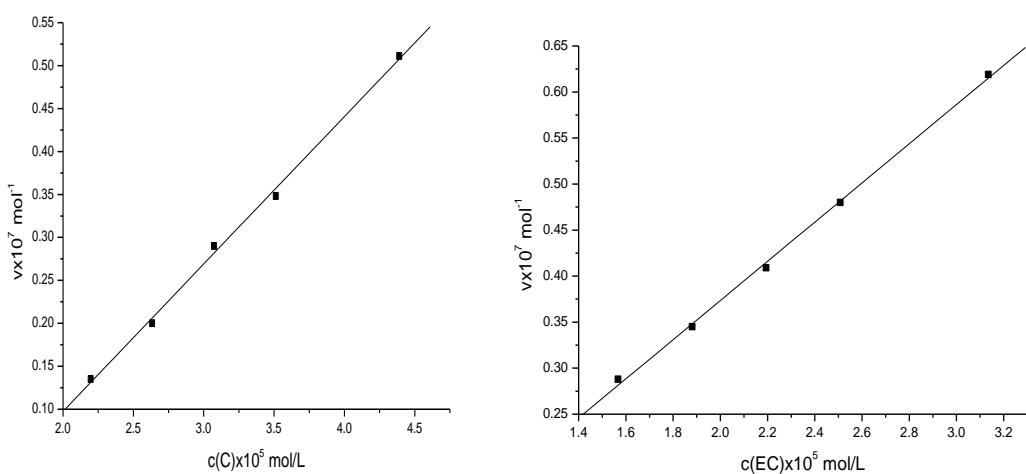


Slika 4.71. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II) za katehin (a) i epikatehin (b).

Koncentracije reaktanata u rastvoru: katehin - $4,39 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ ili epikatehin - $3,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$; $\text{pH}=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Pri odabranim uslovima odigravanja reakcije, praćena je zavisnost brzine reakcija degradacije od koncentracije katehina i epikatehina (odmeravanjem različitih zapremina vina

u reakcionu smešu). Na slici 4.72 je prikazana zavisnost brzine reakcije od koncentracije katehina, odnosno epikatehina.



Slika 4.72. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije katehina (a) i epikatehina (b). Koncentracije reaktanata u rastvoru: Cu(II) - $1,85 \cdot 10^{-5}$ mol/L; H_2O_2 - $14,69 \cdot 10^{-3}$ mol/L; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzina reakcija degradacije katehina i epikatehina hidroksil radikalima, od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, postavljene su odgovarajuće kinetičke jednačine za oba procesa. Kinetičke jednačine za reakciju degradacije katehina, odnosno epikatehina su sledeće:

$$-\frac{dc}{dt} = k_C \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{Cu(II)} \cdot c_C \quad 4.11$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_{EC} \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{Cu(II)} \cdot c_{EC} \quad 4.12$$

gde su:

dc/dt – promena koncentracije katehina, odnosno epikatehina

k_C , k_{EC} – konstanta brzine reakcije degradacije katehina, odnosno epikatehina.

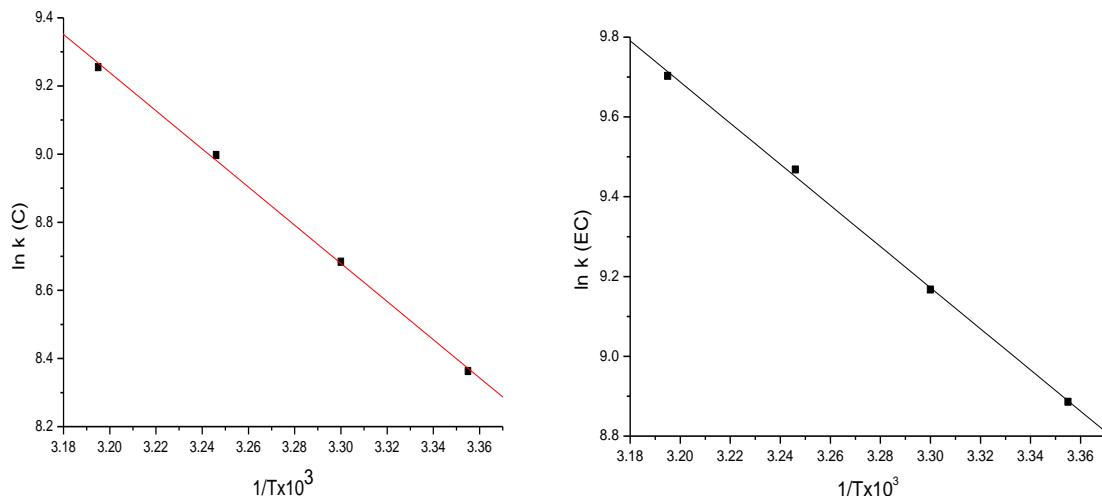
Na osnovu kinetičkih jednačina (4.11, 4.12) izračunate su konstante brzine reakcija na četiri različite temperature (tabela 4.50).

Tabela 4.50. Konstante brzine reakcija degradacije katehina i epikatehina u crvenom vinu hidroksil radikalima na različitim temperaturama.

t $^{\circ}\text{C}$	k_c^{-1}	k_{ec}^{-1}
25	$4.29 \cdot 10^3$	$7.27 \cdot 10^3$
30	$5.91 \cdot 10^3$	$9.58 \cdot 10^3$
35	$8.08 \cdot 10^3$	$12.35 \cdot 10^3$
40	$10.45 \cdot 10^3$	$16.38 \cdot 10^3$

¹srednja vrednost ($n=5$).

Energije aktivacije reakcija degradacije katehina i epikatehina određene su na osnovu vrednosti nagiba pravih prikazanih na slici 4.73.



Slika 4.73. Zavisnost $\ln k$ od recipročne vrednosti absolutne temperature za katehin (a) i epikatehin (b).

Vrednost izračunatih termodinamičkih parametara aktiviranog kompleksa reakcija degradacije katehina i epikatehina hidroksil radikalima, primenom jednačina 4.2 – 2.6, date su u tabeli 4.51.

Tabela 4.51. Termodinamički parametri aktiviranih kompleksa reakcija degradacije katehina i epikatehina u crvenom vinu hidroksil radikalima na 298⁰C.

sistem	Ea (kJmol ⁻¹)	ΔH [*] (kJmol ⁻¹)	ΔS [*] (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG [*] (kJmol ⁻¹)	pK [*]
katehin+H ₂ O ₂ +Cu(II)	45,219	42,743	-31,88	52,243	9,16
epikatehin+H ₂ O ₂ +Cu(II)	41,42	38,941	-40,25	50,938	8,93

4.2.4. Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije fenolnih jedinjenja belih vina

Proizvodnja belih vina zahteva velike napore da bi se izbegli kontakti sa kiseonikom koji mogu biti štetni u smislu promene boje (potamnjivanje, brovingovanje) i eventualno može ugroziti kvalitet vina.

Potamnjivanje je ozbiljan problem u proizvodnji belih vina. Potamnjivanje je rezultat serije složenih reakcija oksidacije koje se dešavaju za vreme faze obrade i prerađe, starenja i skadištenja, što doprinosi povećanju intenziteta braon boje. Ove reakcije mogu biti enzimske i neenzimske. Neenzimska oksidacija može da se dogodi u odsustvu aktivne polifenolne oksidaze, rezultujući pojavu više ili manje intenzivne braon boje i „drvenaste“ arome zbog formiranja pigmenata visoke molekulske mase reakcijama prikazanim na slici 2.31. Ovaj fenomen se smatra poželjnim u slučaju desertnih vina, ali je zato nepoželjan u slučaju mlađih vina, penušastih i zrelih crvenih vina.

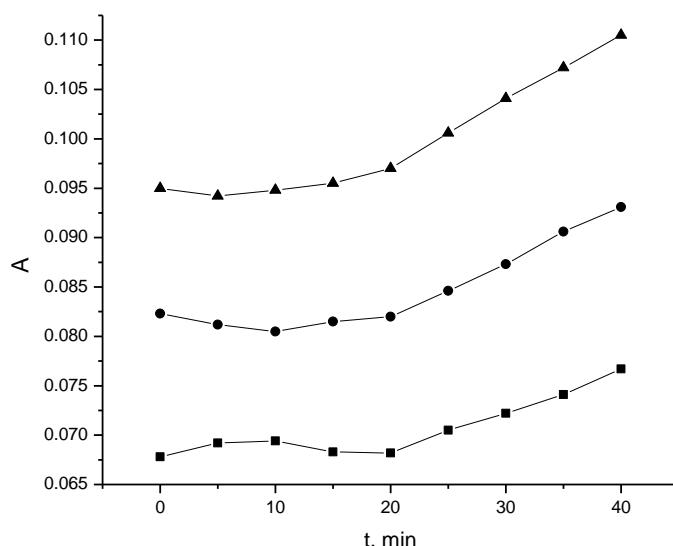
Dobro je poznato da reakcije koje dovode do brovingovanja belih vina zavise od polifenolnog sastava, ali su podjednako važni i faktori koji utiču na oksidaciju polifenola kao što su prelazni metali i prisustvo SO_2 i askorbinske kiseline.

Najvažnija polifenolna jedinjenja u belim vinima, u smislu kvaliteta i sposobnosti učestvovanja u oksido-redukcionim reakcijama, su flavanoli i hidroksicinamati. Posebno kafena kiselina, kaftarna kiselina, kao i katehin, epikatehin i njihovi derivati za koje je ustanovljeno da daju izvestan broj oksidacionih proizvoda, mogu se smatrati potencijalnim agensima brovingovanja. Dokaz ovih tvrdnji su rezultati *Clarka i Scollary-ja (2002)*, koji su navedeni u delu 4.1.5. Takođe, *Kallithraka i sar. (2009b)* su proučavali promenu sastava belih grčkih vina tokom starenja u boci i primenom ubrzanih testa brovingovanja tokom 12 dana na temperaturi od 55°C. Pri tome su HPLC metodom ustanovili da se koncentracija katehina tokom 9 meseci starenja u boci (odnosno tokom 12 dana testa ubrzanih brovingovanja) smanji za 42,3% (odnosno 5,8%), epikatehina za 87,6(34,3), kaftarne kiseline za 33,0 (4,6), ali se istovremeno povećava apsorbancija na 420 nm usled nastajanja reakcionalih proizvoda. Tokom ubrzanih brovingovanja ustanovljeno je da ovaj proces brovingovanja prati bifazni tok, prvo naglim povećanjem i kasnije smanjenjem za 3 dana, a zatim sledi linearno povećanje apsorbancije na 420 nm za 10 dana (*Salaha i sar., 2008*). Sličan tok procesa ustanovili su *Perez-Zuniga i sar. (2000)* testom ubrzanih brovingovanja u toku 40 dana na 45°C za šest španskih belih vina.

Brovingovanje belih vina ima uticaja i na organoleptičke karakteristike vina i na njihov antioksidativni status. Ipak, za vina proizvedena u Srbiji, proces brovingovanja nije ispitana. Za ispitivanje procesa brovingovanja belih srpskih vina u ovom radu koristićen je test ubrzanih brovingovanja hidroksil radikalima, koji do sada u ovu svrhu nije korišćen.

4.2.4.1. Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema

Brzina reakcije brovingovanja belih vina praćena je spektrofotometrijski merenjem promene apsorbancije na 420 nm tokom 40 min po pripremanju reakcione smeše, po postupku datom u delu 3.3.5.1. Ukupna zapremina reakcione smeše je 5 ml. Dobijene zavisnosti $A = f(t)$ za različite koncentracije vina nisu linearne u celom ispitivanom vremenskom intervalu (slika 4.74) već pokazuju dvofazni smer: početni period od 20 min karakterističan je po porastu i smanjenju potamnjivanja, odnosno apsorbancije na 420 nm a posle toga se uočava linearno povećanje apsorbance, što je u skladu sa rezultatima gore pomenutih autora. Za obradu kinetičkih podataka primenjena je diferencijalna varijanta tangensne metode za vremenski period od 20 do 40 min odigravanja reakcije.



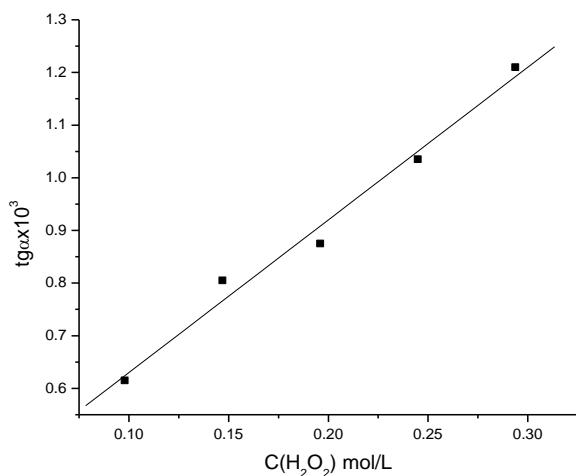
Slika 4.74. Promena apsorbance rastvora sa vremenom za zapremine belog vina: ■- 1 ml; ●-2 ml; ▲-3 ml. Koncentracije reaktanata u rastvoru: Cu(II) - $1,232 \cdot 10^{-4}$ mol/L; H_2O_2 - 0,098 mol/L pH=3,5; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

U cilju ispitivanja kinetike brovingovanja belih vina, praćen je uticaj koncentracije svih reaktanata (H_2O_2 , Cu(II), belog vina Smederevka) i temperature na brzinu ispitivane reakcije pri pH=3,5 (podešen vinskom kiselinom).

Kako su mnogi autori (Salacha i sar. 2008; Sioumis i sar., 2005) potvrdili visok stepen korelacije između konstante brzine reakcije brovingovanja i sadržaja ukupnih polifenola belih vina, to se i sadržaj polifenola belih vina može dovesti u direktnu vezu sa procesom razvijanja braon boje belih vina. To je omogućilo da proces brovingovanja belih vina hidroksil radikalima bude iskoriscen za razradu kinetičko-spektrofotometrijske metode za

određivanje ukupnih fenola belih vina, dovodeći u direktnu zavisnost brzinu reakcije od sadržaja ukupnih fenola belih vina.

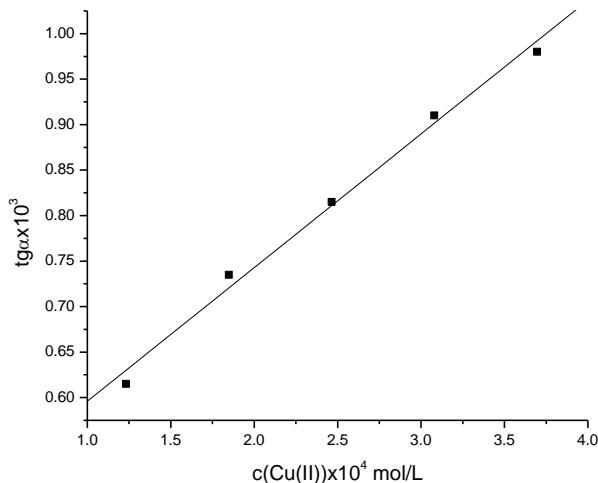
Zavisnost brzine reakcije od koncentracije vodonik-peroksida u intervalu od 0,098 do 0,294 mol/L prikazana je na slici 4.75. Brzina reakcije linearno raste u celom ispitivanom intervalu koncentracija. Koncentracija H_2O_2 od 0,098 mol/L je odabrana za dalji rad. Reakcija je +1 u odnosu na H_2O_2 u ispitivanom intervalu koncentracija.



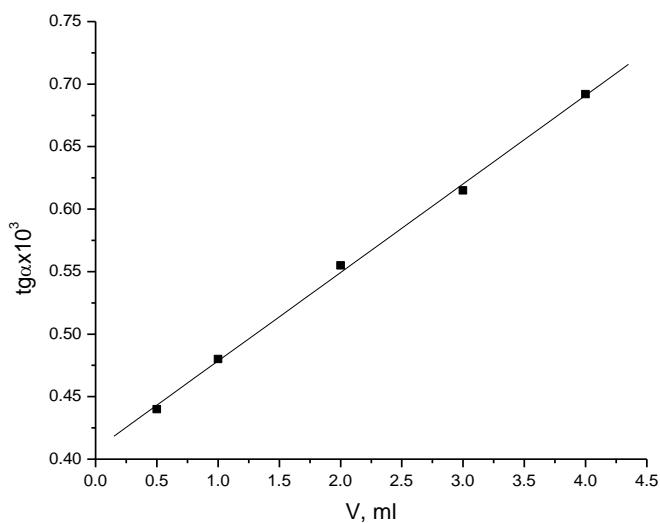
Slika 4.75. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije H_2O_2 . Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(vina) = 3\text{ ml}$; $Cu(II) - 1,232 \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

Uticaj koncentracije Cu(II) jona na brzinu reakcije je posmatran u intervalu od $1,232 \cdot 10^{-4}$ do $3,696 \cdot 10^{-4}$ mol/L (slika 4.76). Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije ovog reaktanta te je reakcija +1 reda u odnosu na Cu(II) u ispitivanom intervalu koncentracija. Koncentracija $1,232 \cdot 10^{-4}$ mol/L je odabrana za dalji rad.

Radi ispitivanja uticaja koncentracije polifenolnih jedinjenja na brzinu reakcije u reakcionu smešu su odmeravane različite zapremine belog vina (slika 4.77). Zavisnost brzine reakcije od koncentracije polifenola je linearна, tako da je reakcija +1 reda.



Slika 4.76. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II). Koncentracije reaktanata u rastvoru: V(vina) = 3 ml; H_2O_2 - 0,098 mol/L; pH=3,5; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.



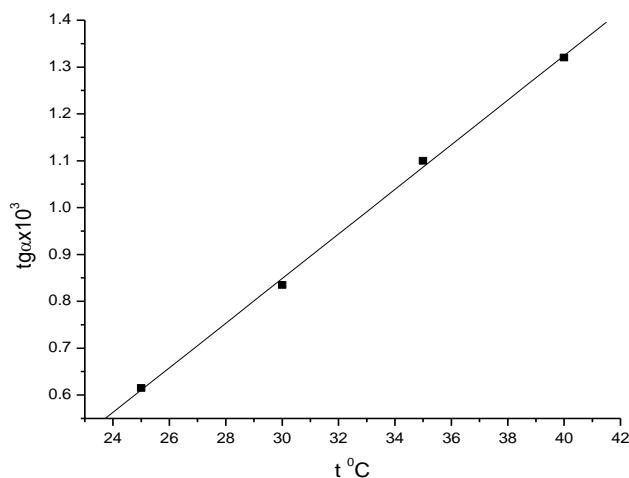
Slika 4.77. Zavisnost brzine reakcije od zapremine belog vina. Koncentracije reaktanata u rastvoru: H_2O_2 - 0,098 mol/L, Cu(II) - $1,232 \cdot 10^{-4}$ mol/L; pH=3,5; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

Na osnovu prikazanih zavisnosti između brzine reakcije degradacije belih vina hidroksil radikalima, od koncentracije svakog reaktanta pojedinačno, postavljena je kinetička jednačina procesa:

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{Cu(II)} \cdot c_{\text{polifenoli}} \quad 4.13$$

Pri čemu je sadržaj polifenola u reakcionej smeši (odgovarajuće zapremine belog vina Smederevka bez H_2O_2 i Cu(II) jona) određen spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa i on se kretao u intervalu od $0,143 \cdot 10^{-3}$ do $1,14 \cdot 10^{-3}$ mol GAE/L.

Brzina ispitivane reakcije praćena je pri odabranim uslovima odigravanja reakcije na četiri temperature: 25, 30 35 i $40^{\circ}C$. Grafička zavisnost brzine reakcije od temperature prikazana je na slici 4.78.



Slika 4.78. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije reaktanata u rastvoru:
Polifenoli – $0,86 \cdot 10^{-3}$ mol/L; H_2O_2 - $0,0979$ mol/L, Cu(II) = $1,232 \cdot 10^{-4}$ mol/L; pH=3,5; t = $25 \pm 0,1^{\circ}C$.

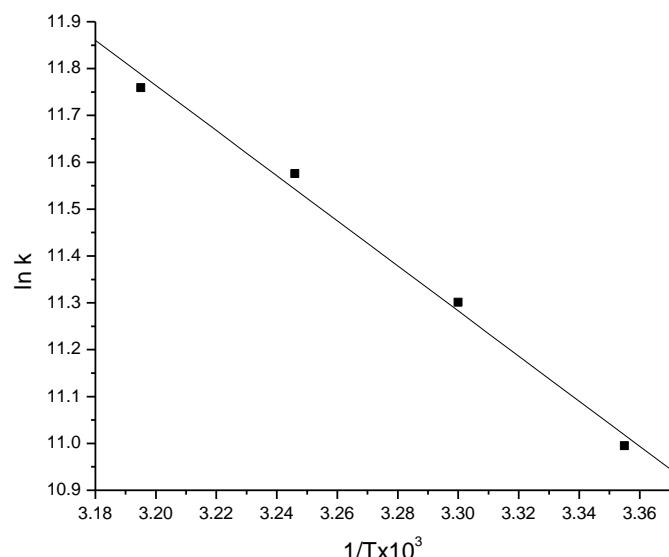
Konstante brzine reakcije izračunate su na osnovu kinetičke jednačine 4.13 za četiri različite temperature (tabela 4.52), i to su uslovne konstante brzine s obzirom da su nepoznate vrednosti molarne mase reakcionog proizvoda (tačnije reakcionih proizvoda) i molarnog apsorpcionog koeficijenta.

Tabela 4.52. Uslovne konstante brzine reakcije degradacije polifenolnih jedinjenja belih vina hidroksil radikalima na različitim temperaturama.

t $^{\circ}C$	$k^1, \text{ mol}^2 \text{dm}^{-6} \text{min}^{-1}$
25	$5,96 \cdot 10^4$
30	$8,09 \cdot 10^4$
35	$10,66 \cdot 10^4$
40	$12,79 \cdot 10^4$

¹srednja vrednost (n=5).

Energija aktivacije reakcije izračunata je na osnovu vrednosti nagiba prave prikazane na slici 4.49, i ona iznosi $40,02 \text{ kJmol}^{-1}$.



Slika 4.79. Zavisnost $\ln k$ od recipročne vrednosti absolutne temperature.

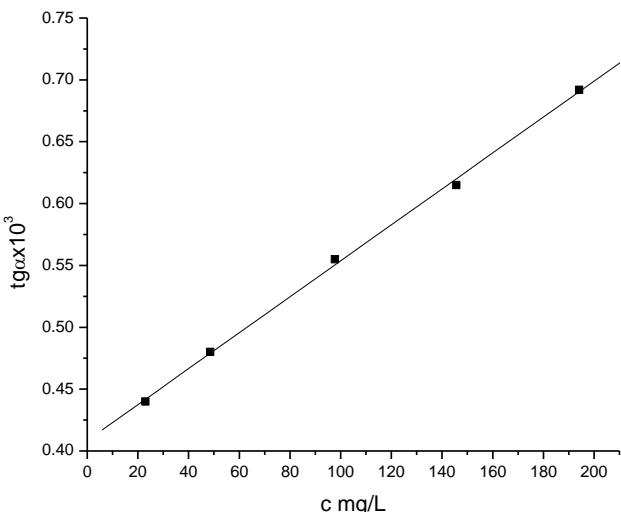
4.2.4.2. Validacija kinetičko-spektroforometrijske metode za određivanje ukupnih polifenola belih vina

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti i preciznosti metode.

Linearost

Uticaj polifenola na brzinu reakcije praćen je pri predhodno odabranim uslovima odigravanja reakcije pri temperaturi od 25°C . Različite koncentracije polifenola dobijene su odmeravanjem različitih zapremina belog vina, čija je koncentracija određena metodom unutrašnjeg standarda, galne kiseline od $40 \mu\text{g/ml}$. Koncentracija polifenola u odmerenoj zapremini vina određena je na osnovu zavisnosti date na slici 4.58 a na osnovu jednačine (4.7), i izražena kao mg GAE/L . Tangens ugla odsečka određen je na osnovu zavisnosti prikazane na slici 4.77, i on iznosi $0,4 \cdot 10^{-3}$.

Na osnovu izračunatih vrednosti za polifenole u reakcionaloj smeši, dobijena je linearna zavisnost u intervalu koncentracija fenola od $23,01$ do $194,11 \mu\text{g/ml}$ (slika 4.80), koja se može koristiti za određivanje polifenola u belim vinima.



Slika 4.80. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije polifenola. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $\text{Cu(II)} - 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $\text{H}_2\text{O}_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $\text{pH}=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Kalibraciona kriva na 25°C se može prikazati jednačinom, koja je dobijena metodom najmanjih kvadrata.

$$\text{tg}\alpha = 0,00145 \cdot c_x + 0,408 \quad 4.14$$

$$r = 0,999 \quad s_0 = 0,00298$$

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (c_L) i limit kvantifikacije (c_Q) izračunati su na osnovu jednačina 2.46 i 2.47 i oni iznose $6,77$ i $20,51 \mu\text{g/ml}$

Preciznost i tačnost metode

Preciznost metode je određena odmeravanjem iste zapremine vina (0,5 ml) bez i sa dodatkom galne kiseline (70,0 i 170,0,0 $\mu\text{g/ml}$) iz pet ponavljanja. Za svaku reakcionu smešu izračunata je relativna standardna devijacija (RSD). Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka dati su u tabeli 4.53.

Tabela 4.53. Preciznost određivanja polifenola u belim vinima.

Dodato GA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Ukupno polifenola ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD (n=5) %
0	23,01	3,85
70,0	97,81	1,79
170,0	194,11	2,49

Tačnost metode je definisana odnosom određene i dodate koncentracije standardnog rastvora galne kiseline u istoj zapremini vina iz pet merenja. Izračunata je relativna greška, a rezultati prikazani u tabeli 4.54.

Tabela 4.54. Tačnost određivanja polifenola u belim vinima.

Dodato GA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Određeno GA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RG %
30,0	34,20	4,92
60,0	66,27	2,66
90,0	97,03	1,52

Rezultati iz tabela 4.53 i 4.54 pokazuju da se polifenoli u belim vinima predloženom kinetičkom metodom mogu određivati sa zadovoljavajućom preciznošću i tačnošću. Međutim, iako je relativna greška manja od 4,92%, možemo uočiti da su vrednosti za sadržaj galne kiseline uvećane za oko 10%. Razlog tome je različito ponašanje fenolnih komponenti u belom vinu u odnosu na galnu kiselinsku reakciju sa hidroksil radikalima. Galna kiselina verovatno lakše podleže procesu oksidacije hidroksil radikalima, pa otuda i veće vrednosti za brzine reakcija u reakcionim smešama gde preovladava prisustvo galne kiseline.

Primena metode za određivanje polifenola

Predložena metoda je primenjena za određivanje sadržaja polifenola u belim vinima. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenih spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa i galne kiseline kao standarda. Rezultati određivanja polifenola u belim vinima prikazani su u tabeli 4.55.

Tabela 4.55. Određivanje sadržaja (mg/L)^{1,2} ukupnih fenola u belim vinima kinetičko-spektrofotometrijskom i pH-diferencijalnom metodom.

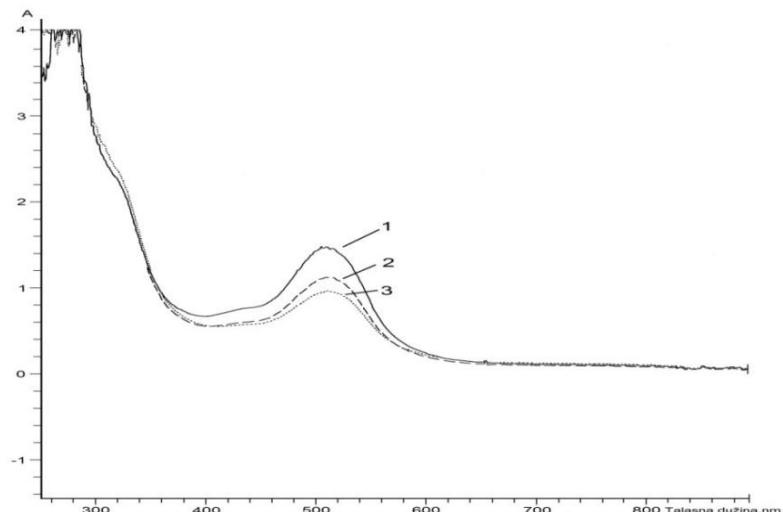
Vino	Kinetičko-spektrofotometrijska metoda	pH-diferencijalna metoda	t-test ³	F-test ³
Chardonnay	365,23±7,38	372,63±11,52	1,19	2,43
Međaš beli	405,38±8,33	412,78±9,21	1,33	1,22
Župski rizling	348,82±7,11	350,72±8,78	0,38	1,52
Smederevka	285,62±7,30	291,36±7,84	1,19	1,15

¹srednja vrednost ± SD (n=5); ²mg ekvivalenta galne kiseline/L vina; ³tabelarne F- i t-vrednosti pri 95%-nom nivou poverenja su 6,39 i 2,306.

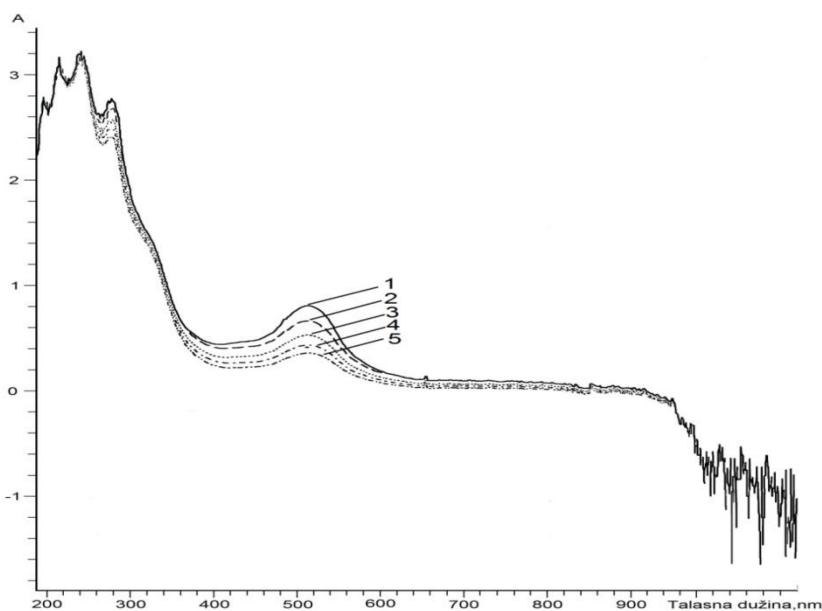
Vrednosti F-testa i Studentovog t-testa pokazale su da nema značajnije razlike u rezultatima dobijenim za sadržaj ukupnih fenola u belim vinima korišćenjem kinetičko-spektrofotometrijske metode i standardne spektrofotometrijske metode upotrebom Folin-Ciocalteu reagensa ($F_{eksp.} < F_{tab.}$ i $t_{eksp.} < t_{tab.}$). Dakle, predložena nova kinetičko-spektrofotometrijska metoda može se uspešno primeniti za određivanje sadržaja ukupnih fenola u belim vinima.

4.2.5. Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije antocijana soka višnje

U cilju ispitivanja kinetike degradacije antocijana u ceđenom soku višnje snimljeni su apsorpcioni spektri sistema sok+voda (0,5 ml ceđenog soka, zapremina reakcionog rastvora je 5 ml), sok+H₂O₂+voda i sok+H₂O₂+Cu(II)+voda pri pH=3,5 (podešen vinskom kiselinom) tri minuta od pripremanja reakcione smeše (slika 4.81). Na apsorpcionom spektru osnovne apsorpcione trake antocijana u soku višnje (kriva 1) u prisustvu vodonik peroksida javlja se znatno smanjenje apsorbancije na talasnoj dužini od 520 nm (kriva 2). Smanjenje apsorpcionog maksimuma na 520 nm se dodatno smanjuje kada se reakcionom sistemu pored vodonik peroksida doda i Cu(II). Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da reakciju degradacije antocijana hidroksil radikalima može se pratiti snimanjem kinetičkih krivih A=f(t) na 520 nm. Promena apsorbancije sa vremenom praćena je tokom 35 min od mešanja reakcionalih komponenta (po proceduri datoj u delu 3.3.5.1) i prikazana na slici 4.82. Dobijene zavisnosti su linearne u toku prvih 20-25 min odigravanja reakcije, što je omogućilo primenu diferencijalne varijante tangensne metode.



Slika 4.81. Apsorpcioni spektar: 1) vodenog rastvora soka višnje, 2) vodenog rastvora soka višnje + H₂O₂, 3) vodenog rastvora soka višnje + H₂O₂ + Cu(II). Koncentracije reaktanata u rastvoru: V(soka)-0,5 ml; H₂O₂ - 0,059 mol/L; Cu(II) = 1,848·10⁻⁴ mol/L; pH=3,5; t = 25 ± 0,1°C.

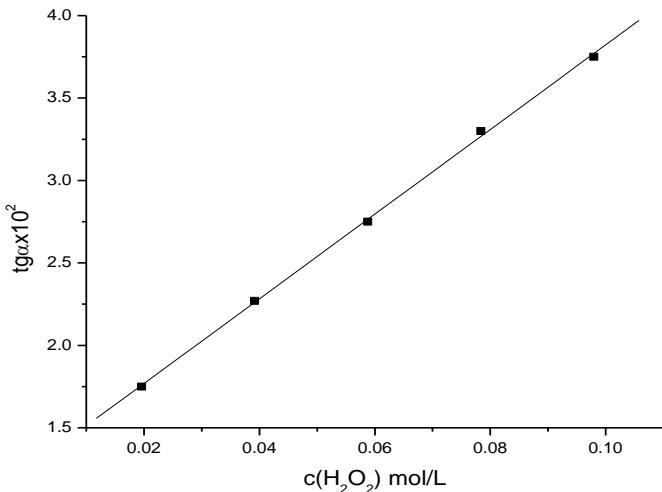


Slika 4.82. Promena apsorpcionog spektra reakcione smeše vodenog rastvora soka višnje + $H_2O_2 + Cu(II)$ sa vremenom nakon 1) 1 min; 2) 6 min; 3) 11 min; 4) 16 min; 5) 21 min.
Koncentracije reaktanata u rastvoru: V(soka)-0,2 ml; H_2O_2 - 0,059 mol/L; $Cu(II) = 1,848 \cdot 10^{-4}$ mol/L; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

4.2.5.1. Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema

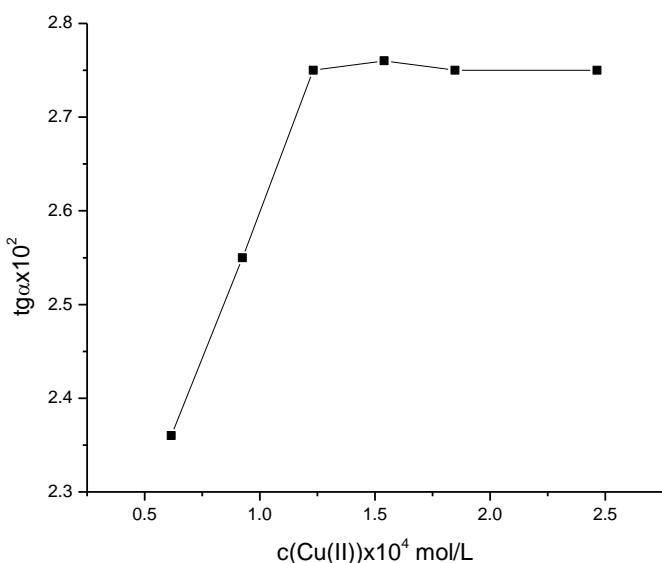
Da bi se našli uslovi odigravanja reakcije degradacije i razrade kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje antocijana, odnosno cijanidina u soku višnje ispitani je uticaj temperature, promene koncentracije reagujućih komponenti (H_2O_2 , $Cu(II)$ i cijanidina) na brzinu reakcije degradacije.

Uticaj promene koncentracije H_2O_2 na brzinu ispitivane reakcije praćen je u intervalu od 0,019 do 0,098 mol/L (slika 4.83). Kako je zavisnost linearna u celom intervalu koncentracije reakcija je +1 reda u odnosu na koncentraciju H_2O_2 . Za dalji rad je odabrana koncentracija od 0,059 mol/L.



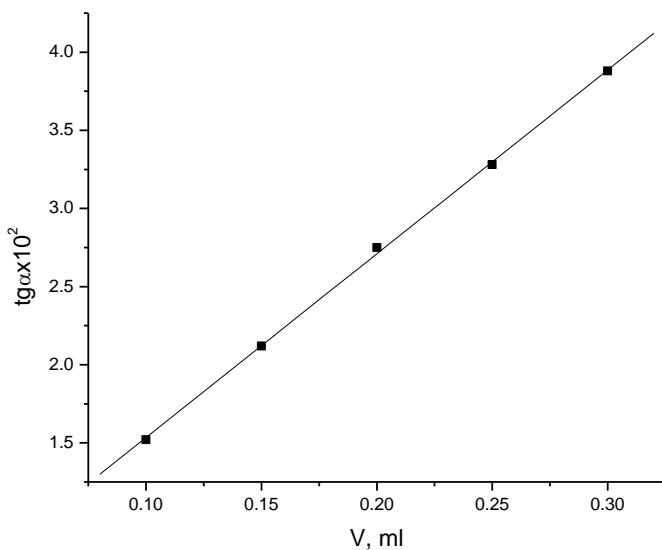
Slika 4.83. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije H_2O_2 . Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(soka) = 0,2\text{ ml}$; $Cu(II) = 1,232 \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

Uticaj koncentracije Cu(II) jona na brzinu reakcije je posmatran u intervalu $(0,616 - 2,464) \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije jona bakra do vrednosti od $1,232 \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$. U intervalu koncentracije Cu(II) jona $(1,232 - 2,464) \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$, brzina reakcije je konstantna i reakcija je nultog reda u odnosu na ovaj reaktant (slika 4.84). Koncentracija Cu(II) od $1,848 \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$ je odabrana za dalji rad. Izgled zavisnosti brzine reakcije od koncentracije Cu(II) jona potvrđuje literaturni podatak da cijanidin-3-glukozid može graditi kompleks sa Cu(II) jonima (Smyk i sar., 2008).



Slika 4.84. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II). Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(soka) = 0,2\text{ ml}$; $H_2O_2 - 0,059\text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana, tačnije cijanidina u reakcionoj smeši prikazana je na slici 4.85. Različite količine cijanidina su dobijene odmeravanjem različitih zapremina soka od 0,10 do 0,30 ml. Brzina reakcije linearno raste sa povećanjem zapremine soka u reakcionoj smeši, te je reakcija +1 reda u odnosu na koncentraciju cijanidina. Slika 4.85 prikazuje ovu zavisnost, pri čemu je određeno da odsečak ove prave na osu tgα iznosi $0,38 \cdot 10^{-2}$. Neophodno je posebno obratiti pažnju na ulogu Cu(II) u procesu degradacije cijanidin-3-glukozida. Zavisnost prikazana na slici 4.84, ukazuje na mogućnost građenja kompleksa cijanidin-3-glukozida i Cu(II) jona, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (*Smyk i sar., 2008*).



Slika 4.85. Zavisnost brzine reakcije od antocijana. Koncentracije reaktanata u rastvoru: V(soka) = 0,2 ml; H_2O_2 - 0,059 mol/L; Cu(II) = $1,848 \cdot 10^{-4}$ mol/L; pH=3,5; t = $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Na osnovu predhodno dobijenih zavisnosti brzine reakcije degradacije od koncentracije reaktanata pojedinačno, kao i određivanog reda reakcije u odnosu na koncentraciju svakog reaktanta pojedinačno, može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces degradacije cijanidina u soku višnje:

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot \text{CH}_2\text{O}_2 \cdot c_{\text{antocijani}} \quad 4.15$$

za interval koncentracija:

$$\text{H}_2\text{O}_2 = 0,0196 - 0,0979 \text{ mol/L}$$

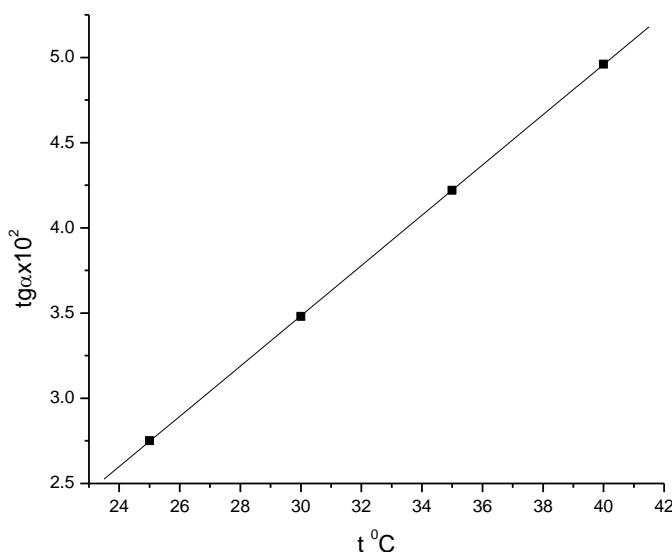
$$\text{Cu(II)} = (1,232-2,464) \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$V(\text{soka}) = 0,10 - 0,30 \text{ ml}$$

gde je: $-dc/dt$ = promena koncentracije cijanidina

k = konstanta brzine reakcije

Brzina ispitivane reakcije praćena je pri odabranim koncentracionim uslovima na četiri temperature: 25, 30, 35 i 40°C. Na osnovu rezultata zavisnosti brzina reakcija od temperature za zapreminu soka od 0,2 ml dobijen je grafik prikazan na slici 4.86.



Slika 4.86. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije reaktanata u rastvoru:
 $V(soka) = 0,2\text{ ml}$; $H_2O_2 - 0,059\text{ mol/L}$; $Cu(II) - 1,848 \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$; $pH=3,5$.

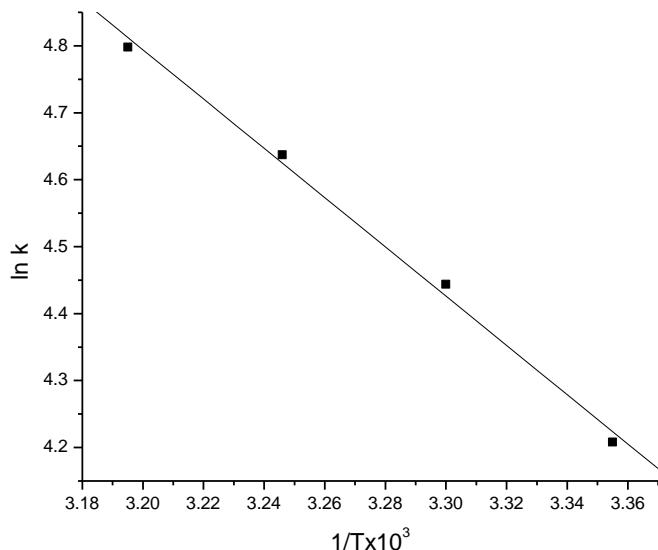
Na osnovu kinetičke jednačine 4.15 izračunate su konstante brzine reakcije na četiri temperature uzimajući u obzir da je molarna masa cijanidin-3-glukozida $449,2\text{ g mol}^{-1}$, molarni apsorpcioni koeficijent $26\,900\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ i da je pH-diferencijalnom metodom određeno da je koncentracija cijanidina u ovoj reakcionaloj smeši $1,4 \cdot 10^{-3}\text{ mol C3GE/L}$ (tabela 4.56).

Tabela 4.56. Konstante brzine reakcije degradacije antocijana u soku višje hidroksil radikalima na različitim temperaturama.

t °C	k^1 , $\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$
25	$0,67 \cdot 10^2$
30	$0,85 \cdot 10^2$
35	$1,03 \cdot 10^2$
40	$1,21 \cdot 10^2$

¹srednja vrednost ($n=5$).

Termodinamički parametri reakcije degradacije cijanidina hidroksil radikalima određeni su na osnovu nagiba prave prikazane na slici 4.87.



Slika 4.87. Zavisnost $\ln k$ od recipročne vrednosti absolutne temperature.

Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije a potom i ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK^* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, primenom jednačina 4.2–4.6. Vrednost izračunatih termodinamičkih parametara degradacije aktiviranog kompleksa dati su u tabeli 4.57.

Tabela 4.57. Termodinamički parametri aktiviranog kompleksa reakcije degradacije antocijana u soku višnje hidroksil radikalima na 295K.

Ea (kJmol ⁻¹)	ΔH^* (kJmol ⁻¹)	ΔS^* (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG^* (kJmol ⁻¹)	pK^*
30,59	28,12	-115,48	62,53	10,96

4.2.5.2. Validacija kinetičko-spektroforometrijske metode za određivanje antocijana soka višnje

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti i preciznosti.

Linearost

S obzirom da koncentracija cijanidina u uzorku višnje nije poznata, uz različite zapremine soka dodavana je uvek ista količina standarda, cijanidin-3-glukozida ($20,0 \mu\text{g}/\text{ml}$) a potom na osnovu jednačine 4.7 izračunavan sadržaj cijanidina u reakcionaloj smeši. Na slici 4.88 je data kalibraciona kriva koja je linearna u intervalu od $6,60$ do $37,80 \mu\text{g}/\text{ml}$ i može se primeniti za određivanje antocijana u uzorcima soka od višanja.

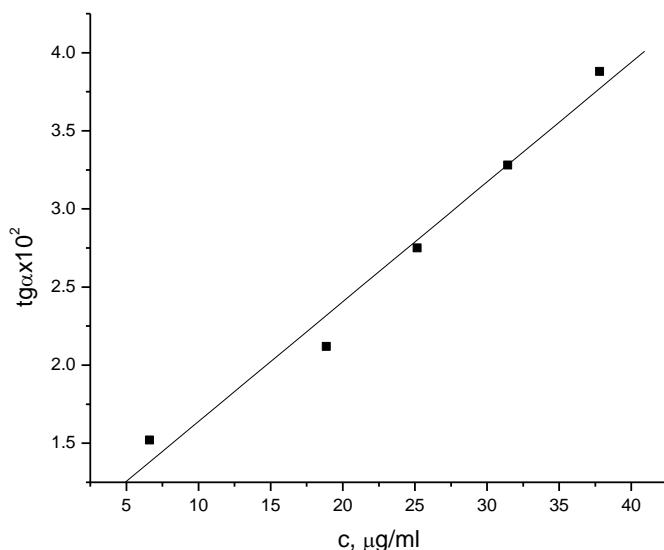
Ova zavisnost se može predstaviti jednačinom:

$$\text{tg}\alpha = 0,098 \cdot c_x + 0,357 \quad 4.16$$

$$r = 0,989 \quad s_o = 0,033$$

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (c_L) i limit kvantifikacije (c_Q) određeni su korišćenjem jednačina 2.46 i 2.47. Dobijene vrednosti su $1,11$ i $3,37 \mu\text{g}/\text{ml}$.



Slika. 4.88. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $\text{Cu(II)} - 1,848 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $\text{H}_2\text{O}_2 - 0,059 \text{ mol/L}$; $\text{pH}=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Preciznost i tačnost metode određivanja antocijana u sokovima višnje

Preciznost metode je određena odmeravanjem iste zapremine cedenog soka višnje (0,1 ml) bez i sa dodatkom Cy-3-G (20,0; 30,0) iz pet ponavljanja. Za svaku reakcionu smešu izračunata je relativna standardna devijacija (RSD). Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka dati su u tabeli 4.58.

Tabela 4.58. Preciznost određivanja antocijana u sokovima.

Dodato Cy-3-G ($\mu\text{g/ml}$)	Ukupno antocijana ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (n=5) %
0	6,60	1,04
20,0	25,16	0,70
30,0	37,80	2,00

Tačnost metode je definisana odnosom određene i dodata koncentracije standardnog rastvora Cy-3-G u istoj zapremini vina iz pet merenja. Izračunata je relativna greška, a rezultati prikazani u tabeli 4.59.

Tabela 4.59. Tačnost određivanja antocijana u sokovima.

Dodato Cy-3-G ($\mu\text{g/ml}$)	određeno Cy-3-G ($\mu\text{g/ml}$)	RG %
10,0	10,38	6,38
20,0	20,55	4,76
30,0	29,58	2,92

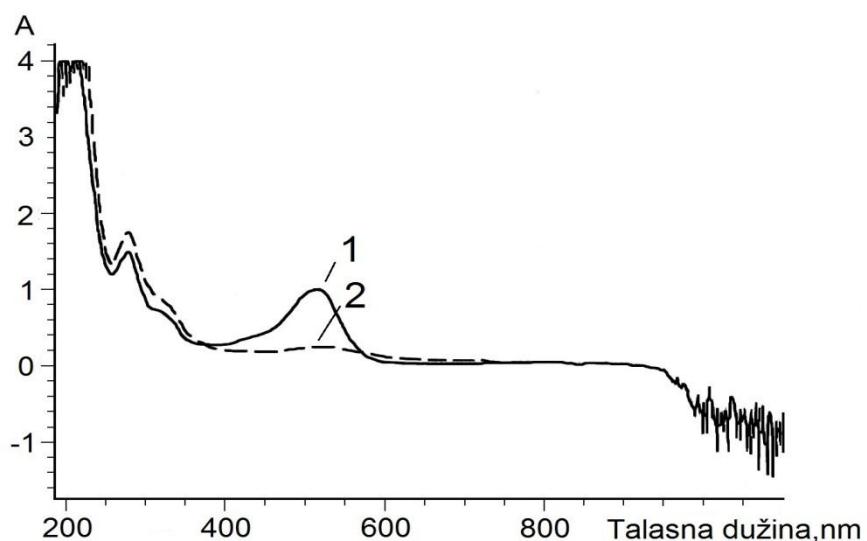
Rezultati iz tabela 4.58 i 4.59 pokazuju da se antocijani u cedenim sokovima višnje predloženom kinetičkom metodom mogu određivati sa zadovoljavajućom preciznošću i tačnošću.

Primena metode za određivanje antocijana

Na osnovu predhodno razrađene kinetičke metode za određivanje antocijana, koja se bazira na reakciji degradacije antocijana vodonik peroksidom u prisustvu Cu(II) jona i konstruisane kalibracione krive za određivanje antocijana u intervalu od 6,60 do 37,80 $\mu\text{g/ml}$, metoda je primenjena za određivanje antocijana u ceđenom soku tri sorte višnji: Marele, Oblačinske višnje i Cigančice.

Na slici 4.89 je prikazan apsorpcioni spektar soka višnje pri pH=1,0 i pH=4,5, koji je poslužio za određivanje sadržaja antocijana u soku višnje pH-diferencijalnom metodom, koja je korišćena kao uporedna metoda.

Rezultati određivanja sadržaja antocijana u ceđenim sokovima višnji prikazani su u tabeli 4.60. Poređenjem standardnih devijacija, i vrednosti F- i t-testa, pri 95%-nom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i uporedne spektrofotometrijske metode ne postoji velika razlika u preciznosti, $t_{\text{eksp}} < t_{\text{tab}}$ i $F_{\text{eksp}} < F_{\text{tab}}$. Dakle, razrađena kinetičko-spektrofotometrijska metoda se može uspešno primeniti za određivanje sadržaja antocijana u ceđenim sokovima višnje.



Slika 4.89. Apsorpcioni spektar cedjenog soka višnje pri 1) pH= 1,0 i 2) pH=4,5.

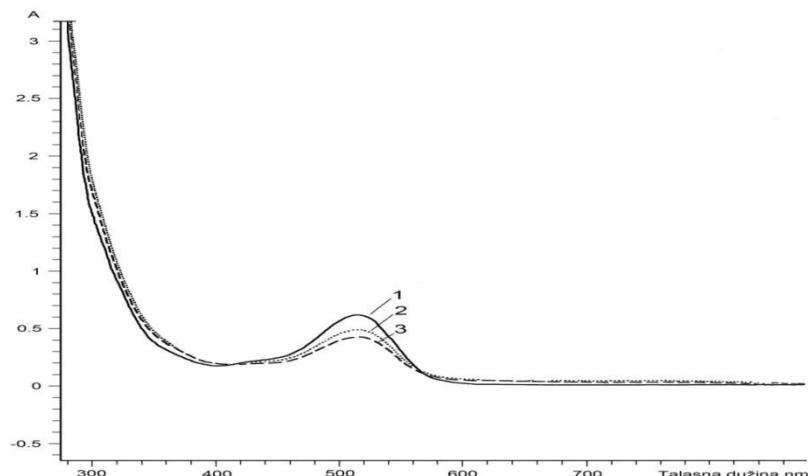
Tabela 4.60. Određivanje sadržaj (mg/L)^{1,2} antocijana u ceđenim sokovima višnji kinetičko-spektrofotometrijskom i pH-diferencijalnom metodom.

Sok	Kinetičko-spektrofotometrijska metoda	pH-diferencijalna metoda	t- test ³	F- test ³
Marela	321,98±4,68	328,68±5,18	2,15	1,22
Cigančica	577,56±6,45	582,35±6,41	1,18	0,97
Oblačinska	595,91±4,97	602,39±5,16	2,02	1,08

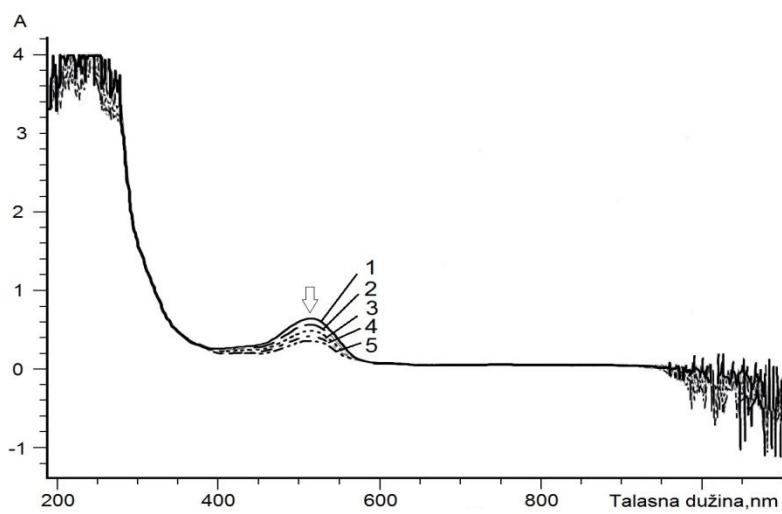
¹srednja vrednost ± SD (n=5); ²mg cijanidin-3-glukozid ekvivalenta/L soka; ³tabelarne F- i t-vrednosti pri 95%-nom nivou poverenja su 6,39 i 2,306.

4.2.6. Kinetičko-spektrofotometrijsko ispitivanje reakcije degradacije antocijana soka crvene ribizle

U cilju ispitivanja kinetike degradacije antocijana u ceđenom soku crvene ribizle snimljeni su apsorpcioni spektri sistema sok + voda (0,4 ml soka, zapremina reakcionog rastvora je 5 ml), sok + H_2O_2 + voda i sok + H_2O_2 + Cu(II) + voda pri pH=3,5 (podešen vinskom kiselinom) tri minuta od pripremanja reakcione smeše. Na apsorpcionom spektru osnovne apsorpcione trake antocijana u soku crvene ribizle (kriva 1, slika 4.90) u prisustvu vodonik peroksidom javlja se smanjenje apsorbancije na talasnoj dužini od 520 nm (kriva 2). Smanjenje apsorpcionog maksimuma na 520 nm je znatno izraženije kada se reakcionom sistemu pored vodonik peroksida dada i Cu(II), što ukazuje na katalitički efekat Cu(II) jona. Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da se brzina reakcija degradacije antocijana hidroksil radikalima može pratiti snimanjem kinetičkih krivih $A=f(t)$ na 520 nm, tokom 35 min nakon mešanja reakcione smeše (slika 4.91). Dobijene zavisnosti su linearne u toku prvih 20-25 min odigravanja reakcije, što je omogućilo primenu diferencijalne varijante tangensne metode.



Slika 4.90. Apsorpcioni spektar: 1) vodenog rastvora soka crvene ribizle, 2) vodenog rastvora soka višnje + H_2O_2 , 3) vodenog rastvora soka višnje + H_2O_2 + Cu(II). Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(soka)=0,4\text{ ml}$; $H_2O_2 = 0,098\text{ mol/L}$; $Cu(II) = 1,232 \cdot 10^{-4}\text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

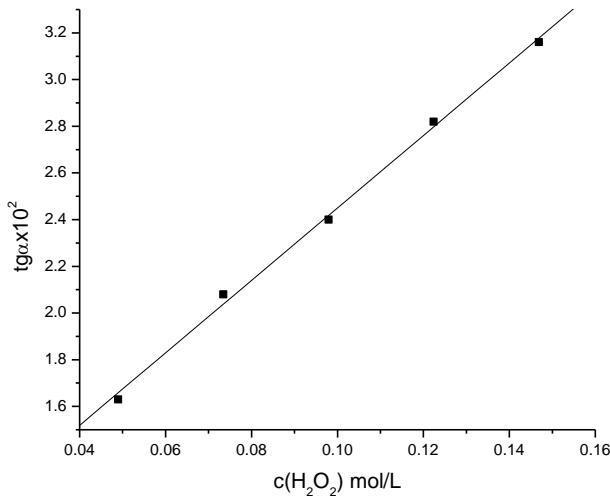


Slika 4.91. Promena apsorpcionog spektra reakcione smeše vodenog rastvora soka crvene ribizle + H_2O_2 + Cu(II) sa vremenom nakon 1) 1 min; 2) 6 min; 3) 11 min; 4) 16 min; 5) 21 min. Koncentracije reaktanata u rastvoru: V(soka)-0,5 ml; H_2O_2 - 0,098 mol/L; Cu(II) = $1,232 \cdot 10^{-4}$ mol/L; pH=3,5; t = $25 \pm 0,1^\circ C$.

4.2.6.1. Kinetičke i termodinamičke karakteristike sistema

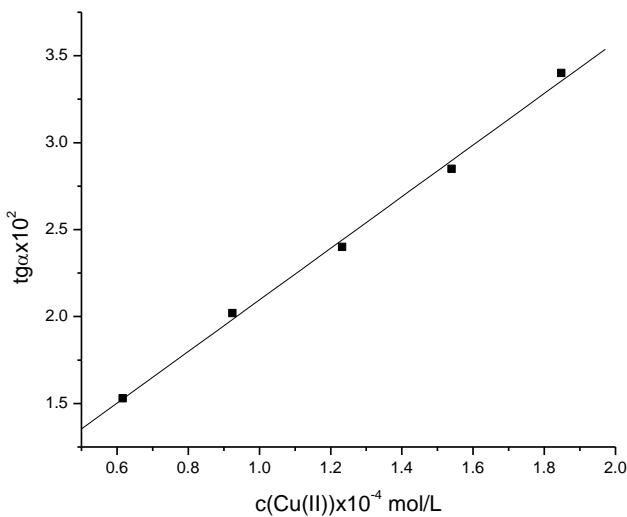
U cilju optimizacije uslova odigravanja reakcije degradacije i razrade kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje cijanidina u soku crvene ribizle i drugih vrsta voća u kojima su prisutni samo derivati cijanidina, kao što je malina, ispitana je uticaj temperature, promene koncentracije reagujućih komponenti (H_2O_2 , Cu(II) i antocijana), temperature i rastvarača na brzinu reakcije degradacije.

Uticaj koncentracije H_2O_2 na brzinu ispitivane reakcije praćen je u intervalu od 0,049 do 0,147 mol/L (slika 4.92). Kako je zavisnost linearna u celom intervalu koncentracije reakcija je +1 reda u odnosu na koncentraciju H_2O_2 . Za dalji rad je odabrana koncentracija od 0,098 mol/L.



Slika 4.92. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije H_2O_2 . Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(soka) = 0,5 \text{ ml}$; $Cu(II) = 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

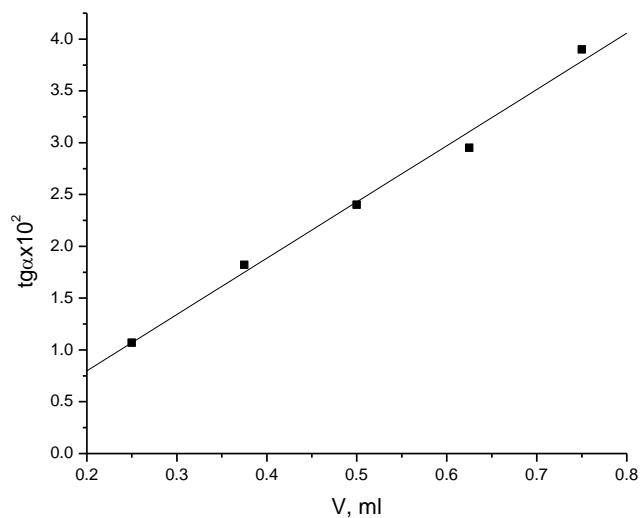
Uticaj koncentracije Cu(II) jona na brzinu reakcije je posmatran u intervalu $(0,615-1,838) \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$. Brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije ovog reaktanta, te je reakcija +1 reda u odnosu na Cu(II) u celom ispitivanom intervalu koncentracije (slika 4.93). Koncentracija Cu(II) od $1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ je odabrana za dalji rad.



Slika 4.93. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije Cu(II). Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(soka) = 0,5 \text{ ml}$; $H_2O_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

Zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana u reakcionaloj smeši prikazana je na slici 4.94. Različite količine cijanidina su dobijene odmeravanjem različitih zapremina soka od 0,25 do 0,75 ml (zапремина reakcionog suda je 5,0 ml). Brzina reakcije linearno raste

sa povećanjem zapremine soka u reakcionej smeši, te je reakcija +1 reda u odnosu na koncentraciju cijanidina. Slika 4.88 prikazuje ovu zavisnost, pri čemu je određeno da odsečak ove prave na osu $tga \cdot 10^2$ iznosi $0,55 \cdot 10^{-2}$.



Slika 4.94. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $H_2O_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $Cu(II) = 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

Na osnovu predhodno dobijenih zavisnosti brzine reakcije degradacije od koncentracije reaktanata pojedinačno, kao i određivanog reda reakcije u odnosu na koncentraciju svakog reaktanta pojedinačno, može se postaviti kinetička jednačina za ispitivani proces degradacije antocijana u soku crvene ribizle:

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot C_{H_2O_2} \cdot C_{Cu(II)} \cdot C_{antocijani} \quad 4.17$$

za interval koncentracija:

$$H_2O_2 = 0,0489 - 0,1469 \text{ mol/L}$$

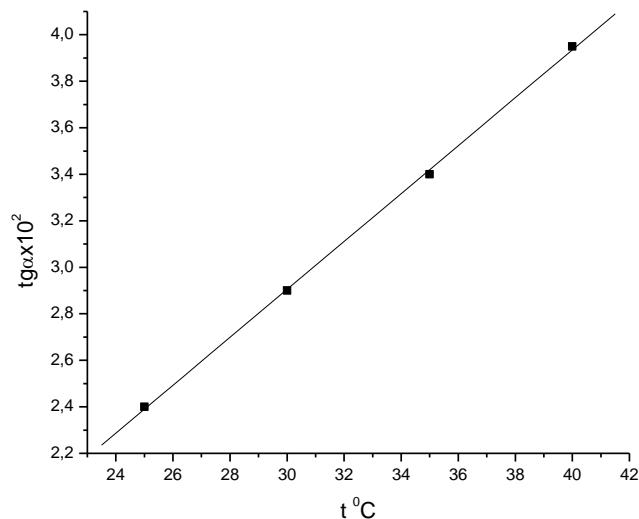
$$Cu(II) = (0,615-1,838) \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$V(\text{soka}) = 0,25 - 0,75 \text{ ml}$$

gde je: $-dc/dt$ = promena koncentracije cijanidina

k = konstanta brzine reakcije

Brzina ispitivane reakcije praćena je pri odabranim koncentracionim uslovima na četiri temperature: 25, 30, 35 i 40°C. Na osnovu rezultata zavisnosti brzina reakcija od temperature za zapreminu soka od 0,5 ml dobijen je grafik prikazan na slici 4.95.



*Slika 4.95. Zavisnost brzine reakcije od temperature. Koncentracije reaktanata u rastvoru:
V(soka) = 0,5 ml; H₂O₂ - 0,098 mol/L; Cu(II) - 1,232 · 10⁻⁴ mol/L; pH=3,5.*

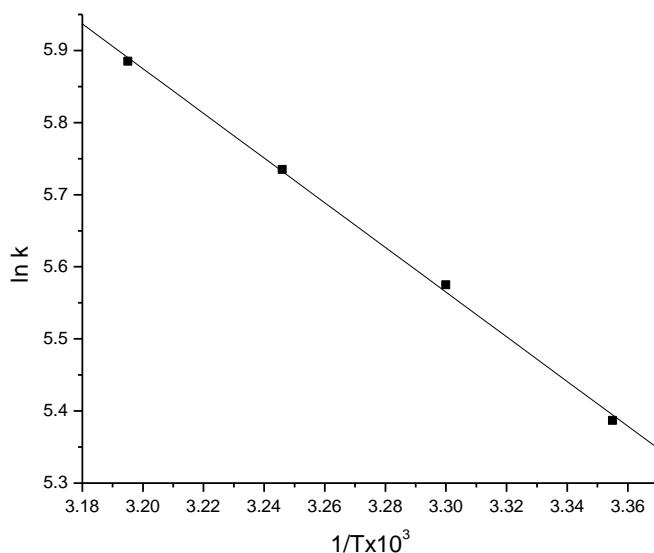
Na osnovu kinetičke jednačine 4.17 izračunate su konstante brzine reakcije na četiri temperature uzimajući u obzir da je molarna masa cijanidin-3-glukozida 449,2 g mol⁻¹, molarni apsorpcioni koeficijent 26 900 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ i da je pH-diferencijalnom metodom određeno da je koncentracija cijanidina u ovoj reakcionaloj smeši 0,339 · 10⁻³ mol C3GE/L (tabela 4.61).

Tabela 4.61. Konstante brzine reakcije degradacije antocijana u soku crvene ribizle hidroksil radikalima na različitim temperaturama.

t°C	k ¹ , mol ² dm ⁻⁶ min ⁻¹
25	2,18 · 10 ²
30	2,64 · 10 ²
35	3,10 · 10 ²
40	3,59 · 10 ²

¹srednja vrednost (n=5).

Termodinamički parametri reakcije degradacije antocijana hidroksil radikalima određeni su na osnovu nagiba prave prikazane na slici 4.96.



Slika 4.96. Zavisnost $\ln k$ od recipročne vrednosti apsolutne temperature.

Iz nagiba ove prave izračunata je energija aktivacije a potom i ostali termodinamički parametri, promena entalpije (ΔH^*), promena entropije (ΔS^*), promena slobodne energije (ΔG^*) i pK^* vrednost građenja aktiviranog kompleksa, primenom jednačina 4.2-4.6. Vrednost izračunatih termodinamičkih parametara aktiviranog kompleksa reakcije degradacije antocijana u soku crvene ribizle hidroksil radikalima dati su u tabeli 4.62.

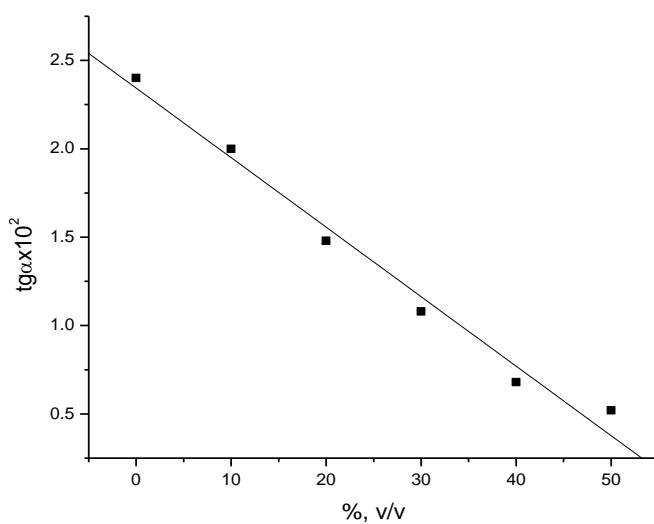
Tabela 4.62. Termodinamički parametri aktiviranog kompleksa reakcije degradacije antocijana crvene ribizle hidroksil radikalima na 295K.

Ea (kJmol ⁻¹)	ΔH^* (kJmol ⁻¹)	ΔS^* (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG^* (kJmol ⁻¹)	pK^*
25,76	23,29	-121,92	59,61	10,45

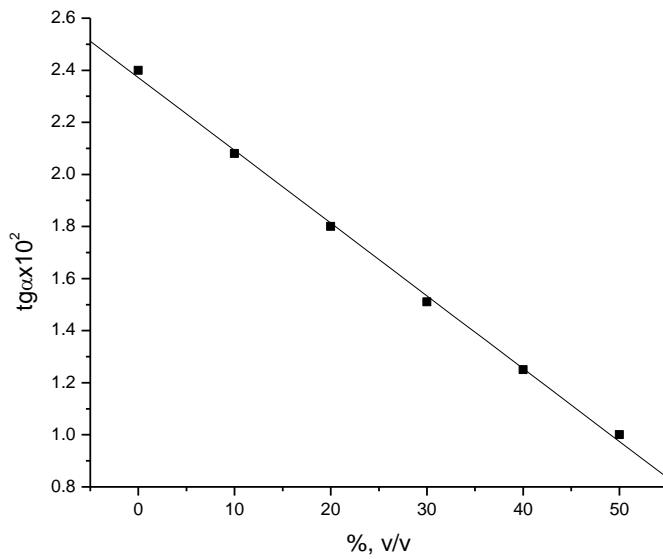
4.2.6.2. Uticaj rastvarača na brzinu reakcije degradacije antocijana hidroksil radikalima

U ovom radu razmotren je uticaj acetona, etanola i metanola kao rastvarača i upoređen sa vodom kao rastvaračem. Ovi rastvarači imaju sledeće vrednosti dialetrične konstante: 20,7 , 24,3 , 32,6 i 78,5 za vodu. Detaljna analiza efekta rastvarača na brzinu reakcije zahteva šire poznavanje teorije tečnosti i upotrebu semimetrijskih metoda, zato su date samo termodinamičke karakteristike sistema u prisustvu navedenih rastvarača.

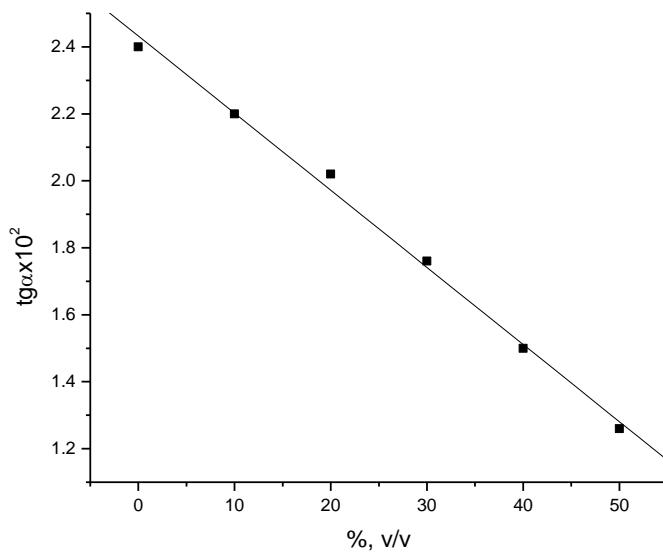
Zavisnost brzine reakcije degradacije cijanidina u soku crvene ribizle praćena je sa promenom procentnog sastava acetona, etanola i metanola što je prikazano na slikama 4.97, 4.98 i 4.99, odakle se vidi da brzina reakcije opada sa povećanjem sadržaja rastvarača u reakcionoj smeši od 0 do 50%. Zapaženo je da najveće smanjenje brzine reakcije u prisustvu acetona, tj. rastvarača najmanje polarnosti.



Slika 4.97. Zavisnost brzine reakcije od sadržaja acetona. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(\text{soka}) = 0,5 \text{ ml}$; $H_2O_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $Cu(II) - 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 4.98. Zavisnost brzine reakcije od sadržaja etanola. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(soka) = 0,5 \text{ ml}$; $H_2O_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $Cu(II) - 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.



Slika 4.99. Zavisnost brzine reakcije od sadržaja metanola. Koncentracije reaktanata u rastvoru: $V(soka) = 0,5 \text{ ml}$; $H_2O_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $Cu(II) - 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $pH=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ C$.

Brzina reakcije degradacije praćena je pri sadržaju od 10% v/v metanola, etanola i acetona pojedinačno, pri istim reakcionim uslovima odigravanja reakcije na četiri

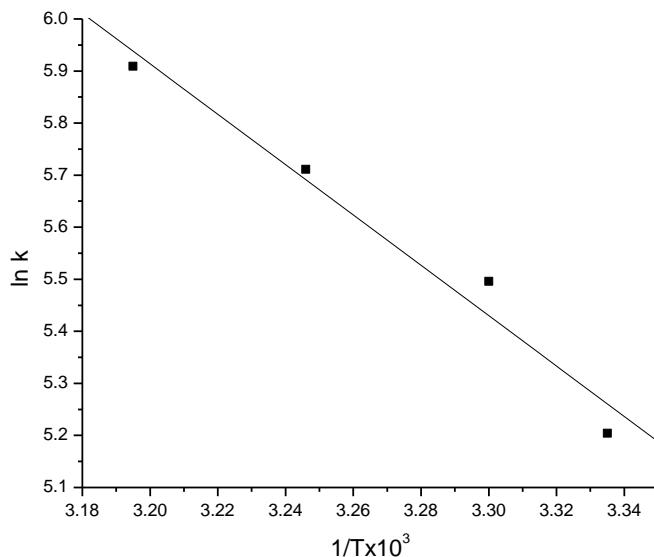
temperature: 25, 30, 35 i 40°C. Na osnovu kinetičke jednačine (4.17) izračunate su konstante brzine reakcije na četiri različite temperature (tabela 4.63)

Tabela 4.63. Konstante brzine reakcije degradacije antocijana u soku crvene ribizle hidroksil radikalima na različitim temperaturama u različitim rastvaračima.

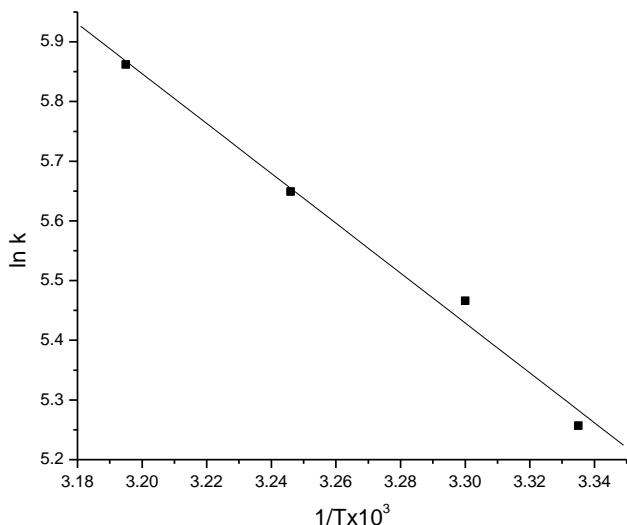
t°C	k ¹ (10% aceton)	k (10% etanol)	k (10% metanol)
	mol ² dm ⁻⁶ min ⁻¹	mol ² dm ⁻⁶ min ⁻¹	mol ² dm ⁻⁶ min ⁻¹
25	1,82·10 ²	1,89·10 ²	2,03·10 ²
30	2,44·10 ²	2,37·10 ²	2,47·10 ²
35	3,02·10 ²	2,84·10 ²	2,94·10 ²
40	3,69·10 ²	3,51·10 ²	3,41·10 ²

¹srednja vrednost (n=5).

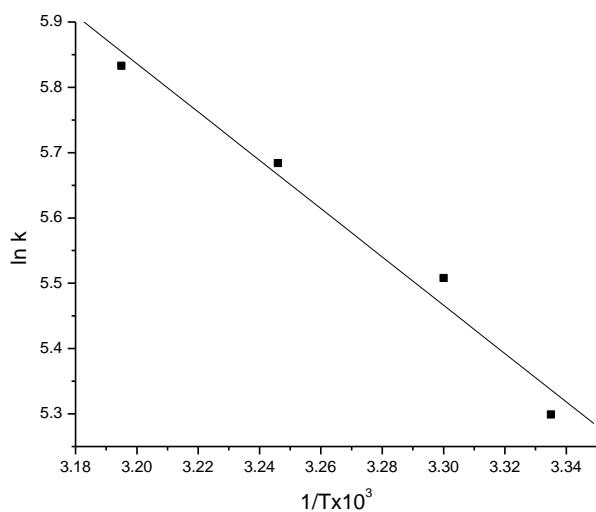
Termodinamički parametri akriviranog kompleksa reakcije degradacije određeni su na osnovu vrednosti nagiba pravih $\ln k = f(1/T \cdot 10^3)$ (slika 4.100, 4.101 i 4.102)(tabela 4.64)



Slika 4.100. Zavisnost ln k od recipročne vrednosti absolutne temperature u 10% acetonu.



Slika 4.101. Zavisnost $\ln k$ od recipročne vrednosti absolutne temperature u 10% etanolu.



Slika 4.102. Zavisnost $\ln k$ od recipročne vrednosti absolutne temperature u 10% metanolu.

Tabela 4.64. Termodinamičke karakteristike aktiviranog kompleksa reakcije degradacije antocijana u soku crvene ribizle hidroksil radikalima na 298 K.

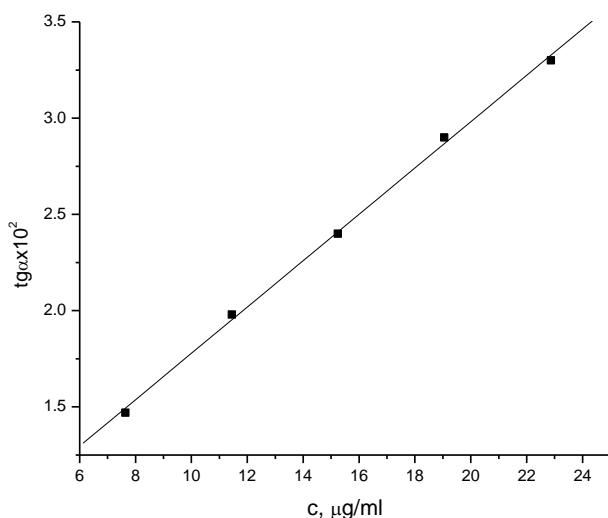
Sistem	E_a	ΔH^*	ΔS^*	ΔG^*	pK^*
u 10%	kJmol^{-1}	kJmol^{-1}	$\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	kJmol^{-1}	
Metalolu	30,78	28,28	-105,86	59,83	10,49
Etanolu	34,73	32,26	-93,10	60,00	10,52
Acetonu	40,23	37,76	-74,86	60,07	10,53

4.2.6.3. Validacija kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje antocijana u soku crvene ribizle i maline

Validacija metode izvršena je određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, tačnosti i preciznosti.

Linearost

S obzirom da koncentracija cijanidina u uzorku soka crvene ribizle nije poznata, uz različite zapremine soka dodavana je uvek ista količina standrada, cijanidin-3-glukozida ($10,0 \mu\text{g/ml}$) a potom na osnovu jenačine (4.7) izračunat sadržaj cijanidina u reakcionej smeši. Na slici 4.103 je data kalibraciona kriva koja je linearna u intervalu od $7,64$ do $22,87 \mu\text{g/ml}$ i može se primeniti za određivanje antocijana u uzorcima soka u kojima su prisutni različiti derivati cijanidina kao što je to slučaj sa sokom crvene ribizle i maline.



Slika 4.103. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije antocijana. Koncentracije u reaktanata u rastvoru: $\text{Cu(II)} - 1,232 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$; $\text{H}_2\text{O}_2 - 0,098 \text{ mol/L}$; $\text{pH}=3,5$; $t = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Ova zavisnost se može predstaviti jednačinom:

$$\text{tg}\alpha = 0,12033 \cdot c_x + 0,575 \quad 4.18$$

$$r = 0,998 \quad s_0 = 0,036$$

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (c_L) i limit kvantifikacije (c_Q) određeni su korišćenjem jednačina 2.46 i 2.47. Dobijene vrednosti su 0,98 i 2,99 µg/ml.

Preciznost i tačnost metode određivanja antocijana u sokovima crvene ribizle

Preciznost metode je određena odmeravanjem iste zapremine ceđenog soka crvene ribizle (0,25 ml) bez i sa dodatkom Cy-3-G (8,0; 15,0) iz pet ponavljanja. Za svaku reakcionu smešu izračunata je relativna standardna devijacija (RSD). Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka dati su u tabeli 4.65.

Tabela 4.65. Preciznost određivanja antocijana u sokovima crvene ribizle.

Dodato Cy-3-G (µg/ml)	Ukupno antocijana (µg/ml)	RSD (n=5) %
0	7,64	3,56
8,0	15,24	1,82
15,0	22,87	2,45

Tačnost metode je definisana odnosom određene i dodata koncentracije standardnog rastvora C3G u istoj zapremini soka iz pet merenja. Izračunata je relativna greška, a rezultati prikazani u tabeli 4.66.

Tabela 4.66. Tačnost određivanja antocijana u sokovima crvene ribizle.

Dodato Cy-3-G (µg/ml)	određeno Cy-3-G (µg/ml)	RG %
5,0	5,12	7,53
10,0	10,21	5,96
15,0	14,93	2,54

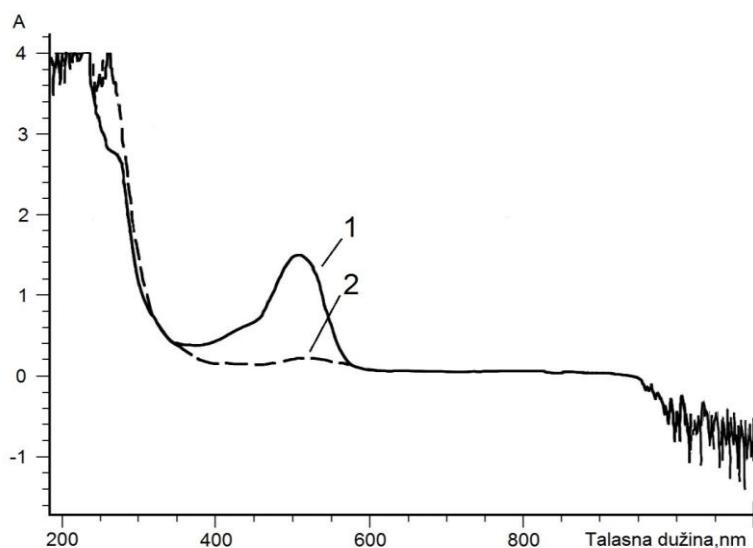
Rezultati iz tabela 4.65 i 4.66. pokazuju da se antocijani u ceđenim sokovima višje predloženom kinetičkom metodom mogu određivati sa zadovoljavajućom preciznošću i tačnošću.

Primena metode za određivanje antocijana

Na osnovu predhodno razradene kinetičko-spektrofotometrijske metode za određivanje antocijana, koja se bazira na reakciji degradacije antocijana vodonik peroksidom u prisustvu Cu(II) jona i konstruisane kalibracione krive za određivanje antocijana u intervalu od 7,64 do

22,87 $\mu\text{g/ml}$, metoda je primenjena za određivanje antocijana u ceđenim sokovima crvene ribizle i maline gajenih na Vlasini i u Niškoj Banji.

Na slici 4.104 je prikazan apsorpcioni spektar soka maline pri pH=1,0 i pH=4,5, koji nam je poslužio za određivanje sardžaja antocijana u soku maline pH-diferencijalnom metodom. pH-diferencijalna spektrofotometrijska metoda je korišćena kao uporedna metoda.



Slika 4.104. Apsorpcioni spektar ceđenog soka maline pri 1) pH= 1,0 i 2) pH=4,5.

Rezultati određivanja sadržaja antocijana u ceđenim sokovima crvene ribizle i maline prikazani su u tabeli 4.67. Poređenjem standardnih devijacija i vrednosti F- i t-testa, pri 95% -nom nivou poverenja i za dati broj stepena slobode, uočeno je da između kinetičke i uporedne spektrofotometrijske metode ne postoji velika razlika u preciznosti, $t_{eksp.} < t_{tab.}$ i $F_{eksp.} < F_{tab.}$. Dakle, razrađena kinetičko-spektrofotometrijska metoda se može uspešno primeniti za određivanje sadržaja antocijana u ceđenim sokovima crvene ribizle i maline.

Tabela 4.67. Određivanje sadržaj (mg/L)^{1,2} antocijana u ceđenim sokovima crvene ribizle I maline kinetičko-spektrofotometrijskom i pH-diferencijalnom metodom.

Sok	Kinetičko-spektrofotometrijska metoda	pH-diferencijalna metoda	t-test	F-test
Ribizla N.Banja	147,55±2,28	150,80±3,05	1,91	1,79
Ribizla Vlasina	163,58±3,36	168,20±4,50	1,84	1,79
Malina N.Banja	336,60±6,11	340,82±6,33	1,07	1,07
Malina Vlasina	382,65±5,57	386,73±7,08	0,89	0,87

¹srednja vrednost ± SD (n=5); ²mg cijanidin-3-glukozid ekvivalenta/L soka; ³tabelarne F- i t-vrednosti pri 95%-nom nivou poverenja su 6,39 i 2,306.

5. DISKUSIJA REZULTATA

5.1. Kinetika i mehanizam degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima

Ispitivanja kinetike degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima prikazana u ovom radu su pokazala da se proces može predstaviti jednačinom:

- za bela vina u kiseloj sredini ($\text{pH}=3,5$) pri koncentraciji H_2O_2 od $0,098$ do $0,294$ mol/L i Cu(II) od $1,232 \cdot 10^{-4}$ do $3,696 \cdot 10^{-4}$ mol/L:

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{Cu(II)}} \cdot c_{\text{polifenoli}}$$

gde je dc/dt - povećanje koncentracije reakcionih produkata u belom vinu ($\lambda=420$ nm),

- za crvena vina u kiseloj sredini ($\text{pH}=3,5$) pri koncentraciji H_2O_2 od $0,049$ do $0,490$ mol/L i Cu(II) od $0,615 \cdot 10^{-4}$ do $6,150 \cdot 10^{-4}$ mol/L:

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{Cu(II)}} \cdot c_{\text{antocijani}}$$

gde je $-dc/dt$ - smanjenje koncentracije ukupnih antocijana u crvenom vinu ($\lambda=520$ nm),

- za malvidin-3-glukozid i malvidin-3-acetil-glukozid u crvenim vinima u kiseloj sredini ($\text{pH}=3,5$) pri koncentraciji H_2O_2 od $4,90 \cdot 10^{-3}$ do $24,48 \cdot 10^{-3}$ mol/L i Cu(II) od $0,615 \cdot 10^{-5}$ do $3,080 \cdot 10^{-5}$ mol/L:

$$-\frac{dc}{dt} = k_{\text{M3G}} \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{Cu(II)}} \cdot c_{\text{Mv-3-G}}$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_{\text{M3AG}} \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{Cu(II)}} \cdot c_{\text{Mv-3-AG}}$$

gde je $-dc/dt$ - smanjenje koncentracije Mv-3-G , odnosno Mv-3-AG u crvenom vinu ($\lambda=520$ nm),

- za katehin i epikatehin u crvenim vinima u kiseloj sredini ($\text{pH}=3,5$) pri koncentraciji H_2O_2 od $4,90 \cdot 10^{-3}$ do $24,48 \cdot 10^{-3}$ mol/L i Cu(II) od $0,615 \cdot 10^{-5}$ do $3,080 \cdot 10^{-5}$ mol/L:

$$-\frac{dc}{dt} = k_C \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{Cu(II)}} \cdot c_C$$

$$-\frac{dc}{dt} = k_{\text{EC}} \cdot c_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot c_{\text{Cu(II)}} \cdot c_{\text{EC}}$$

gde je $-dc/dt$ - smanjenje koncentracije katehina, odnosno epikatehina u crvenom vinu ($\lambda=275/322$ nm),

- za ceđene sokove od višanja u kiseloj sredini ($\text{pH}=3,5$) pri koncentraciji H_2O_2 od

0,0196 do 0,0979 mol/L i Cu(II) $< 1,232 \cdot 10^{-4}$ mol/L:

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{Cu(II)} \cdot c_{antocijani}$$

gde je $-dc/dt$ – smanjenje koncentracije ukupnih antocijana u ceđenom soku od višanja ($\lambda=520$ nm),

- za ceđene sokove od crvenih ribizli i malina u kiseloj sredini (pH=3,5) pri koncentraciji H_2O_2 od 0,049 do 0,149 mol/L i Cu(II) od $0,615 \cdot 10^{-4}$ do $1,838 \cdot 10^{-4}$ mol/L:

$$-\frac{dc}{dt} = k \cdot c_{H_2O_2} \cdot c_{Cu(II)} \cdot c_{antocijani}$$

gde je $-dc/dt$ – smanjenje koncentracije ukupnih antocijana u ceđenom soku od crvenih ribizli i malina ($\lambda=520$ nm).

Kinetičke jednačine pokazuju da su reakcije prvog reda u odnosu na reaktatne: fenolna jedinjenja, H_2O_2 i Cu(II) kao katalizatora.

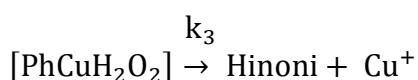
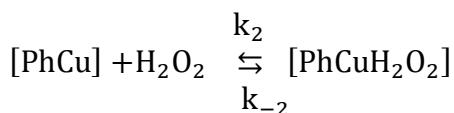
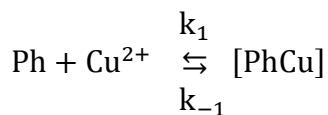
Mnogi slučajevi katalize u rastvorima mogu se objasniti građenjem kompleksa sa prenosom nanelektrisanja između katalizatora i jednog od reaktanta. Nastajanje ovakvih jedinjenja karakteristično je za aromatična jedinjenja (amini, fenoli), pa se može predpostaviti da se katalitička oksidacija fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vrši po ovom mehanizmu.

Pri nastajanju kompleksa sa prenosom nanelektrisanja dolazi do delimičnog prelaza elektrona sa jednog na drugi reaktant, i može se očekivati da su takvi procesi praćeni povećanjem reakcione sposobnosti reaktanata. Delovanje katalizatora u smislu reakcionog centra koji polarizuje supstrat je u vezi sa njegovim elektrofilnim osobinama, tj. sa njegovim ponašanjem kao Luisove kiseline. Osnovni faktori koji utiču na katalitički efekat su jonizacioni potencijal katalizatora i mogućnost građenja kompleksa sa supstratom.

Za nastajanje kompleksa sa prenosom nanelektrisanja neophodno je prepokrivanje ili slobodne orbitale reaktanta sa slobodnom ili popunjenoj orbitalom katalizatora. Prirodno je očekivati građenje takvih kompleksa u prisustvu katalizatora kakav je slučaj sa Cu(II), koji je u ovom radu korišćen.

Prenos elektrona između katalizatora i reaktanta može proticati po različitim mehanizmima. Najčešće katalizator gradi kompleks sa organskim reagensom. Međutim, u prisustvu H_2O_2 kao oksidansa mogu nastati prelazni kompleksi tipa katalizator-organski reagens-oksidans. Nakon prenosa nanelektrisanja ovaj kompleks se razara na oksidacione proizvode i redukovani oblik katalizatora. Redukovani oblik katalizatora dalje reaguje sa oksidansom. Ovakav mehanizam je moguć ako se proces oksidacije redukovanih oblika katalizatora odigrava znatno brže od predhodnih.

Na osnovu literaturnih podataka i eksperimentalnih rezultata moguće je predložiti sledeći mehanizam katalitičkog dejstva Cu(II) u reakciji oksidacije fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima:



što je moguće ako se proces 5.1 odigrava znatno brže od predhodnih. U ovom slučaju direktna interakcija organskog reduktora sa vodonik peroksidom je kinetički sprečena. Takođe je verovatno formiranje prelaznog kompleksa između Cu(I) i supstrata unutar koga se regeneriše Cu(II). Verovatnoću ovakve predpostavke potvrđuje veliki višak oksidansa u odnosu na druge reagense.

Brzina ispitivanih reakcija biće jednak:

$$v = k_3 \cdot [\text{PhCuH}_2\text{O}_2]$$

Ovde imamo dve prelazne ravnoteže. Koncentracije prelaznih supstanci (aktiviranih kompleksa) izračunavamo iz konstanti ravnoteža:

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{PhCu}]}{[\text{Ph}]\{[\text{Cu}^{2+}] - [\text{PhCu}] - [\text{PhCuH}_2\text{O}_2]\}} \quad 5.2$$

$$K_2 = \frac{[\text{PhCuH}_2\text{O}_2]}{[\text{PhCu}] \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]}$$

Ako se uzme da je količina $[\text{PhCu}] = X_1$ uporediva sa količinom Cu^{2+} , i da je $[\text{PhCuH}_2\text{O}_2] = X_2$ uporedivo po veličini sa $[\text{PhCu}]$, iz jednačine 5.2 nalazimo:

$$X_1 = \frac{K_1[\text{Ph}] \cdot [\text{Cu}^{2+}]}{1 + K_1[\text{Ph}] (1 + K_2[\text{H}_2\text{O}_2])}$$

$$X_2 = \frac{K_1 K_2 [Ph] \cdot [H_2O_2] \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_1 [Ph] (1 + K_2 [H_2O_2])}$$

Odavde je brzina reakcije jednaka:

$$v = k_3 [X_2] = \frac{k_3 K_1 K_2 [Ph] \cdot [H_2O_2] \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K_1 [Ph] (1 + K_2 [H_2O_2])} \quad 5.3$$

Shodno jednačini 5.3, red reakcije u odnosu na oba reaktante Ph i H₂O₂ nije ceo broj. Međutim, ako je K₁[Ph] ≪ 1 i K₂[H₂O₂] ≪ 1, brzina reakcije definisana je izrazom:

$$v = k_3 K_1 K_2 [A] \cdot [B] \cdot [C] \quad 5.4$$

što je u saglasnosti sa dobijenim eksperimentalnim podacima. Predloženi mehanizam pripada prvom tipu reakcija koje se odigravaju uz obrazovanje prelaznih jedinjenja Arenijusovog tipa (deo 2.1.3).

5.1.1. Mehanizam degradacije fenolnih jedinjenja belih vina

Rezultati spektrofotometrijske analize predstavljeni u tabeli 4.16 ukazuju da su varijacije sadržaja fenolnih jedinjenja belih vina posledica delovanja velikog broja faktora, koji pored genetskih uključuju i područje kultivisanja grožđa kao i mnogobrojne faktore životne sredine. Najzastupljenija komponenta belog vina je kaftarna kiselina, slede epikatehin i katehin i druge hidroksicimetne kiseline. Ukoliko bela vina dođu u kontakt sa kiseonikom promene boju zbog procesa brovingovanja. Brovingovanje belih vina zavisi od fenolnog sastava, ali su od podjednake važnosti i faktori koji utiču na oksidaciju fenolnih jedinjenja kao što su joni prelaznih metala u prisustvu askorbinske kiseline ili H₂O₂. Kao rezultat procesa oksidacije fenolnih jedinjenja belih vina nastaju oksidacioni proizvodi, što se može uočiti pojavljivanjem novog apsorpcionog maksimuma na 420 nm. Za vina proizvedena u Srbiji, razvoj brovingovanja nije ispitana. Naši rezultati su pokazali da proces brovingovanja fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima koji nastaju u sistemu Cu(II)/H₂O₂, prati bifazni tok, prvo naglim povećanjem i kasnjim smanjenjem, a potom sledi linearno povećanje sadržaja oksidacionih produkata. Hipoteza koja može objasniti ovakvo ponašanje je sledeća: početno povećanje sadržaja oksidacionih proizvoda može biti pripisano formiranju hinona nakon oksidacije kaftarne kiseline, supstrat prisutan u najvećoj količini (tabela 4.19),

koji zatim može biti redukovani pomoću SO_2 , koji se dodaje vinu za sprečavanje procesa oksidacije, a rezultat je bio trenutno smanjenje i opadanje potamnjivanja. Kasniji proces polimerizacije uslovljava povećanje procesa brojne i povećanje apsorpcionog maksimuma na 420 nm.

Potvrda o predloženim mehanizmu nađena je u literaturi.

Mauri (2007) je ispitivao kinetiku oksidacije fenola Fentonovim reagensom ($\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$) pri čemu je odnos koncentracije $\text{Fe(II)} : \text{H}_2\text{O}_2$ iznosio od 1 : 5 do 1 : 1. Za reakciju oksidacije fenola vodonik peroksidom u prisustvu Fe(II) kao katalizatora, u model rastvoru postavio je kinetičku jednačinu:

$$-\frac{d[\text{Ph}]}{dt} = k[\text{Ph}] \cdot [\text{Fe(II)}]^{1.68} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^{0.68}$$

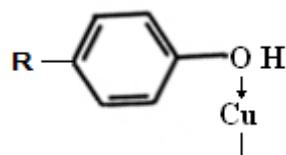
Dakle, reakcija je prvog reda u odnosu na koncentraciju fenola, dok su u odnosu na koncentracije vodonik peroksida i Fe(II) -jona redovi pozitivni, što su i naša ispitivanje pokazala, ali suprotno našim rezultatima redovi reakcije nisu celi brojevi.

Međutim, naši rezultati su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima mnogih autora. *Chunxia i sar. (2005)* su postavili sledeću kinetičku jednačinu:

$$v = k [\text{katalizator}] \cdot [\text{Ph}] \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]$$

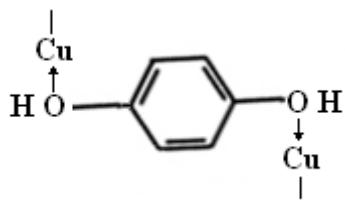
za reakciju oksidacije fenola vodonik peroksidom u prisustvu sintetisanog katalizatora koji u svom sastavu pored bakra sadrži i druge metalne jone kao što su gvožđe i aluminijum. Pri tome su odredili da energija akrivacije ovog procesa iznosi 58,37 kJ/mol. Do sličnih rezultata su došli *Beltan i sar. (2001)* koji su proučavali kinetiku oksidacije organskih jedinjenja Fentonovim reagensom.

Naš predlog mehanizma degradacije fenolnih jedinjenja belih vina hidroksil radikalima predpostavlja mogućnost građenja prelaznih kompleksa tipa $[\text{Ph}-\text{Cu(II)}]$ i $[\text{Ph}-\text{Cu(II)}-\text{H}_2\text{O}_2]$. Mogućnost građenja ovakvih prelaznih jedinjenja je takođe potvrđeno u literaturi. Fenoli i Cu(II) mogu da grade prelazne komplekse monodentatnog tipa $[\text{Cu}-\text{PhO}]^+$, $[\text{Cu}-\text{PhOH}]^{2+}$, pri tome mogu nastati mononuklearni i binuklearni kompleksi. pH ima bitan uticaj na strukturu nagrađenog kompleksa. U rastvorima sa $\text{pH}<7$ preovladava kompleks stehiometrijskog sastava 1:1,



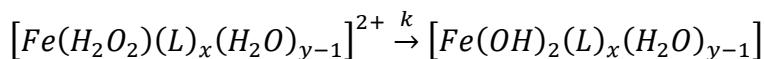
Slika 5.1. Struktura mononuklearnog kompleksa

Dok pri $\text{pH}>8$ mogu nastati binuklearni kompleksi:



Slika 5.2. Struktura binuklearnog kompleksa

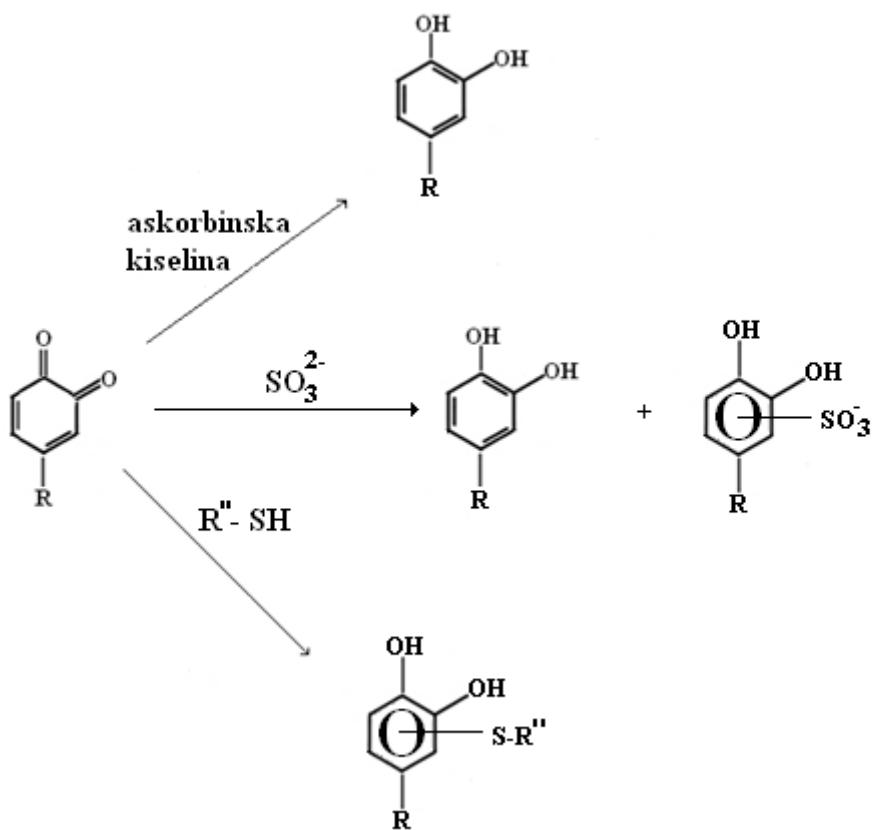
Kada se u reakcioni sistem pored fenolnih jedinjenja i Cu(II)-jona nađe i vodonik peroksid postoji mogućnost građenja trojnog kompleksa reduktor-oksidans-katalizator. Za sistem L (organski supstrat), Fe(II) i H₂O₂, *Rivas i sar.* (2001) su predložili postojanje kompleksa:



Pri čemu je konstanta brzine ove reakcije reda veličine 10² do 10⁻⁴ s⁻¹, što je u skladu sa prirodom helatirajuće sposobnosti fero jona. *Salem i sar.* (1988) su proučavajući kinetiku degradacije vodonik peroksida u prisustvu metalnih kompleksa predpostavili postojanje trojnog kompleksa [Cu²⁺L₄H₂O₂]²⁺. Kompleks slične strukture se može predložiti za sistem fenoli – H₂O₂ – Cu(II).

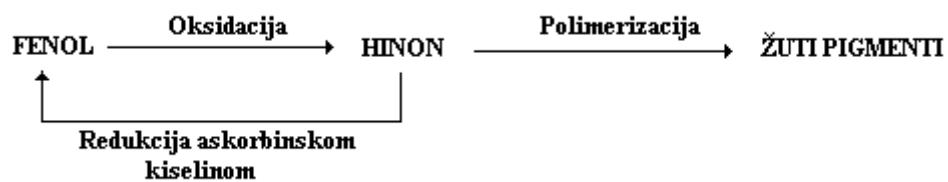
Mnogobrojne studije koje se bave oksidativnim procesima fenolnih jedinjenja su dokazale da njihovom oksidacijom nastaju odgovarajući hinoni. Pri tome su najpodložniji oksidaciji difenoli (*Toit i sar.*, 2006). Nastali hinoni stupaju dalje u reakcije polimerizacije reagujući ili sa polaznim fenolnim jedinjenjem ili sa drugim fenolnim jedinjenjima, prisutnih u sistemu pri čemu nastaju žuti pigmenti (slika 2.32)

Međutim, hinoni mogu reagovati i sa drugim nefenolnim jedinjenjima (askorbinska kiselina, sulfiti, amini idr.):



Slika 5.3. Reakcije hinona sa nefenolnim jedinjenjima

Slika 5.4 pokazuje da se askorbinska kiselina ponaša kao zaštitnik fenolnih jedinjenja od oksidacije. Njeno delovanje se može prikazati sledećom šemom (Roberds i sar. 1999):



Slika 5.4. Šema uticaja askorbinske kiseline na oksidaciju fenolnih jedinjenja

5.1.2. Mehanizam degradacije antocijana crvenih vina

Cilj ispitivanja sastava fenolnih komponenti, metalnih jona i antioksidativne aktivnosti crvenih sorti grožđa i crvenih vina spektrofotometrijskom i HPLC metodom bio je iznalaženje uslova i bolje upoznavanje sistema u kojem je ispitana kinetika degradacije antocijana prisutnih u crvenim vinima. Kinetika degradacije ukupnih antocijana prisutnih u mladim crvenim vinima ispitana je spektrofotometrijskom metodom, dok je kinetika degradacije pojedinačnih antocijana ispitana HPLC metodom.

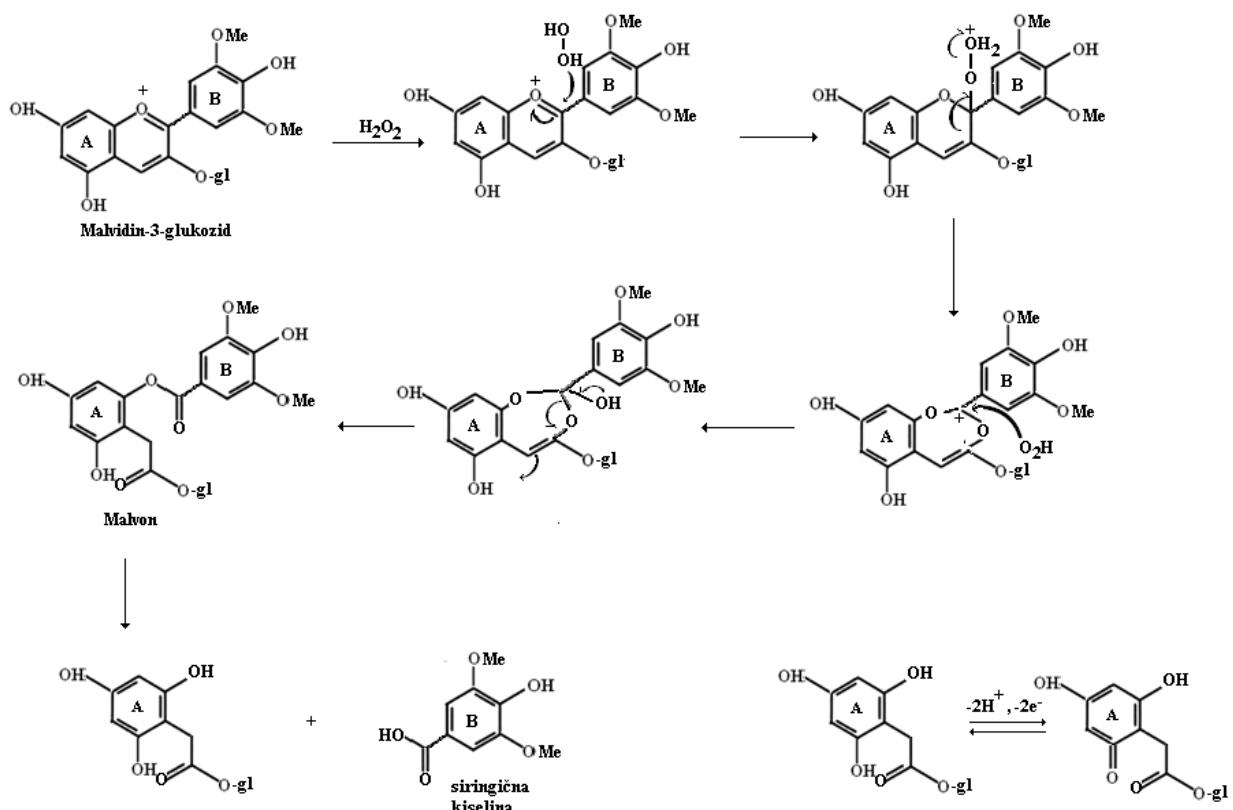
Rezultati spektrofotometrijske analize predstavljeni u tabeli 4.11 ukazuju da je sadržaj monomernih antocijana u crvenim vinima znatno uslovjen starošću vina i da znatno opada sa vremenom čuvanja u boci. Takođe, rezultati HPLC analize crvenih vina predstavljeni u tabeli 4.14 ukazuju na visok sadržaj monomernih antocijana u mladim crvenim vinima. Iz tabele 4.14 se takođe može videti da je najzastupljeniji antocijan u crvenim vinima malvidin-3-glukozid a da potom sledi njegov derivat malvidin-3-acetyl-glukozid. Dakle, najpre je izvršena spektrofotometrijska i HPLC analiza mladog vina Vranac (Rubin- Kruševac), a potom se pristupilo ispitivanju kinetike degradacije antocijana u njemu.

Spektar boje crvenih vina ima maksim na talasnoj dužini $\lambda = 520$ nm (crvena boja), zahvaljujući sadržaju antocijana i njihovih flavilijum jona. Minimum apsorbancije je na talasnoj dužini $\lambda = 420$ nm (žuta boja). Stoga je kinetika degradacije ukupnih antocijana praćena spektrofotometrijskom metodom na osnovu promene absorbancije rastvora na 520 nm, odnosno kinetika degradacije pojedinačnih antocijana, tačnije malvidin-3-glukozida praćena je HPLC metodom na osnovu promene površine odgovarajućih pikova na $\lambda=520$ nm. Proces degradacije antocijana crvenih vina ispitana je u uslovima testa ubrzanog brojegovanja, odnosno u prisustvu hidroksil radikala, koji nastaje u sistemu Cu(II)/H₂O₂.

Lopes i sar. (2007) su ispitivali kinetiku degradacije malvidin-3-glukozida vodonik peroksidom i postavili su hipotetičku šemu ovog procesa. Isti autori su zaključili da se isti degradacioni proizvodi, čiju su strukturu potvrdili NMR metodom, nastaju i u procesu degradacije malvidin-3-glukozida Fentonovim reagensom. Naša ispitivanja kinetike degradacije antocijana spektrofotometrijskom i HPLC metodom pružaju dovoljno podataka da se postavi kinetička jednačina ovog procesa. Međutim, u ovom radu nije određena struktura reakcionih produkata, pa su iz tog razloga pri predlaganju moguće šeme formiranja reakcionih proizvoda korišćeni literaturni podaci (*Lopes i sar. 2007*) (slika 5.5).

Na osnovu predložene šeme formiranja reakcionih produkata pri oksidaciji malvidin-3-glukozida možemo videti da se, pri pH vrednosti vina (pH 3,5) malvidin-3-glukozid degradira na 2,4,6-trihidroksibenzaldehid, siringičnu kiselinu i 8-β-D-glukopiranozil-2,4-dihidroksi-6-okso-cikloheksa-2,4-dienil acetatnu kiselinu. Pri tome ovi degradacioni proizvodi imaju apsorpcione maksimume na 290 i 330 nm, što su potvrdili i drugi autori (*Lopa i sar., 2007; Alecu i sar., 2008; Furtado i sar., 1993*).

Ispitivanja kinetike degradacije antocijana spektrofotometrijskom i HPLC metodom dala su mogućnost i za određivanje termodinamičkih parametara. Iz tabele 4.16 se mogu videti vrednosti ovih parametara određenih spektrofotometrijskom metodom i oni iznose $E_a = 56,37 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 53,91 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = -35,52 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ i $\Delta G^* = 64,39 \text{ kJmol}^{-1}$. Pozitivan znak za ΔH^* podrazumeva endotermno stanje između aktiviranog kompleksa i reaktanata što vodi povećanju brzine degradacije sa povećanjem temperature. Relativno mala vrednost za ΔS^* podrazumeva mali značaj ove funkcije u procesu degradacije, dok njen negativan znak upućuje na neophodnost njenog povećanja da bi došlo do formiranja aktiviranog kompleksa (*Kechinski I sar., 2010*).



Slika 5.5. Hipotetička šema formiranja reakcionih produkta pri oksidaciji Mv-3-G.

Proučavanjem referentne literature došlo se do sledećih podataka. *Cisse i sar., (2009)* su ispitivali kinetiku termičke degradacije antocijana u temperaturnom intervalu od 30 do 90°C u sedam sokova crvene narandže, dva soka kupine i četiri ekstakta šipaka. Pomenuti autori su odredili da je energija aktivacije, entalpija i entropija aktiviranja najmanja kod sokova kupine ($E_a = 36,99 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 34,24 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = -232 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), zatim kod ekstrakta šipka

($E_a = 51,12 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 48,31 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = -194 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), a najveća za sokove crvene narandžje ($E_a = 66,04 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 63,11 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = -149 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$). Dalje, ispitujući kinetiku termičke degradacije antocijana u soku borovnice u intervalu od 40 do 80°C, *Kechinski i sar.. (2010)* su odredili sledeće vrednosti: $E_a = 80,42 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 77,80 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = -43,07 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ i $\Delta G^* = 91,3 \text{ kJmol}^{-1}$. Naše vrednosti za termodinamičke parametre procesa degradacije antocijana crvenih vina su u saglasnosti sa gore pomenutim rezultatima drugih autora.

Kinetika termičke degradacije Mv-3-G uglavnom je ispitivana u model rastvorima. *Tseng i sar.(2006)* su za model rastvore koje su pripremili rastvaranjem 50 mg Mv-3-G u 1L 0,025 mol/L rastvora vinske kiseline, čiji je pH=3,5 podešen 0,1 mol/L rastvorom NaOH, dobili vrednosti energije aktivacije od 95,39 kJmol⁻¹ bez etanola, 102,20 kJmol⁻¹ u prisustvu 10%, 101,78 kJmol⁻¹ u prisustvu 30% i 95,09 kJmol⁻¹ u prisustvu 50% etanola. Radne temperature su bile 65, 75, 85 i 95°C. U našem slučaju (iznose $E_a = 57,70 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 55,22 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = 16,59 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ i $\Delta G^* = 60,16 \text{ kJmol}^{-1}$), degradacija Mv-3-G je znatno ubrzana u prisustvu sistema Cu(II)/H₂O₂ koji snažno generiše hidroksil radikale, što je potvrđeno znatno nižom vrednošću energije aktivacije.

Naši rezultati takođe pokazuju da se vrednosti energije aktivacije i otalih termodinamičkih parametara bitno ne razlikuju za Mv-3-G i Mv-3-AG ($E_a(\text{Mv-3-G})/E_a(\text{Mv-3-AG}) = 0,999$). Slične rezultate dobili su i *Romero i Bakker (2000)* koji su ispitivali kinetiku degradacije Mv-3-G, Mv-3-AG i Mv-3-CG u model rastvoru pri pH=3,7 i pri tome dobili sledeće odnose: $E_a(\text{Mv-3-G})/E_a(\text{Mv-3-AG}) = 1,018$ i $E_a(\text{Mv-3-G})/E_a(\text{Mv-3-CG}) = 0,852$.

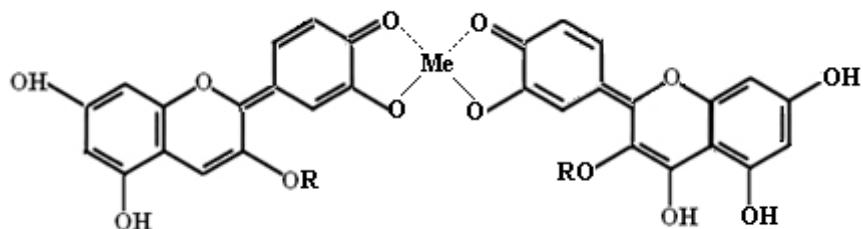
Upoređivanjem vrednosti termodinamičkih parametara za degradaciju antocijana u crvenim vinima prikazanim u tabelama 4.16 i 4.22 možemo uočiti da dolazi do promene znaka u vrednosti za entropiju aktiviranja. Entropija aktiviranja, određena spektrofotometrijskom metodom odnosi se na sve antocijane prisutne u vinu, pa i na polimerne antocijane koji takođe apsorbuju zračenje talasne dužine od 520 nm. Negativne vrednosti entropije aktiviranja, primenom spektrofotometrijske metode dobili su i drugi autori. Međutim, primenom HPLC metode za praćenje kinetike degradacije, mogla se tačno odrediti entropija aktiviranja pojedinih antocijana, tačnije Mv-3-G i Mv-3-AG. S obzirom da je dobijena pozitivna vrednost entropije, mehanizam reakcija degradacije Mv-3-G i Mv-3-AG hidroksil radikalima je disocijativni (*Milić i Sovinj, 2000*), i kod ovih reakcija građenju aktiviranog kompleksa predhodi raskidanje veza u molekulu polaznih supstanci (reaktanata). Za ovakve reakcije karakteristična je pozitivna vrednost entropije aktivacije od oko 20 J mol⁻¹K⁻¹ (*Krasnova, 1995*).

5.1.3. Mehanizam degradacije antocijana cedjenih sokova od višanja, crvene ribizle i malina

Naša ispitivanja hemijskog sastava višnje, crvene ribizle i maline HPLC metodom su pokazala da ovo voće sadrži samo derivate cijanidina (tabela 4.36, 4.41, 4.44, 4.53 i 4.58).

Interakcija između cianidin-3-glukozida i Cu(II)-jona je dosta proučavana. *Smyk i sar.* (2008) su ispitivali interakciju Cu(II)-jona i Cy-3-G i pri tome dokazali da nastaje kompleks steheometrijskog odnosa 1:1, sa konstantom disocijacije $K = (28.000 \pm 2600) \text{ mol}^{-1}$. Odredili su i termodinamičke parametre $\Delta H^* = (88 \pm 6) \text{ kJ mol}^{-1}$ i $\Delta S^* = (92 \pm 5) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Međutim, *Esparza i sar.* (2004) su predložili strukturu kompleksa metal-cijanidin-3-glukozid steheometrijskog sastava 1:2 (slika 5.6):



Slika 5.6. Struktura kompleksa metal (Me)-Cy-3-G (R, glukozid)

Što se tiče šeme formiranja reakcionih produkata pri oksidaciji cijanidin-3-glukozida hidroksil radikalima koji nastaju u sistemu Cu(II)/H₂O₂ može se predložiti slična ovoj za malvidin-3-glukozida pri čemu će se reakcioni proizvodi razlikovati u istoj meri kolika je ralika između Mv-3-G i Cy-3-G.

Ispitivanja kinetike degradacije antocijana spektrofotometrijskom metodom u cedjenim sokovima od višanja i crvene ribizle dala su mogućnost i za određivanje termodinamičkih parametara. Iz tabele 4.16 se mogu videti vrednosti ovih parametara određenih spektrofotometrijskom metodom za sokove od višanja i oni iznose $E_a = 30,59 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H^* = 28,12 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^* = -115,48 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^* = 62,53 \text{ kJ mol}^{-1}$, dok iz tabele 4.62 ove vrednosti za sokove od crvene ribizle iznose $E_a = 25,76 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H^* = 23,29 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^* = -121,92 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ i $\Delta G^* = 59,61 \text{ kJ mol}^{-1}$. Veličina aktivacione entropije daje važnu informaciju o mehanizmu katalitičke reakcije i o strukturi aktiviranog kompleksa. Velika negativna vrednost, koja dostiže i do $-120 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, karakteristična je za reakcije koje protiču građenjem kompleksa koji uključuje oba reagensa i katalizator istovremeno. U

ovakvom aktiviranom kompleksu građenje novih i raskidanje veza u molekulima polaznih supstanci dešava se istovremeno. Za ovakve reakcije karakteristična je mala vrednost energije aktivacije (*Krasnova, 1995*).

Termička degradacija cijanidin-3-glukozida je ispitana za temperaturni interval od 70 do 90°C i pri tome je nađeno da energija aktivacije za proces degradacije cijanidin-3-glukozida u crvenoj naranđzi iznosi $74,6 \text{ kJmol}^{-1}$ (*Cao i sar., 2009*). *Özkan i sar.* (2002) ispitivali su kinetiku degradacije soka višnje vodonik peroksidom i pri tome odredili enetgiju aktivacije od $47,69 \text{ kJmol}^{-1}$ pri koncentraciji H_2O_2 od $18,61 \text{ mmol/L}$. Naši rezultati daju nižu vrednost energije aktivacije ($30,59 \text{ kJmol}^{-1}$) zbog znatno veće koncentracije H_2O_2 od $58,7 \text{ mmol/L}$ ali i u prisustvu $0,132 \text{ mmol/L Cu(II)}$ jona.

Energija aktivacije reakcije degradacije antocijana soka crvene ribizle hidroksil radikalima iznosi $25,76 \text{ kJmol}^{-1}$. *Kopjar i sar.* (2009) su ispitivali kinetiku degradacije antocijana soka crvene ribizle za interval temperature od 30 do 90°C i pri tome odredili vrednost energije aktivacije od $33,08 \text{ kJmol}^{-1}$.

U soku višnje i crvene ribizle prisutni su samo derivati cijanidina. Energije aktivacije procesa degradacije cijanidina sistemom $\text{Cu(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$ iznose $30,59 \text{ kJmol}^{-1}$ u soku višnje, odnosno $25,76 \text{ kJmol}^{-1}$ u soku crvene ribizle. Ove razlike posledica su različitog sastava sokova. Uticaj matriksa na termodinamičke parametre zapazili su i drugi autori. *Özkan i sar.* (2004) su za degradaciju askorbinske kiseline vodonik peroksidom u različitim sokovima odredili sledeće energije aktivacije: $21,8 \text{ kJmol}^{-1}$ u soku višnje, $26,2 \text{ kJmol}^{-1}$ u soku grožđa, $40,3 \text{ kJmol}^{-1}$ u soku naranđže i čak $71,0 \text{ kJmol}^{-1}$ u soku nara.

Većina organskih reakcija se odvija u pogodnom rastvaraču. Promenom rastvarača možemo promeniti brzinu reakcije, a kod nekih reakcija i dominantan mehanizam reakcije. Uticaj rastvarača na brzinu hemijske reakcije potiče od razlike u stepenu solvatacije početnih reaktanata i aktiviranog kompleksa. Ako se posmatra brzina reakcije pri prelasku od jednog manje polarnog do drugog više polarnog rastvarača zbog solvacionih efekata moguća su dva karakteristična slučajeva.

- Ako je solvatacija aktiviranog kompleksa dominantnija od solvatacije početnih reaktanata, reakcija će se ubrzati. To znači da će se energetska barijera za reakciju smanjiti.
- Ako su molekuli reaktanta znatno više solvatisani od molekula aktiviranog kompleksa, tada će reakcija biti spora.

Dielektrična konstanta rastvarača pokazuje koliko je manje međusobno privlačenje nanelektrisanih čestica u njemu od njihovog privlačenja u vakuumu. Polarniji rastvarač ubrzava reakciju u smeru stvaranja čestica veće polarnosti (*Dondur, 1992*).

Ako uporedimo podatke za energije aktiviranja u tabelama 4.62 i 4.64 uočićemo da se reakcija degradacije brže odvija u vodi i da prisustvo metanola, etanola ili acetona smanjuje brzinu a samim tim i povećava energiju aktivacije. Veličina povećanja energije aktivacije

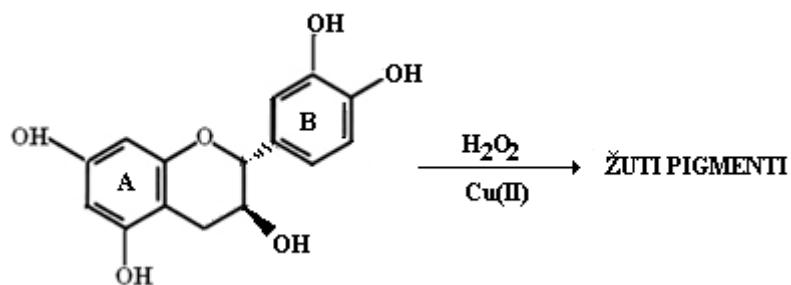
zavisi od polarnosti rastvarača i najveća je u acetonu kao rastvaraču najmanje polarnosti. Ovaj podatak u skladu je sa rezultatima drugih autora. *Tseng i sar.* (2006) su proučavajući kinetiku degradacije malvidin-3-glukozida u model rastvoru našli da uvođenjem 10% etanola u reakcioni sistem dolazi do povećanja energije aktivacije za $6,9 \text{ kJmol}^{-1}$.

Analizom podataka u tabeli 4.64 možemo uočiti da se uvođenjem metanola, etanola ili acetona u reakcioni sistem menjaju vrednosti za energije aktiviranja, entalpiju i entropiju, ali ne i za slogodnu energiju aktiviranja. Energija aktiviranja je često koristan podatak u aproksimaciji brzine reakcije, međutim brzinu hemijske reakcije definiše bolje promena slobodne energije aktiviranja i delimično promena entropije aktiviranja. Kod nekih hemijskih reakcija dolazi do povećanja promene entalpije aktiviranja, ali odgovarajuće povećanje proizvoda temperature i promene entropije aktiviranja potpuno kompenzuje tu promenu (*Gleston, 1970, st.872; Obradović i sar. 1987, st. 169*).

5.1.4. Mehanizam degradacije flavan-3-ola

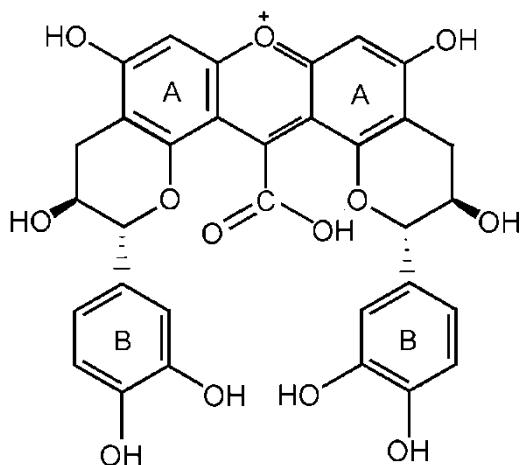
Kinetiku degradacije katehina i epikatehina hidroksil radikalima koji nastaju u sistemu Cu(II)/H₂O₂ pratili smo u crvenom vinu Vranac (Rubin-Kruševac) HPLC metodom na osnovu promene površine odgovarajućih pikova (275/322 nm, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) fluorescentnim detektorom. Tabela 4.14 pokazuje da se sadržaj flavan-3-ola u vinima Vranac kreće od 105,36 do 125,36 mg/L.

Kinetiku oksidativne degradacije katehina u prisustvu Cu(II) proučavali su *Clark i Scollary (2002)* i pri tome utvrdili da postoji direktna proporcionalnost između brzine reakcije degradacije i koncentracije Cu(II)-jona, na osnovu povećanja apsorpcionog maksimuma na 440 nm. *Oszmianski i sar. (1996)* su, takođe uočili brojne reakcione produkte na hromatogramima snimljenim na 280 i 430 nm. Stoga, uprošćenu šemu oksidacije katehina bi mogli prikazati na sledeći način (slika 5.7):



Slika 5.7. Šema oksidacije (+)-catehina hidroksil radikalima.

Pri tome su mnogi autori, među kojima su *Oszmianski i sar.* (1996) potvrdili postojanje obojenog ksantilijum katjona među oksidacionim produktima (slika 5.8).



Slika 5.8. Struktura ksantijijum katjona

Ispitivanja kinetike degradacije katehina i epikatehina spektrofotometrijskom metodom u crvenim vinima dala su mogućnost i za određivanje termodinamičkih parametara. Iz tabele 4.25 se mogu videti vrednosti ovih parametara određenih spektrofotometrijskom metodom za katehin i oni iznose $E_a = 45,22 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 42,74 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = -31,88 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ i $\Delta G^* = 52,24 \text{ kJmol}^{-1}$, dok ove vrednosti epikatehin iznose $E_a = 41,42 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta H^* = 38,94 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S^* = -40,25 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ i $\Delta G^* = 50,94 \text{ kJmol}^{-1}$.

Oksidacija katehina i epikatehina je uglavnom proučavana u model rastvorima vina, tako da se veličine za termodinamičke parametre nisu mogle uporediti sa literaturnim podacima. *Li i sar.* (2011) proučavajući kinetiku termičke degradacije derivata katehina (epigalokatehina galata) u čaju dobili su vrednost za E_a od $79,27 \text{ kJmol}^{-1}$. Prisustvo vodonik peroksida i bakra očigledno može smanjiti energiju aktivacije i povećati brzinu reakcije, ali pri tome ne treba zaboraviti uticaj matriksa samog uzorka.

Ulogu bakra u ovom procesu treba posebno istaći, s obzirom da je, pored gvožđa bio predmet mnogih istraživanja. *Osymianski i sar.* (1996) su proučavali oksidaciju katehina Fe(II) jonima u model rastvoru (0,02 mol/L kalijum-hidrogentartarat, 20% v/v etanola, pH=3,7) i pri tome su uočili da se brzina reakcije povećava sa povećanjem koncentracije Fe(II) jona, a takođe i apsorbancija rastvora na 430 nm. Snimanjem HPLC hromatograma dokazali su prisustvo reakcionih produkata koji apsorbuju u oblasti 385-414 i 440-460 nm. Dolazi do formiranja žutih pigmenata koje je znatno ubrzano u prisustvu 20 mg/L Fe(II) jona. *Clark i Scollary* (2002), su ispitivali oksidaciju katehina u prisustvu Cu(II) jona u model rastvoru (10 g kalijum-hidrogentartarata u 2L 12% etanola, pH=3,20 podešen vinskom kiselinom) i pri tome

zapazili da se proces stvaranja žutih pigmenata na $\lambda_{\max}=440$ nm znatno ubrzava u prisustvu 0,6 mg/L Cu(II) jona. *Jimenez-Atienzar i sar. (2004)* su proučavali kinetiku katehina u prisustvu enzima polifenol oksidaze (pH=7) i pri tome takođe došli do podataka da se tokom oksidacije formiraju žuti pigmenti sa $\lambda_{\max}=430$ nm, i predložili da se kinetika oksidacije katehina ispituje spektrofotometrijski na 430 nm. Kada bi se snimali hromatogrami u dužem vremenskom periodu i na talasnoj dužini 430-440 nm, pojavili bi se pikovi za reakcione produkte reakcije. Međutim, naš cilj nije bio ispitati nastajanje reakcionih produkata, već brzinu degradacije katehina i epikatehina prateći promene površine pikova za ove komponente.

6. IZVOD

U ovom radu je izvršeno ispitivanje kinetike degradacije fenolnih komponenti i monomernih antocijana u crvenim i belim vinima i ceđenim sokovima višnje i crvene ribizle spektrohotometrijskom metodom, kao i kinetike degradacije malvidin-3-glukozida, malvidin-3-acetil-glukozida, katehina i epikatehina crvenih vina HPLC metodom. Radi boljeg poznavanja sistema u kojima se ispituju procesi degradacije, izvršeno je i kvantitativno određivanje i identifikacija fenolnih komponenata ekstrakata grožđa, višnji, crvene ribizle i maline, kao i proizvoda, vina, voćnih vina i komercijalnih sokova primenom spektrofotometrijske i HPLC metode, dok je primenom ICP-OES metode određen sadržaj minerala u grožđu i višnjama.

Na osnovu prikazanih rezultata proučavanja kinetike ispitivanih reakcionih sistema, a u cilju predlaganja mehanizma i razrade novih kinetičko-spektrofotometrijskih metoda za određivanje ukupnih fenola i ukupnih antocijana, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Proučena je kinetika i razrađena je kinetičko spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih monomernih antocijana u crvenim vinima, a na osnovu reakcije njihove degradacije hidroksil radikalima. Brzina reakcije je praćena na 520 nm na temperaturi od 22°C. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno (H_2O_2 , Cu(II), crveno vino) postavljena je kinetička jednačina reakcije degradacije, a potom izračunate konstante brzine. Iz dobijenih vrednosti konstante brzine na četiri temperature izračunati su termodinamički parametri: energija aktivacije ($E_a=56,37\text{ kJmol}^{-1}$), aktivaciona entalpija ($\Delta H^*=53,91\text{ kJmol}^{-1}$), aktivaciona entropija ($\Delta S^*=-35,52\text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) i Gibbs-ova slobodna energija aktivacije ($\Delta G^*=64,39\text{ kJmol}^{-1}$). Validacija metode je izvršena određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, limita kvantifikacije, tačnosti i preciznosti, korišćenjem metode unutrašnjeg standarda, malvidin-3-glukozida. Relativna standardna devijacija je manja od 3,88%. Metoda je primenjena za određivanje ukupnih monomernih antocijana u mladim crvenim vinima. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima određivanja HPLC metodom.
- Proučena je kinetika degradacije najzastupljenijih monomernih antocijana crvenih vina malvidin-3-glukozida i malvidin-3-acetil-glukozida hidroksil radikalima pri $pH=3,5$. Pri validaciji HPLC metode za određivanje malvidin-3-glukozida određeni su sledeći parametri: linearost, limit detekcije, limit kvantifikacije, tačnost i preciznost. Linearost pokriva područje od 2 do 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LOD i LOQ iznose 0,52 i 1,58 $\mu\text{g}/\text{ml}$. RSD se kreće od 3,80 do 7,58%. Brzina reakcije je praćena na odgovarajućim retencinim vremenima za M3G i M3AG UV-Vis detektorom na 520 nm. Za obradu kinetičkih podataka primenjena je metoda inicijalne brzine. Na osnovu zavisnosti inicijalne brzine od koncentracije reagujućih komponenata postavljene su kinetičke jednačine, na osnovu kojih su izračunate konstante brzine na četiri temperature: 25, 30, 35 i 40°C. Iz dobijenih vrednosti konstanti brzina na ovim temperaturama izračunati su termodinamički parametri procesa degradacije M3G i M3AG hidroksil

radikalima. Energija aktivacije za reakcije degradacije M3G i M3AG se veoma malo razlikuju i iznose: 57,70 i 57,74 kJmol⁻¹.

- Proučena je kinetika degradacije flavan-3-ola crvenih vina, katehina i epikatehina hidroksil radikalima pri pH=3,5. Pri validaciji HPLC za određivanje katehina i epikatehina određeni su sledeći parametri: linearnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, tačnost i preciznost. Brzina reakcije je praćena na odgovarajućim retencinim vremenima za katehin i epikatehin fluorescennim detektorom pri 275/322, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$. LOD i LOQ su 0,23 i 0,69 µg/ml za katehin, odnosno 0,28 i 0,85 µg/ml za epikatehin. Kalibracione prave pokrivaju područje od 1 do 30 µg/ml. Za obradu kinetičkih podataka primenjena je metoda inicijalne brzine. Na osnovu zavisnosti inicijalne brzine od koncentracije reagujućih komponenata postavljene su kinetičke jednačine, na osnovu kojih su izračunate konstante brzine na četiri temperature: 25, 30, 35 i 40°C. Iz dobijenih vrednosti konstanti brzina na ovim temperaturama izračunati su termodinamički parametri procesa degradacije katehina i epikatehina hidroksil radikalima. Energije aktivacije reakcije degradacije za katehin i epikatehin iznose 45,22 i 42,42 kJmol⁻¹.
- Proučena je kinetika i razrađena je kinetičko spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih fenola u belim vinima, a na osnovu reakcije njihove degradacije hidroksil radikalima pri pH=3,5. Brzina reakcije je praćena na 420 nm na temperaturi od 25°C. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno (H₂O₂, Cu(II), belo vino) postavljena je kinetička jednačina reakcije degradacije, a potom izračunate uslovne konstante brzine. Iz dobijenih vrednosti uslovnih konstanti brzine na četiri temperature izračunata je energija aktivacije i ona iznosi E_a=40,02 kJmol⁻¹. Validacija metode za određivanje ukupnih fenola je izvršena određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, limita kvantifikacije, tačnosti i preciznosti, korišćenjem metode unutrašnjeg standarda, galne kiseline. Kalibraciona prava je linearna od 23,01 do 194,11 µg GAE/ml. LOD i LOQ iznose 6,77 i 20,51 µg/ml. Relativna standardna devijacija je manja od 3,85%. Metoda je primenjena za određivanje ukupnih fenola u belim vinima. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima određivanja standardnom spektrofotometrijskom metodom.
- Proučena je kinetika i razrađena je kinetičko spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih monomernih antocijana u ceđenim sokovima višnje, a na osnovu reakcije njihove degradacije hidroksil radikalima pri pH=3,5. Brzina reakcije je praćena na 520 nm na temperaturi od 25°C. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno (H₂O₂, Cu(II), crveno vino) postavljena je kinetička jednačina reakcije degradacije, a potom izračunate konstante brzine. Iz dobijenih vrednosti konstante brzine na četiri temperature izračunati su termodinamički parametri: energija aktivacije (E_a=30,59 kJmol⁻¹), aktivaciona entalpija ($\Delta H^*=28,12 \text{ kJmol}^{-1}$), aktivaciona entropija ($\Delta S^* = -115,48 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) i Gibbs-ova slobodna energija aktivacije

($\Delta G^*=62,53 \text{ kJmol}^{-1}$). Validacija metode je izvršena određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, limita kvantifikacije, tačnosti i preciznosti, korišćenjem metode unutrašnjeg standarda, cijanidin-3-glukozida. Relativna standardna devijacija je manja od 2,0%, pri čemu je LOD 1,11 a LOQ 3,37 $\mu\text{g/ml}$. Metoda je primenjenja za određivanje ukupnih monomernih antocijana u ceđenim sokovima tri sorte vični: Marelja, Cigančica i Oblačinska višnja. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima određivanja standardnom spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom.

- Proučena je kinetika i razrađena je kinetičko spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih monomernih antocijana u ceđenim sokovima crvene ribizle i maline, a na osnovu reakcije degradacije derivata cijanidina hidroksil radikalima pri pH=3,5. Brzina reakcije je praćena na 520 nm na temperaturi od 25°C. Diferencijalna varijanta tangensne metode korišćena je za obradu kinetičkih podataka. Ispitivanjem uticaja svakog reaktanta pojedinačno (H_2O_2 , Cu(II), crveno vino) postavljena je kinetička jednačina reakcije degradacije, a potom izračunate konstante brzine. Iz dobijenih vrednosti konstante brzine na četiri temperature izračunati su termodinamički parametri: energija aktivacije ($E_a=25,76 \text{ kJmol}^{-1}$), aktivaciona entalpija ($\Delta H^*=23,29 \text{ kJmol}^{-1}$), aktivaciona entropija ($\Delta S^*=-121,92 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) i Gibbs-ova slobodna energija ($\Delta G^*=59,61 \text{ kJmol}^{-1}$). Uvođenjem 10% metanola, etanola i acetona u reakcionu smešu, energija aktivacije se povećava na 30,78, 34,73 i 40,23 kJmol^{-1} dok se Gibbs-ova slobodna energija aktivacije bitno ne menja. Validacija metode je izvršena određivanjem intervala linearnosti, limita detekcije, limita kvantifikacije, tačnosti i preciznosti, korišćenjem metode unutrašnjeg standarda, cijanidin-3-glukozida. Relativna standardna devijacija je manja od 3,56%, pri čemu je LOD 0,98 a LOQ 2,99 $\mu\text{g/ml}$. Metoda je primenjenja za određivanje ukupnih monomernih antocijana u ceđenim sokovima crvene ribizle i maline gajenih na području Niške Banje i Vlasine. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima određivanja standardnom spektrofotometrijskom pH diferencijalnom metodom.
- Ispitivanja kinetike degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima su pokazala da se procesi mogu prikazati kinetičkoj jednačinom koja je prvog reda u odnosu na koncentraciju organskog supstrata, oksidansa i katalizatora. Reakcije se zasnivaju na redoks procesima u kojima jon katalizatora (Cu^{2+}) menja oksidaciono stanje u Cu^+ tokom cikličnog procesa.

7. SUMMARY

This work presents the examining of the kinetics of degradation of phenolic compounds and monomeric anthocyanins in red and white wines and squeezed cherry and red currant juices using spectrophotometric method, as well as the kinetics of degradation of malvidin-3-glucoside, malvidin-3-acetyl-glucoside, catechin and epicatechin red wine using HPLC method. For a better understanding of the system in which the processes of degradation are examining, the identification and quantification of the phenolic components of extracts of grape, cherry, red currant and raspberries, as well as wine products, fruit wines and commercial juices has been performed by spectrophotometric and HPLC methods, while the mineral content in the grapes and cherries has been determined by using ICP-OES method.

Based on the presented results of examining the kinetics of the studied reaction systems, the following conclusions can be deduced in order to propose mechanisms and develop new kinetic-spectrophotometric method for determination of total phenols and total anthocyanin:

- The kinetics was investigated and the kinetic-spectrophotometric method for the determination of amounts of total monomeric anthocyanins in the red wines was developed. It was based on the degradation of the anthocyanins by hydroxyl radicals. The reaction rate was monitored at 520 nm at the temperature of 22°C. A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. By examining the impact of each reactant on the reaction rate, the kinetics equation for reaction was given on the basis of $\text{tg}\alpha$ dependence on the reaction compounds concentrations and the reaction rate constant was calculated for four temperatures. According to the reaction rate constant values for four temperatures, the thermodynamic parameters were obtained: activation energy ($E_a=56.37 \text{ kJmol}^{-1}$), activation enthalpy ($\Delta H^*=53.91 \text{ kJmol}^{-1}$), activation entropy ($\Delta S^* = -35.52 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) and Gibb's energy ($\Delta G^*=64.39 \text{ kJmol}^{-1}$). The mechanism of degradation was discussed. The method was validated for linearity interval, limits of detection and quantification, precision and accuracy using the method of external standard (malvidin-3-glucoside). Relative standard deviation is < 3.88%. The method was applied to determine the total monomeric anthocyanins amounts in young red wines. The obtained results are in accordance with the HPLC method results.
- The kinetic degradation of predominant red wine monomeric anthocyanins, malvidin-3-glucoside and malvidin-3-acetyl-glucoside was investigated by hydroxyl radicals in aqueous solution ($\text{pH}=3.5$). HPLC method was validated for linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy for determination of malvidin-3-glucoside. Relative standard deviation for the malvidin-3-glucoside concentration interval from 2 to 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ranges from 7.58 to 3.80 %. LOD and LOQ are 0.52 and 1.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The reaction rate was monitored with UV-Vis detector at the t_R for malvidin-3-glucoside and malvidin-3-acetyl-glucoside. An initial method was used to process the kinetic data. The impact of each reactant on the reaction rate was examined. The kinetics equation for reaction was given on the basis of initial rate dependence on the reaction compounds concentrations. The reaction rate constant was calculated at temperatures 25, 30, 35 and 40°C. According to the reaction rate

constant values for four temperatures, the thermodynamic parameters were obtained for malvidin-3-glucoside and malvidin-3-acetyl-glucoside. A significant difference in activation energy ($57.70, 57.74 \text{ kJmol}^{-1}$) was not found between malvidin-3-glucoside and malvidin-3-acetyl-glucoside. The mechanism of degradation was discussed.

- The kinetics of degradation of flavan-3-ols catechin and epicatechin by hydroxyl radicals in aqueous solution ($\text{pH}=3.5$) was investigated. HPLC method was validated for linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy for determination of catechin and epicatechin. The reaction rate was monitored with fluorescence detector at the t_R for catechin and epicatechin. LOD and LOQ for catechin and epicatechin are $0.23, 0.69$ and $0.28, 0.85 \mu\text{g/ml}$, respectively. The intervals of catechin and epicatechin concentrations determinable by HPLC method cover the area from 1 to $30 \mu\text{g/ml}$, respectively. An initial method was used to process the kinetic data. The impact of each reactant on the reaction rate was examined. The kinetics equation for reaction was given on the basis of initial rate dependence on the reaction compounds concentrations. The reaction rate constant was calculated at temperatures $25, 30, 35$ and 40°C . According to the reaction rate, constant values for four temperatures, the thermodynamic parameters were obtained for catechin and epicatechin. The activation energy for catechin and epicatechin are 45.22 and 42.42 kJmol^{-1} . The mechanism of degradation was discussed.
- The kinetics was investigated and the kinetic-spectrophotometric method for the determination of amounts of total polyphenols in white wines was developed. It was based on the degradation of the polyphenols by hydroxyl radicals. The reaction rate was monitored at 420 nm at the temperature of 25°C . A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. The impact of each reactant on the reaction rate was examined. The kinetics equation for reaction was given on the basis of t_{ga} dependence on the reaction compounds concentrations. The reaction rate constant was calculated for four temperatures. According to the reaction rate constant values for four temperatures, the activation energy ($E_a=56.37 \text{ kJmol}^{-1}$) were obtained. The mechanism of degradation is discussed. The method was validated for linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy. The method of external standard (gallic acid) was used. Under the selected reaction conditions, the polyphenol concentration varied from 23.01 to $194.11 \mu\text{g GAE/ml}$. The method was applied to determine the amounts of poliphenols in white wines. The obtained results are in accordance with the spectrophotometric method results.
- The kinetics was investigated and the kinetic-spectrophotometric method for determining amounts of the total monomeric anthocyanins in sour cherry juices was developed. It was based on the degradation of the anthocyanins by hydroxyl radicals. The reaction rate was monitored at 520 nm at the temperature of 25°C . A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. The impact of each reactant on the reaction rate was examined. The kinetics equation for reaction was given on the basis of t_{ga} dependence on the reaction compound concentrations.

The reaction rate constant was calculated for four temperatures. According to the reaction rate, constant values for four temperatures, the thermodynamic parameters were obtained: activation energy ($E_a=30.56 \text{ kJmol}^{-1}$), activation enthalpy ($\Delta H^*=28.12 \text{ kJmol}^{-1}$), activation entropy ($\Delta S^* = -115.48 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) and Gibb's energy ($\Delta G^*=62.53 \text{ kJmol}^{-1}$). The mechanism of degradation was discussed. The method was validated for linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy. The method of external standard (malvidin-3-glucoside) was used. Relative standard deviation is < 2.0%. The method was applied to determining the amounts of monomeric anthocyanins in the sour cherry juices derived from three cultivars: Oblacinska, Cigancica and Marela. The obtained results are in accordance with the spectrophotometric pH-differential method results.

- The kinetics was investigated and the kinetic-spectrophotometric method for determining the amounts of total monomeric anthocyanins in the red currant and raspberry juices was developed. It was based on the degradation of the anthocyanins by hydroxyl radicals. The reaction rate was monitored at 520 nm at the temperature of 25°C. A differential variation of the tangent method was used to process the kinetic data. The impact of each reactant on the reaction rate was examined. The kinetics equation for reaction was given on the basis of $t\alpha$ dependence on the reaction compounds concentrations. The reaction rate constant was calculated for four temperatures. According to the reaction rate, constant values for four temperatures, the thermodynamic parameters were obtained: activation energy ($E_a=25.76 \text{ kJmol}^{-1}$), activation enthalpy ($\Delta H^*=23.29 \text{ kJmol}^{-1}$), activation entropy ($\Delta S^* = -121.92 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) and Gibb's energy ($\Delta G^*=59.61 \text{ kJmol}^{-1}$). The mechanism of degradation was discussed. The method was validated for linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy. The method of external standard (malvidin-3-glucoside) as used. Relative standard deviation is < 3.56%. The method was applied to determining the amounts of monomeric anthocyanins in red currant and raspberry juices derived from fruits growing in Niska Banja and Vlasina. The obtained results are in accordance with the spectrophotometric pH-differential method results.
- Investigated kinetics degradation of phenolic compounds by hydroxyl radicals suggested that the reaction was first order with respect to phenolics, Cu(II) and H_2O_2 , respectively. The reaction rate was first order with respect oxidant, reductant and catalyst. The reactions are based on redox reactions in which the catalyst is an ion changes oxidation states during a cyclic process.

8. LITERATURA

Acworth I. N., *The Handbook of Redox Biochemistry*, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA, 2003.

Ahmed J., Shihhare U.S., Raghavan G. S. V., Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree, *European Food Research and Technology*, 2004, 218, 525-528.

Alecu A., Saucier C., Cretescu I., The study of catalytic Degradation of Malvidin-3-Glucoside from Red Wines, using Molecular Absorption Spectrophotometry, *Revista de Chemie*, 2008, 59(3), 314-317.

Alothman M., Bhat R., Karim A. A., Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents, *Food Chemistry*, 2009, 115, 785-788.

Andelković M., Camp J. V., Meulenaer B. D., Depaemelaere G., et al., Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups, *Food Chemistry*, 2006, 98, 23-31.

Anis A., Dimitris P. M., Panagiotis K., Correlation pf pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged region wines from Greece, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2002, 15, 655-665.

Anli R. E., Vural N., Antioxidant Phenolic Substances of Turkish Red Wines from Different Wine Regions, *Molecules*, 2009, 14, 289-297.

AOAC, Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemist, Washington, D.C. 17th Edition, 2000.

Arnous A., Makris D. M., Kefalas P., Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 5736-5742.

Avery H. E., *Basic Reaction Kinetics and mechanisms*, Micmillan, London, 1974.

Bermudez-Soto M. J., Tomas-Barberan F. A., Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingradients for antioxidant functional juices, *European Food Reseaces and Technology*, 2004, 219, 133-141.

Blando F., Gerardi C., Nicoletti I., Sour cherry (*Prunus cerasus L.*) Anthocyanins as ingredients for Functional Foods, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004, 5, 253-258.

Borowska E. J., Mazur b., Kopciuch R. g., Buszewski B., Polyphenol, Anthocyanin and Resveratrol Mass Fraction and Antioxidant Properties of Cranberry Cultivars, *Food Technology and Biotechnology*, 2009, 47, 56-61.

Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E., *Principles and Practices of Winemaking (Chinese trans.)*. Beijing: China Light Industry Press, 2001.

Brand-Williams W, Cuvelier M. E, Berset C., Use of the radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie*, 1995, 28, 25-30.

Brouillard R., Chemical Structure Anthocyanins, part 1, Anthocyanins as Food Colors, 1982.

Budic-Leto I., Lovric T., Identification of phenolic acids and changes in their content during fermentation and ageing of white wines Posip and Rukatac, *Food Technology and Biotechnology*, 2002, 40, 221-225.

Burns J., Gardner P. T., O'Neil J., Crawford S., et al., Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity and phenolic content in red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 220-230.

Cabrera-Vique C., Teissedre P. L., Cabania M. T., Cabanis J. C., Determination and Levels of Chromium in French Wine and Grapes by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 1808-1811.

Cantos E., Espin J. C., Tomas-Barberan F. A., Varietal Difference Among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC-DAD-MS-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 50, 5691-5696.

Cao S., Lui L., Pan S., Lu Q., Xu X., A Comparison of Two Determination Methods for Studying Degradation Kinetics of the Major Anthocyanins from Blood Orange, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 245-249.

Choe E., Min D. B., Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science*, 2005, 70, R142-R159.

Chrzanowski G., Sempruch C., Sprowka I., Investigation of phenolic acids in leaves of Blackcurrant (*Ribes Nigrum L.*) and sour cherry (*Prunus Cerasus L.*), *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 2007, 10, 1-6.

Chunxia C., Chenghua X., Liangrong F., Jishuan S., Fali Q., Kinetics and reaction mechanism of phenol hydroxylation catalyzed by La-Cu₄FeAlCO₃, *Science in China Ser.B Chemistry*, 2005, 48(6), 530-537.

Cisse M., Vallant F., Acosta O., Dhuique-Mayer C., Dornier M., Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry and Roselle Using the Arrhenius, Eyring and Ball Models, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 6285-6291.

Clark A. C., Scollary G., Copper(II)-mediated oxidation of (+)-catechin in a model white wine system, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2002, 8, 186-195.

Comuzzo P., Tat L., Alternatives to sulfur dioxide in enology, *Industrie delle Bevande*, 2003, 32, 450-462.

Čobanović K., Nikolić-Đorić E., Mutavdžić B., Testovi višestrukih upoređenja, *Letopis naučnih radova*, 2003, 27, 66-73.

Danilowicz J. C., Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediare reaction products in wine: Control role of iron and copper, *American Journal of Enology and Viticulture*, 2003, 54, 73-85.

Danilowicz J. C., Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Coper, *American Journal of Enology and Viticulture*, 2007, 58, 53-60.

De Beer D., Joubert E., Gelderblom W. C. A., Manley M., Antioxidant Activity of South African Red and White Cultivar Wines: Free Radical Scavenging, *Journal of Africultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 902-909.

De Heredia J. B., Torregrosa J., Dominguez J. R., Peres J.A., Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent, *Chemosphere*, 2001, 45, 85-90.

Dondur V., *Hemisjska kinetika*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 1992.

Dragović-Uzelac V., Levaj B., Bursać D., Pedesić S., et al., Total Phenolics and Antioxidant Capacity Assays og Selected Fruits, *Agriculture Conspectus Scintificus*, 2007, 72, 279-284.

Đurđević P., Đuran M., Obradović M., *Opšta i neorganska hemija*, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 1997.

Erofeev B. V., Tulupov V. A., *Kinetika homogenovo kataliza*, Minsk, 1977

Espaza I., Salinas I., Caballero I., Santamaria C., et al., Evoluation of metal and polyphenol content over a 1-year period vinification: sample fractionation and correlation between metals and anthocyanins, *Analytica Chimica Acta*, 2004, 525, 215-224.

Fan-Chiang, H. J., Wrolstad, R. E. (2005). Anthocyanin pigment composition of blacberries, *Journal of Food Scieces*, 70, C198-C202.

Farnandez-Pachan, M. S., Villano, D., Garcia-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analitica Chimica Acta*, 513, 113-118.

Frost, A., Pearson, R., Willey, J. *Kinetics and Mechanism*, New York, 1961

Furtado, P., Figueiredo, P., Pina, F. (1993). Phitochemical and thermal degradation of anthocyanins. *Journal Phitochemistry Photobiology*, 75, 113-116

Galvin C., Theze de dotorat Enologie-Ampelologie, Universite de Bordeaux II, 1993

Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 361-367.

Gleston S., *Udžbenik fizičke hemije*, Naučna knjiga Beograd, 1970.

Gođevac D., Tešević V., Velićković M., Vujišić Lj., Polyphenolic compounds in seeds from same grape cultivars brown in Serbia, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2010, 75, 1641-1652.

Goiffon J., Mouly P. P., Gaydon E. M., Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography, *Analytical Chemica Acta*, 1999, 382, 39-50.

Gould, K., Davies, K., Winefield, C. *Anthocyanins*: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 2009, 142, 231-255.

Green, J. M., A principal guide to analytical method validation, *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 305A

Guerrero R. F., Liazid A., Palma M., Puertas B., et al., Phenolic characterisation of red grapes authochthonous to Andalusia, *Food Chemistry*, 2009, 112, 945-955.

Guisti M. M., Wrolstad R. E., Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley and Sons, 2003.

Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communications*, 1990, 9, 1-32.

Häkkinen, S. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products, Doctoral Dissertation, University of Kupio, 2000.

Häkkinen S., Neinonen M., Karenlampi S., Mykkonen H., et al., Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, 1999a, 32, 345-353.

Häkkinen S. H., Karenlampi S. O., Heinonen I. M., Mykkonen H. M., Torronen A. R., Content of flavonols quercetin, myrecetin, and maemferol in 25 edible berries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999b, 47, 2274-2279.

Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communications*, 1990, 9, 1-32.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford Univ. Press.

Hancock W. S., Choloupek R. C., Kirkland J. J. Synder L. R., Temperature as a variable in RP-HPLC separations of peptide and protein sample: I. Optimizing the separation of a growth hormone tryptic digest, *Journal of Chromatography A*, 1994, 686, 31-38.

Harbourne N., Jacquier J. C., Morgan, D. J., Lyng J. G., Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods, *Food Chemistry*, 2008, 111, 204-208.

Hogan, S. Zhang L., Janrong L., Zoecklein B., Zhou K, Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes, *Lwt-Food Science and Technology*, 2009, 42, 1269-1274.

Höner K., Cervellati R., Neddens C., Measurements of the in vitro antioxidant activity of German white wines using a novel method, *European Food Research and Technology*, 2002, 214, 356-360.

Hu Y. Z., Jiang LJ., Generation of semiquinone radical anion and reactive oxygen ($^1\text{O}_2$, O_2^- , and $\cdot\text{OH}$) during the photosensitization of a water-soluble perylenequinone derivative, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 1996, 33, 51-59.

Iacopini P., Baldi M., Starchi P., Sebastiani L., Catechin, epicatechin, quercetin, rurin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21, 589-598.

Jacimirski K. B., *Kinetičeskie metodi analiza*, Himija, Moskva, 1967.

Jackson S. J., *Wine science-principles and applications*, Third edition, Academic press, 2008.

Jacobien K., Von Frijatag D. K., Van der Zee J., Ljzerman A. P., Radical scavenging properties of adenoside and derivatives in vitro, *Drug Development Research*, 1996, 37, 48-54.

Jagtap U. B., Panaskav S. N., Bapat V. A., Evaluation of Antioxidant Capaciyu and Phenol Content in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) Fruit Pulp, *Plant Foods for Human Nutrition*, 2010, 65, 99-104.

Jakobek M., Šeruga M., Medvidović-Kosanović M., Novak I., Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices, *Deutsche Lebensmittel-rundschau*, 2007a, 103, 58-64.

Jakobek M., Šeruga M., Novak I., Medvidović-Kosanović M., Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits, *Deutsche Lebensmittel-rundschau*, 2007b, 103, 369-378.

Jia Z., Tang T., Wu J., The determination of flavonoids content in mulberry and scavenging effect on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 1999, 64: 555.

Jimenez-Atienzar M., Cabanes J., Gandia-Herrero F., Garcia-Carmona F., Kinetic Analysis of catechin oxidation by polyphenol oxidase at natural pH, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 319, 902-910.

Kähkönen M. P., Hopia A. I., Heinonen M., Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 4076-4082.

Kajdžanovska M., Petrovska J., Stefova M., Comparison of Different Extraction Solvent Mixtures for Characterization of Phenolic Compounds in Strawberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 5272-5278.

Kallay M., Steger-Mate M., Mester-Ficzek M., Sandor G., et al., Changes of polyphenol, anthocyanin and rutin content in sour cherry varieties during ripening, *Acta Biologica Szegediensis*, 2008, 52, 217-219.

Kallithraka S., Alijal L., Makris D. P., Kefalas P., Anthocyanin profiles of major red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Greece and their relationship with *in vitro* antioxidant characteristics, *International Journal of Food Science & Technology*, 2009a, 44, 2385-2393.

Kallithraka S., Salacha M. I., Tzourou I., Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage, *Food Chemistry*, 2009b, 113, 500-505.

Kalithraka S., Mohdaly A. A., Markis P. D., Kefalas P., Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.) association with antiradical activity, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 18, 375-386.

Karakhanov E. A., Maximov A. L., Kardasheva Y. S., Skorkin V. A. et al., Hydroxylation of Phenol by Hydrogen Peroxide Catalyzed by Copper(II) and Iron(III) Complexes: The Structure of the Ligand and the Selectivity of ortho-Hydroxylatin, *Indian Engineering and Chemical Research*, 2010, 49, 4607-4613.

Karbowiak T., Gougeon R. D., Alinc J. B., Brachains L., et al., Wine Oxidation and the Role of Cork, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010, 50, 20-52.

Katalinic V., Ljubenkov I., Pezo I., Generalic I., et al., Free resveratrol monomers in varietal red and white wines from Dalmatia (Croatia), *Periodicum Biologorum*, 2008, 110, 77-83.

Katalinić V., Možina S. S., Sktroza D., Generalić I., et al., Polyphenolic profile antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extract of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia), *Food Chemistry*, 2010, 119, 715-723.

Katalinić V., Miloš M., Modun D., Musić I., et al., Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin, *Food Chemistry*, 2004, 86, 593-600.

Kazakevich Z., Lobrutto R., *HPLC for Pharmaceutical Scintists*, John Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.

Kaštelan-Macan M. *Kemijska analiza u sustavu kvaliteta*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.

Kechinski C. P., Guimaraes P. V. R., Norena C. P. Z., Tessara I. C., Marczak L. D. E., Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment, *Journal of Food Science*, 2010, 75, C173-C176.

Kedage V. V., Tilak J. C., Dixit G. B., Devasagayan T. P., Mhatre M., A study of Antioxidant Properties of Some Varieties of Grapes (*Vitis vinifera* L.), *Critical Reviews in Food Science and Nutricion*, 2007, 47, 175-185.

Keinanen M., Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 41, 1986-1990.

Kim D. O., Heo H. J., Kim Z. J., Yang H. S., Lee C. Y., Sweet and Sour Cherrz Phenolcs and Their Protective Effects on Neuronal Cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 9921-9927.

Kirakosyan A., Sezmour, E. M., Leaner D. E. U., Kaufman P. B., Bolling S. F., Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry product, *Food Chemistry*, 2009, 115, 20-25.

Kopjar M., Piližota V., Šubarić D., Bobić J., Prevention of termal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition, *Croatian Journal Food Science and Technology*, 2009, 1, 24-30.

Kordis-Krapež M., Abram V., Kač M., Ferjančič S., Determination of Organic Acids in White Wines by RP-HPLC, *Food Technology and Biotechnology*, 2001, 39, 93-99.

Kovač V., Pekić B., Proantocijanidoli grožđa i vina, *Savremena poljoprivreda*, 1991, 39, 5-17.

Krasnova K. S., *Fizičeskaja himija*, kniga 2, *Elektrohimija Himičeskaja kinetika i kataliz*, Višaja škola, Moskva, 1995

Laidler K. J., Symbolism and Terminology in Chemical Kinetics, *Applied Chemistry*, 1981, 53, 735.

Lajšić S., Grujić-Injac B., *Hemija prirodnih proizvoda*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1998.

Laurie V. F., Waterhouse A. L., Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine: Potential effects on wine color, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 4668-4673.

Leucuta S., Vlase L., Gocan S., Radu L., Fodorea C., Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2005, 28, 3109-3117.

Li H., Wang H., Yuang C., Wang S., *Wine chemistry*. Beijing: Scientific Publishing Company, 2005.

Li H., Guo A., Wang H., Mechanisms of oxidative browning of wine, *Food Chemistry*, 2008, 108, 1-13.

Li N., Taylor L.S., Maver L.J., Degradation Kinetics of Catechin in Green Tea Power: Effects of Temperature and Relative Humidity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 6082-6090.

Lopes P., Richard T., Saucier C., Teissedre P.-L., et al., Antocyanone A: A Quinone Methide Derivative Resulting from Malvidin 3-O-Glucoside Degradation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 2698-2704.

Lucena A. P. S., Nascimento R. J. B., Maciel J. A. C., Tavares J. X., Antioxidant activity and phenolic content of selected Brazilian wines, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23, 30-36.

Luoana P., Red wine quality establishing on the basis of chromatic properties, *Revista de Chimie*, 2005, 56, 703-707.

Maletić E., Kontić J. K., Preiner D., Jeromel A., et al., Anthocyanin profile and antioxidant capacity of some authochthonous Croatian red wines, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2009, 7, 51-58.

Määttä K. R., Kamal-Eldin A., Torronen R., High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: Ribes species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 6736-6744.

Määttä K. R., Kamal-Eldin A., Mattila P. H., Gonzalez-Paramas A. M., Torronen R., Distribution and content of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 4477-4478.

Mauri A. R., Dissertation „*Peroxide promoted catalytic wet air oxidation of phenolic aqueous solution using activated carbon as catalyst*“ Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2007.

Milenović D., „Razvoj i validacija HPLC metoda za određivanje rezidua aktivnih komponenti farmaceutskih preparata“, Doktorska disertacija, PMF, Niš, 2010.

Milić N., Sovilj S., Kinetičko-termodinamički principi o mehanizmi hemijskih reakcija, priručnik za računske i eksperimentalne vežbe, NIK, Beograd, 2000.

Milis M., Ljubenkov I., Piskernik S., Pezo I., et al., Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* grown in Dalmatia (Croatia), *Food Chemistry*, 2010, 119:715-723.

Minussi C. R., Rossi M., Bologna L., Cordi L., et al., Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, 2003, 82, 409-416.

Monagas M., Bartolome B., Gomey-Cordoves C., Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45, 85-118.

Muselik J., Garcia-Alonso M., Martin-Lopez M. P., Žemlicka M., Rivas-Gonzalo J. C., Measurement of Antioxidant Activity of Wine Catechins, Procyanidins, Anthocyanins and Pyranoanthocyanins, *International Journal of Molecular Sciences*, 2007, 8, 797-809.

Nikfardjam M.S.P., Mark L., Avar P., Figler M., Ohmacht R., Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villany region, *Food Chemistry*, 2006, 98, 453-462.

Obradović M., Krsmanović m., Đorđević S., Dimić G., et al., *Hemijsko tehnološki priručnik*, Hemski i fizički podaci i veličine, Rad, Beograd, 1987

Ohara Z., Peterson T. E., Harrison D. G., Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production, *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 91, 2546-2551.

Ohshima H., Yoshie Y., Auriol S., Gilbert I., Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion, *Free Radical Biology and Medicine*, 1998, 25, 1057-1065.

Oszmianski J., Cheynier V., Moutounet M., Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 1712-1715.

Özkan M., Kirca A., Cemeroglu B., Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices, *Food Chemistry*, 2004, 88, 591-597.

Özkan M., Yemenicioglu A., Asefi N., Cemeroglu B., Degradation Kinetics of Anthocyanins from Sour Cherry, Pomegranate and Strawberry Juices by Hydrogen Peroxide, *Journal of Food Science*, 2002, 67, 525-529.

Pantelidis G. E., Vasilakakis M., Manganaris G. A., Diamantidis G., Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries and currants, gooseberries and Cornelian cherries, *Food Chemistry*, 2007, 102, 777-783.

Papp N., Szilvassy B., Szabo Z., Nyeki L., et al., Antioxidant capacitz, total phenolics and mineral element contents in fruit of Hngarian sour cherry cultivars, *International Journal of Horticultural Science*, 2008, 14, 59-64.

Pedesić S., Dragović-Uzelac V., Levaj B., Škevin D., Effect of Maturity and Geographical Region on Anthocyanin Content of Sour Cherries (*Prunus cerasus* var. marasca), *Food Thechnology and Biotechnology*, 2010, 48, 86-93.

Pedesić S., Levaj B., Dragović-Uzelac V., Kos K., Physicochemical Composition, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Sour Cherry cv. Marasca During Ripening, *Agriculturae Conspectus Scintificus*, 2007, 72, 295-300.

Pellegrini N., Simonetti P., Claudio G., Brighenti F., Pietta P., Polyphenol content and total antioxidant activity of red wines processed by carbonic maceration, *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, 1998.

Perez-Bendito D., Silva L., *Kinetic Methods in Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1988.

Perez-Zuniga F. J., Abad F. B., Cartagen L. G., Kinetics of non-enzymatic oxidation reaction: browning in white wines, *European Food Research and Technology*, 2000, 211, 252-256.

Piletić M. V., Milić B. Lj., Đilas S. M., Organska hemija II deo, Prometej, Novi Sad, 1993.

Piljac-Žegarac J., Valek L., Martinez S., Belščak A., Fluctuations in the Phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage, *Food Chemistry*, 2009, 113, 394-400.

Poiana M.A., Dobrei A., Stoin D., Ghita A., The influence of viticultural region and the ageing process on the color structure and antioxidant profile of Cabernet Sauvignon red wines, *Journal of Food , Agriculture & Environment*, 2008, 6, 104-108.

Price S. F., Breen P. J., Valladao M., Watson B. T., Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1995, 46, 187-194.

Provenzano M. R., Bilali H., Simeone V., Base N., et al., Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyarg, *Food Chemistry*, 2010, 122, 1338-1343.

Puškaš V. S., “*Uticaj tehnoloških faktora u proizvodnji crvenih vina na sadržaj i stabilnost katehina i njihovih oligominerala*”, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 2010.

Rastija, V., Srecnik, G., Medic-Saric, M. (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origin. *Food Chemistry*. 15, 54-60.

Ražić, S., Todorović, M., Holclajter'Antunović, I., Stoiljković, M. (1999). Determination og metal traces in wine by argon stabilized d.c.arc. *Frensenius Journal of Analytical Chemistry*, 365, 367-370.

Revilla, E., Ryan, J. M., Martin-Ortega, G. (1998). Comparison of several producers used for the extraction of anthocyanins from red grapes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4592-4597.

Riberau-Gayon J., Stonestreet E., Le dosage des anthocyanins dans le Vin rouge, *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 1965, 9, 2649.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A., *Hanbook of enology* (2nd ed.). *The microbiology of wine and vinifications* (Vol.2). Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd., 2006.

Rivas F.J., Beltran F.J., Frades J., Buxeda P., Oxidation of p-hydroxybenzoic acid bz Fenton's reagent, *Water Research*, 2001, 35(2), 387-396.

Robards K., Prenzer P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W., Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits, *Food Chemistry*, 1999, 66, 401-436.

Rodriguez-Delgado M. A., Gonzalez-Hernandez G., Conde-Gonzales J. E., Perez-Trujillo J. P., Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines, *Food Chemistry*, 2002, 78, 523-532.

Romero C., Bekker J., Effect of storage Temperature and Pyruvate on Kinetics of Anthocyanin Degradation, Vitisin A Derivate Formation, and Color Characteristics of Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48, 2135-2141.

Roussis I.G., Lambopoulos I., Tzimas P., Gkoulioti A., Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21, 614-621.

Ruberto G., Randa A., Daquino C., Amico V., et al., Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars, *Food Chemistry*, 2007, 100, 203-210.

Salaha M. I., Kallithraka S., Tzourou I., Browning of white wines: correlation with antioxidant characteristics, total polyphenolic composition and flavanol content, *International Journal of Food Science and Technology*, 2008, 43, 1073-1077.

Salem I. A., El-Mazawi M., Zaki A. B., Kinetics and mechanisms of decomposition reaction of hydrogen peroxide in presence of metal complexes, *International Journal of Chemical Kinetics*, 2000, 32, 643-666.

Sanchez-Moreno C., Larrauti J. A., Saura-Calixto F., Free radical scavenging of selected red, rose and white wines, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79, 1301-1304.

Savić J., Savić M., *Osnovi analitičke hemije*, Klasične metode, II izdanje, Svjetlost, Sarajevo, 1989.

Seabra R. M., Dopico-Garsia M. S., Fique A., Guerra L., et al., Principal components of phenolics to characterize red *Vinho Verde* grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds, *Talanta*, 2008, 75, 1190-1202.

Seeram N. P., Adams L. S., Zhang Y., Lee R., et al., Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cell in Vitro, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 9329-9339.

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.

Simonetti P., Pitta P., Testolin G., Polyphenol Content and Total Antioxidant Potential of Selected Italian Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 1152-1155.

Singleton V. L., Tannins and the qualities of wines. In: Plant Polyphenols Synthesis Properties, Significance, R.W. Hemingway and P.E. Laks (Eds.), Premium Press, New York, 1992, 859-880.

Singleton V. L., Rossi A., Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16, 144.

Sioumis N., Kallithraka S., Tsoutsouras E., Makris D. P., Kefalas P., Browning development in white wines: dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics, *European Food Research and Technology*, 2005, 220, 326-330.

Sioumis N., Kallithraka S., Makris D. P., Kefalas P., Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry*, 2006, 94, 98-104.

Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1996.

Smyk B., Pliszka B., Drabent R., Interaction between Cyanidin-3-glucoside and Cu(II) ions, *Food Chemistry*, 2008, 107, 1616-1622.

Stevanato R., Fabris S., Momo F., New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 6287-6293.

Stratil P., Kuban V., Fojtova J., Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods, *Czech Journal of Food Science*, 2008, 26, 242-253.

Todorović M., *Optičke metode instrumentalne analize*, Hemijski fakultet, Beograd, 1997

Toit W. J. d., Marais J., Pretorius I.S., Toit M. d., Oxygen in must and wine – A review, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2006, 27(1), 76-94.

Tseng K. C., Chang H. M., Wu J. S. B., Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions, *Journal of Food Processing and Preservation*, 2006, 30, 503-514.

Turkben C., Sariburun E., Demir, V., Uylaser V., Effect of Freezing and Frozgen Storage on Phenolic Compounds of Raspberry and Blackberry Cultivars, *Food Analytical Methods*, 2010, 3, 144-153.

Verbeyst L., Oey I., Van der Placken I., Hendrickx A., Loey A. V., Kinetic study on the termal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries, *Food Chemistry*, 2010, 123, 269-274.

Veljković S., *Hemiska kinetika*, Naučna knjiga, Beograd, 1967.

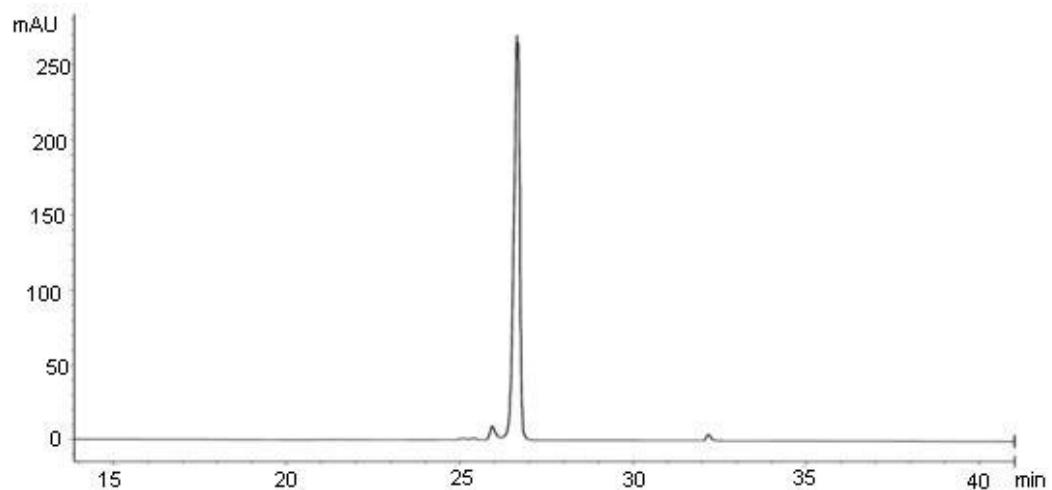
Yair M., *Concepts in Wine Chemistry*, James Crum, pH.D.ed., USA, 1997.

Yi C., Shi J., Kramer J., Xue S., et al., Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace power, *Food Chemistry*, 2009, 114:570-576.

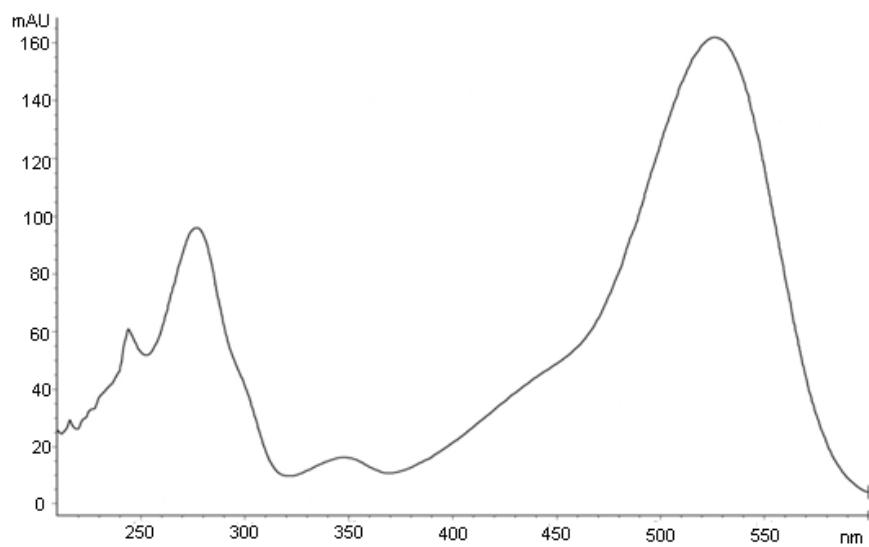
9. PRILOG

9.1. Hromatogrami i apsorpcioni spektri standarda

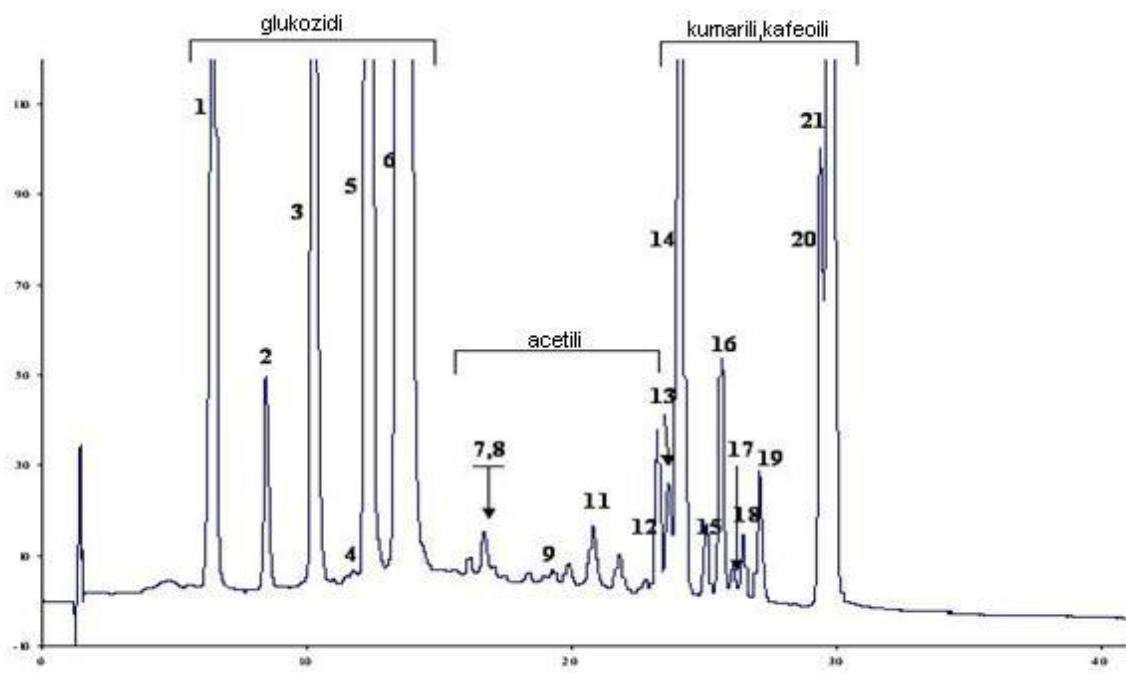
9.1.1 Antocijani



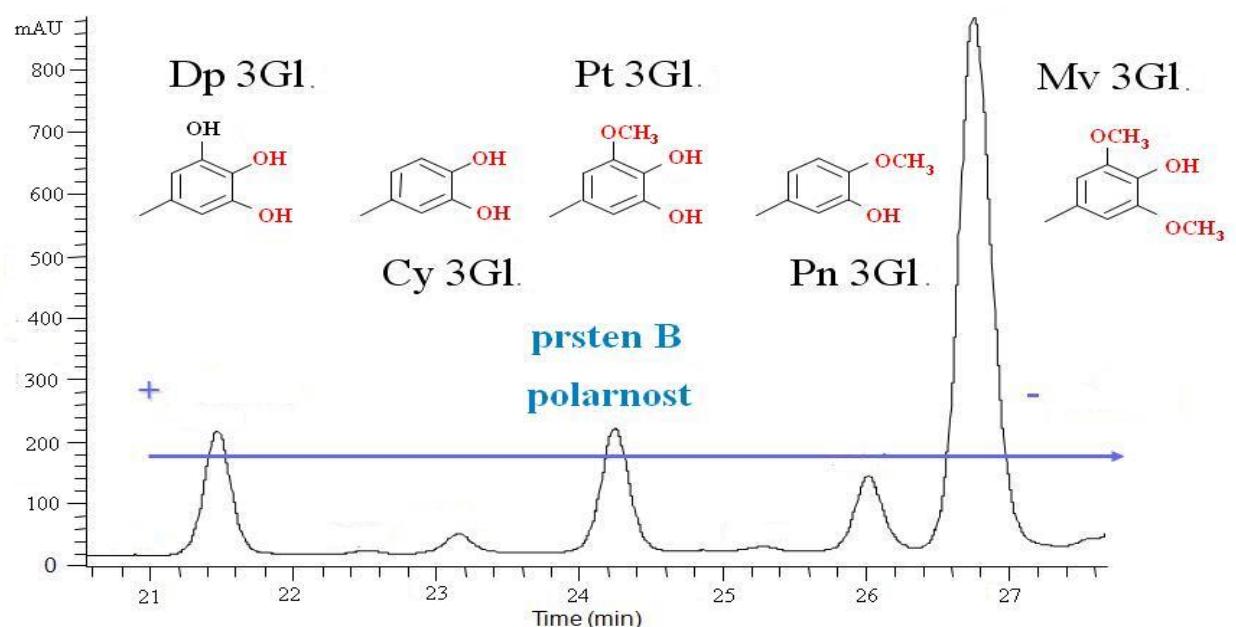
Slika 9.1. Hromatogram malvidin-3-glukozida.



Slika 9.2. Apsorpcioni spektar malvidin-3-glukozida na 520nm.

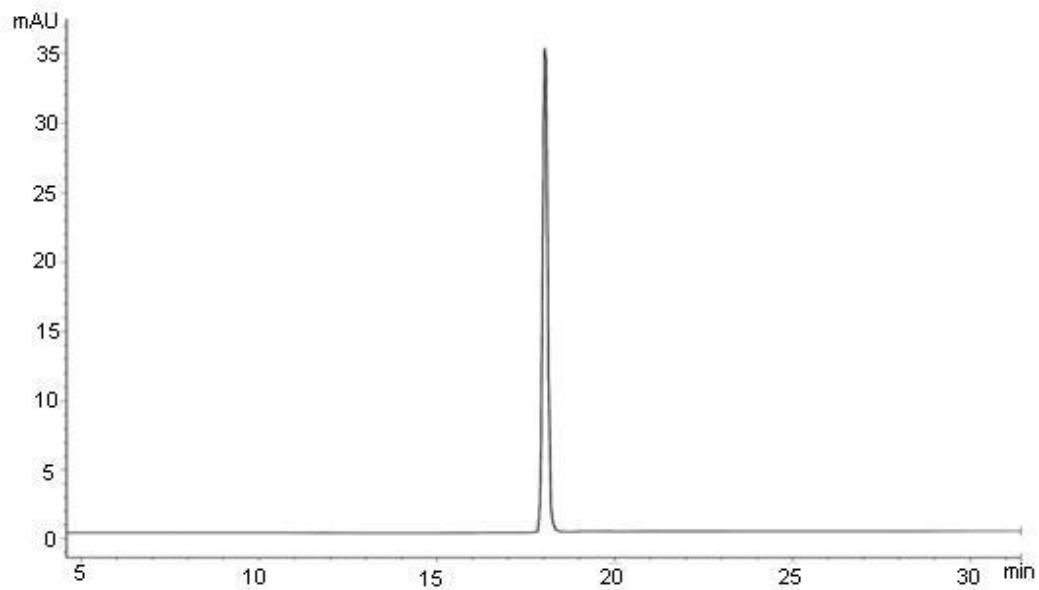


Slika 9.3. Standard pokojice grožđa (INRA, Montpellier, France).

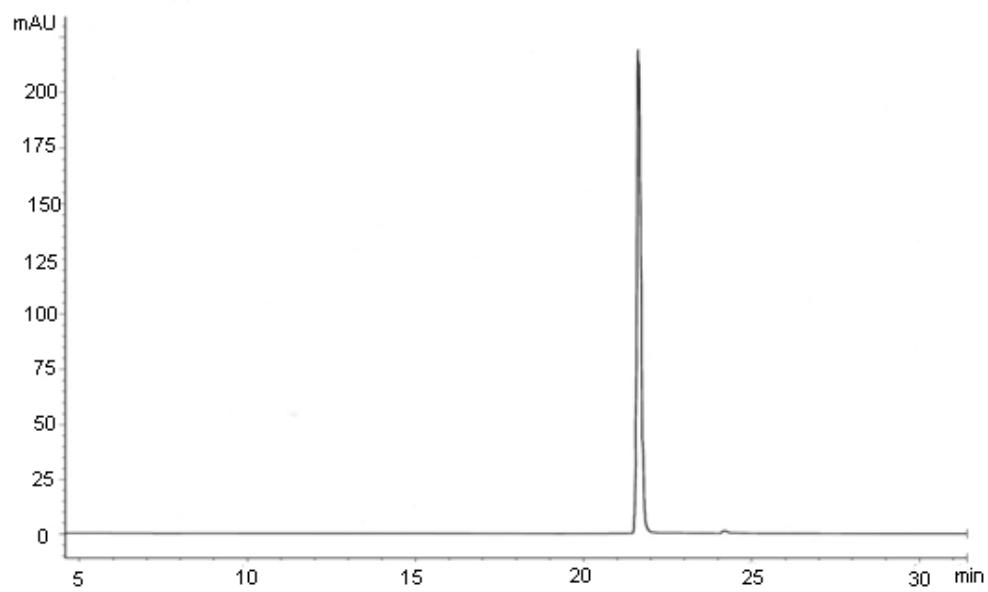


Slika 9.4. Razdvajanje antocijana prema polarnosti.

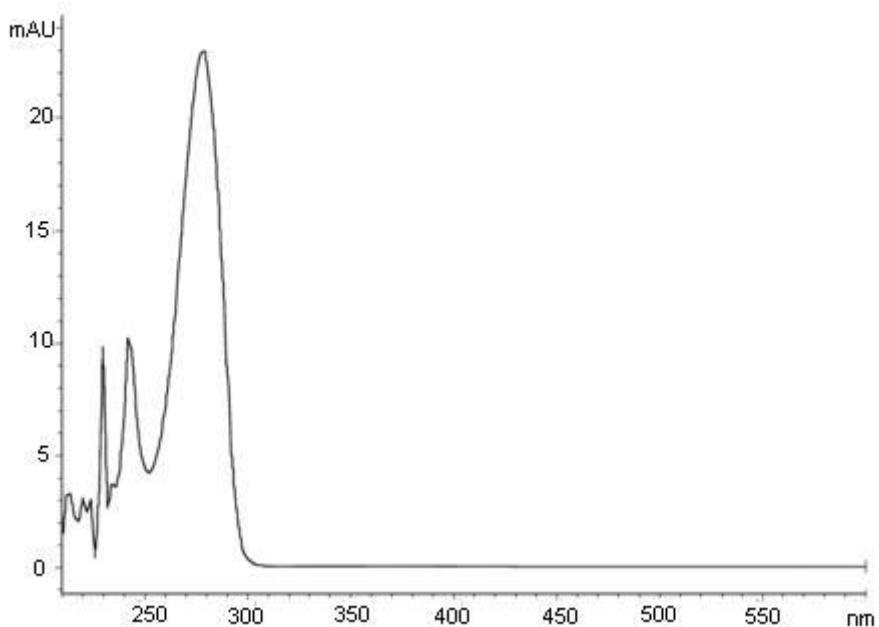
9.1.2. Flavan-3-oli



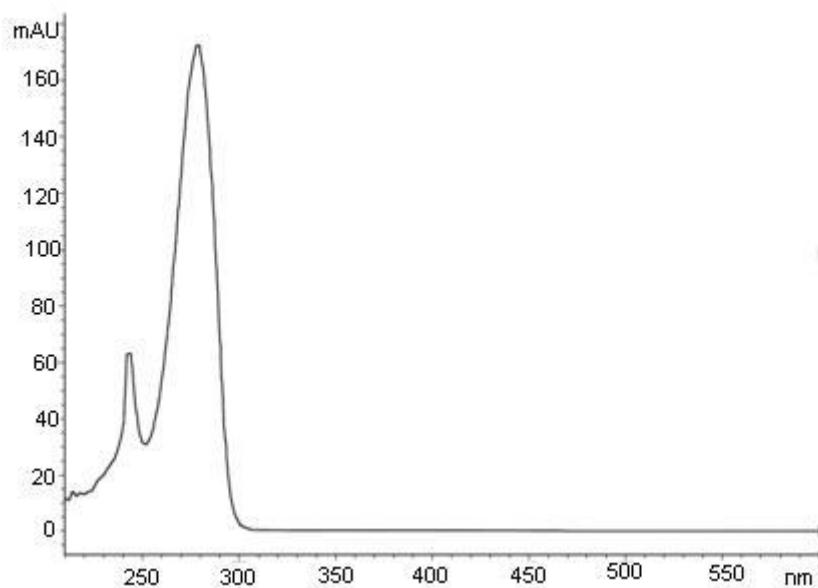
Slika 9.5. Hromatogram katehina ($275/322 \text{ nm}, \lambda_{ex}/\lambda_{em}$).



Slika 9.6. Hromatogram epikatehina ($275/322 \text{ nm}, \lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

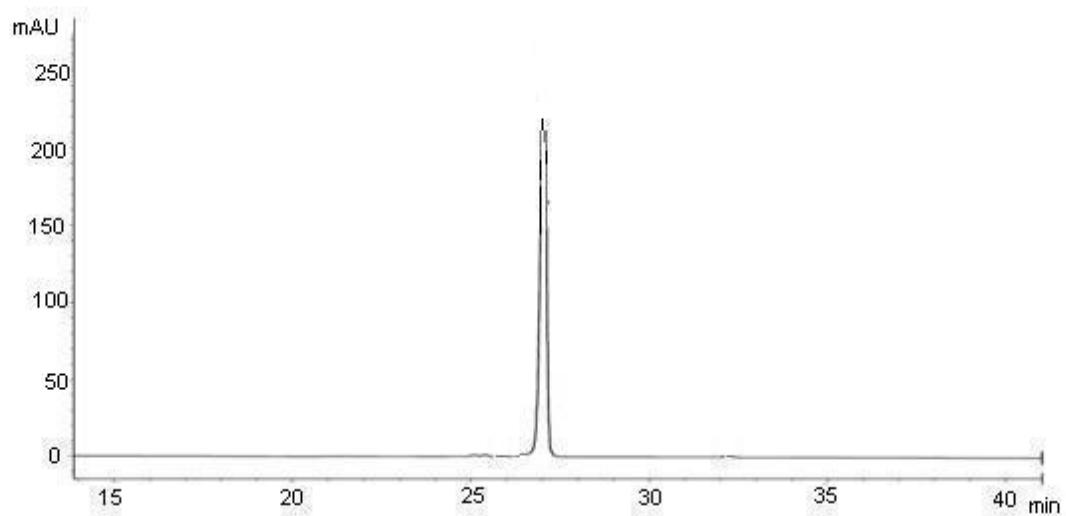


Slika 9.7. Apsorpcioni spektar katehina.

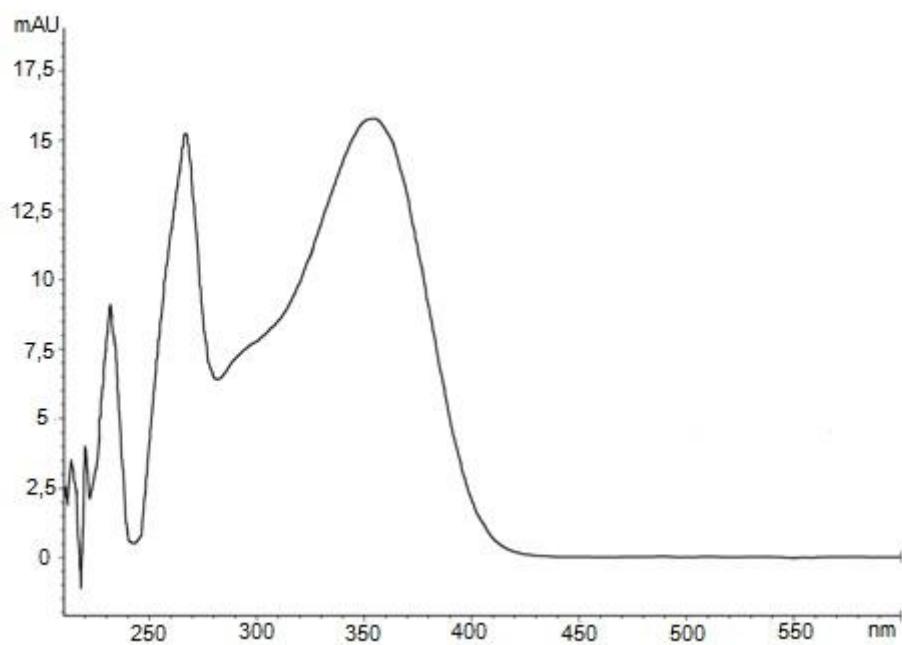


Slika 9.8. Apsorpcioni spektar epikatehina.

9.1.3. Flavonoli

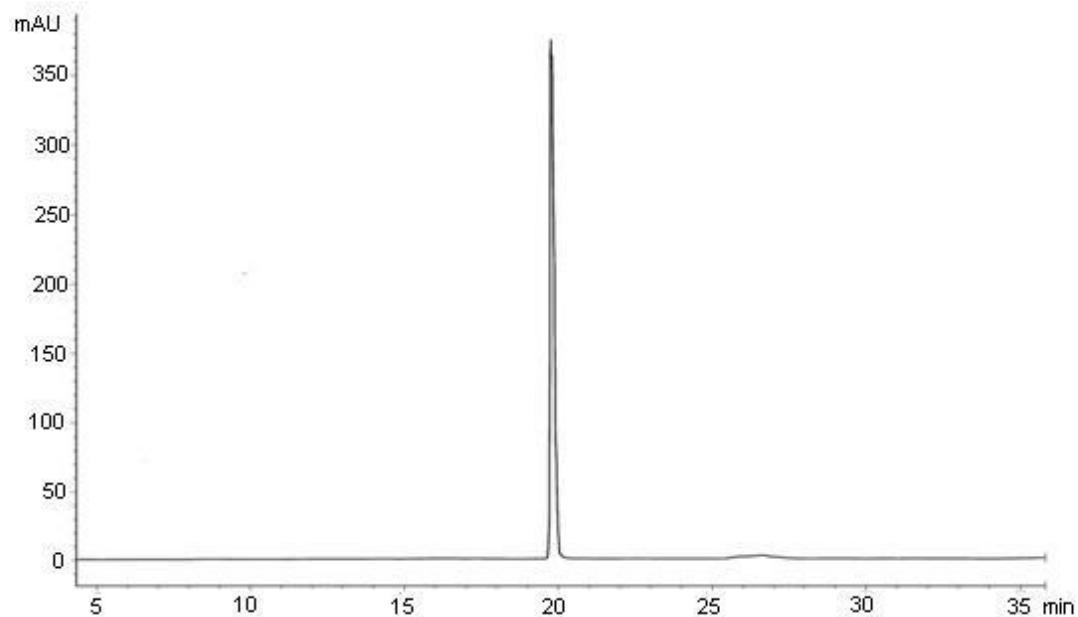


Slika 9.9. Hromatogram kvercetina na 360 nm.

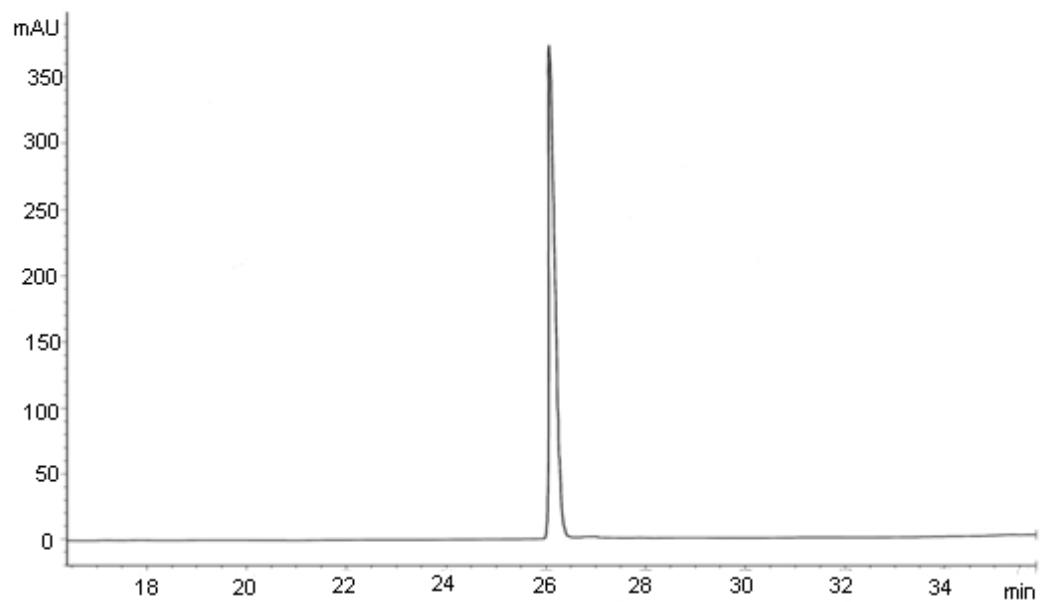


Slika 9.10. Apsorpcioni spektar kvercetina.

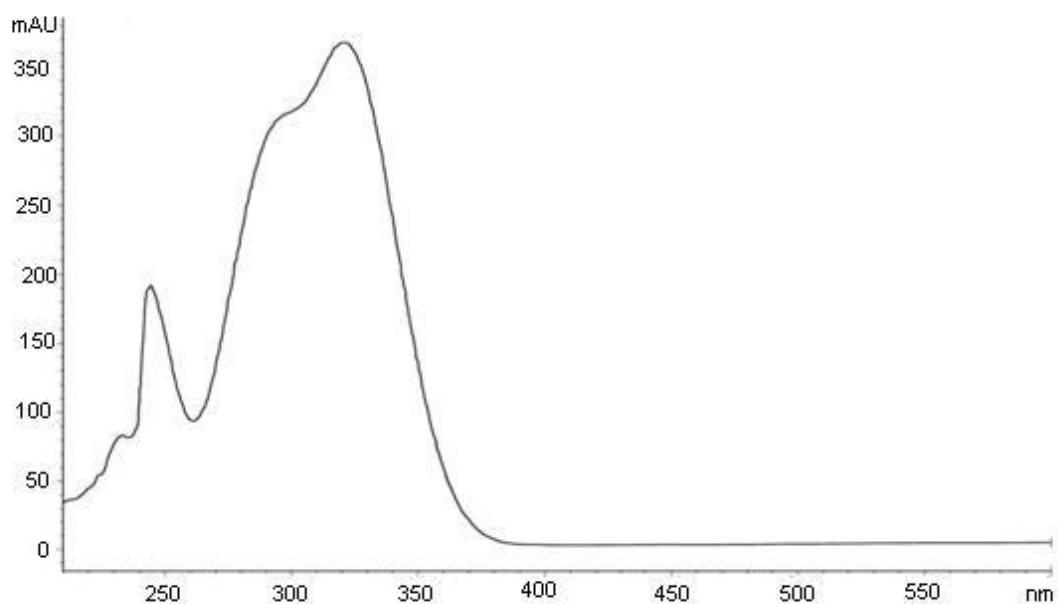
9.1.4. Hidroksicimetne kiseline



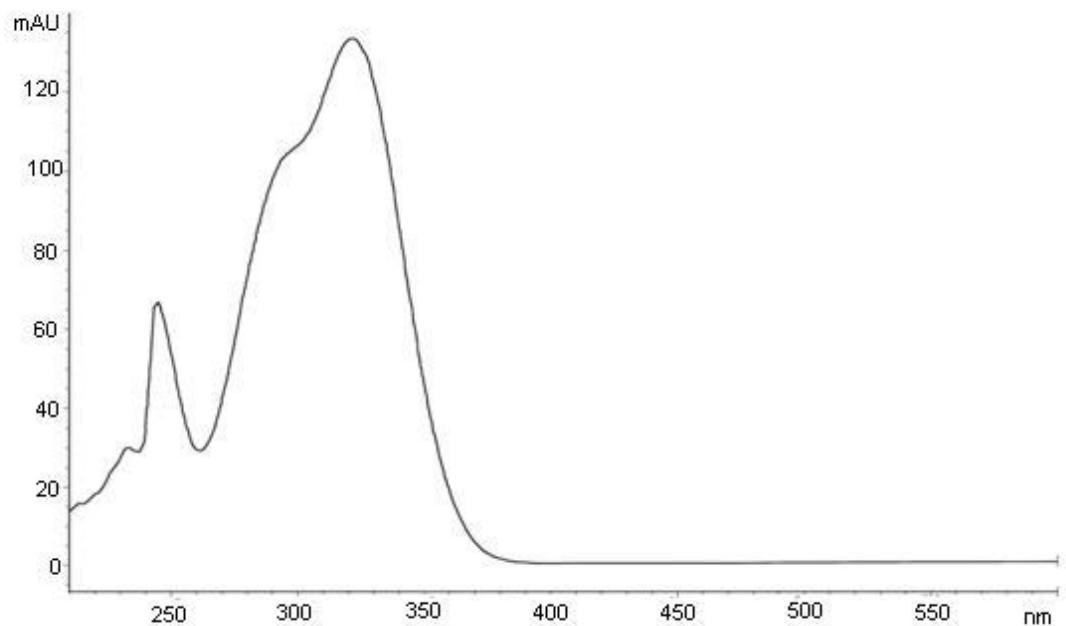
Slika 9.11. Hromatogram kafene kiselina na 320 nm.



Slika 9.12. Hromatogram ferulne kiselina na 320nm.



Slika 9.13. Apsorpcioni spektar kafene kiseline.



Slika 9.14. Apsorpcioni spektar ferulne kiseline.

9.2. Statistička obrada podataka

Bez obzira na pažnju analitičara i preciznost instrumenta, rezultati merenja se uvek rasipaju. Varijacije u eksperimentalnim podacima normalno su raspodeljene ako ponovljena merenja daju Gausovu krivu. Postoji jednaka verovatnoća da će merenje biti manje ili veće od aritmetičke sredine. Što je pojedinačno merenje dalje od aritmetičke sredine, manja je verovatnoća njegovog ponavljanja. Ako nema sistematske greške i kako se povećava broj merenja, aritmetička sredina teži prema μ (tačna vrednost), a standardno odstupanje prema σ . Standardno odstupanje (standardna devijacija) neke metode uobičajeni je parametar za određivanje i procenjivanje veličine slučajne greške i mera je ponovljivosti rezultata. Ako je standadrna devijacija približno jednakoj aritmetičkoj sredini, ponovljivost je loša, a dobro ponovljenim smatraju se rezultati čija je standadrna devijacija manja od 1% aritmetičke sredine.

Za vrlo veliki broj merenja standardna devijacija se izražava kao:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}} \quad 9.1$$

Često se umesto standardne devijacije koristi varijansa σ^2 .

U eksperimentalnim određivanjima ne srećemo se sa velikim brojem merenja, pa se postavlja pitanje mogu li se na takva određivanja primeniti statistički zakoni. Naime, za mali broj određivanja služimo se aritmetičkom sredinom \bar{x} , a ne njenom graničnom vrednošću μ , od koje se razlikuje zbog uticaja slučajne greške. Zbog toga za mali broj merenja ne smemo upotrebiti standardnu devijaciju σ , nego njegovu procenu s . Kao što je aritmetička sredina procena prave vrednosti, tako je i s procena standardne devijacije. Kako se na taj način u računanje unose dve nesigurnosti, potrebno je u imeniku jednačine umesto broja merenja n uvstiti broj *stepena slobode* $n-1$. broj stepena slobode v označava broj nezavisnih odstupanja merene vrednosti od aritmetičke sredine.

Stoga je izraz za procenu standardne devijacije, koji se naziva i eksperimentalnom standardnom devijacijom sledeći:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 9.2$$

Bolje je kao meru preciznosti upotrebiti relativnu standardnu devijaciju (RSD):

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100$$

9.3

Izraz za interval pouzdanosti merene veličine je:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$$

9.4

gde je t tabelarna vrednost koja se određuje na osnovu stepena slobode i nivoa pouzdanosti.

Svako ispitivanje temelji se na nekoj prepostavci koja se može potvrditi eksperimentom, ako se dobijene vrednosti sa njom podudaraju, ili, u protivnom odbaciti. Retka je potpuna podudarnost eksperimentalnih podataka s hipotetičkim podacima. Da bi se ustanovilo da li je razlika između dobijene i referentne vrednosti posledica slučajne ili sistematske greške, sprovode se statistički testovi signifikatnosti. Uz pomoć statističkih testova može se proceniti da li je dobijena razlika statistički signifikantna, pa hipotezu treba odbaciti, ili se rezultat može prihvati zato što je posledica slučajne greške.

Prilikom testiranja postavlja se nulta hipoteza, kojom tvrdimo da nema razlike između dobijene i referentne vrednosti. Ako se ta predpostavka potvrdi, znači da je uočena razlika posledica slučajne greške. Verovatnoća prihvatanja ili odbacivanja hipoteze obično je $p=0,05$, što znači da postoji 5%-tna verovatnoća prihvatanja greške ili odbacivanja ispravne hipoteze. Kada želimo smanjiti taj rizik, odlučujemo se za 1%-tnu verovatnoću, što se označava sa $p=0,01$.

Pri odabiru testa za rešavanje statističkog problema treba uzeti u obzir prirodu ispitivanog uzorka, način uzorkovanja i metodu ispitivanja

Poređenje srednjih vrednosti. t-test. Rezultati analize nekog uzorka dobijeni primenom različitih metoda ili od strane raznih eksperimentatora po pravilu se međusobno donekle razlikuju i nisu jednako precizni, odnosno reproduktivni. Slično kao i u predhodnom slučaju, i ovde možemo metodama matematičke statistike proveriti sa kolikom je verovatnoćom razlika između dveju srednje vrednosti \bar{x}_1 i \bar{x}_2 dva niza rezultata značajna, ili je uzrokovana samo slučajnim greškama. U tu svrhu se obično primenjuje tzv.t-test (Studentov t-test). Predhodno se mora proveriti da li postoji značajna razlika između standardnih devijacija s_1 i s_2 dva niza rezultata (F-test). Ako je ova razlika značajna, srednje vrednosti se ne mogu upoređivati.

Za poređenje srednjih vrednosti pomoću t-testa primenjuje se sledeća jednačina:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

9.5

gde su \bar{x}_1 i \bar{x}_2 = srednje vrednosti dva niza rezultata

n_1 i n_2 = broj rezultata u svakom nizu

s = srednja standardna devijacija dva posmatrana niza rezultata.

Srednja standardna devijacija s dva niza rezultata dobija se iz odnosa

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_1} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (x_i - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$= \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad 9.6$$

gde je $(n_1 + n_2 - 2)$ = broj stepena slobode.

Ako je izračunata vrednost t veća od tabelarne za izabrani nivo poverenja i za dati broj stepena slobode v , tj. ako je $t_{eksp.} > t_{iz\ tabela}$, između dveju srednjih vrednosti \bar{x}_1 i \bar{x}_2 postoji značajna razlika. U obrnutom slučaju, razlika među srednjim vrednostima je bezznačajna, odnosno uzrokovana samo slučajnim greškama.

Poređenje standardnih devijacija. F-test. F-test se primenjuje za ispitivanje postojanja značajne razlike u preciznosti između dva niza rezultata koji su dobijeni npr. primenom dveju različitih metoda ili od dva razna eksperimentatora. Test se zasniva na poređenju varijansa (s_1^2 i s_2^2) dva posmatrana niza rezultata. Veličina F je definisana odnosom:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad 9.7$$

i da bi bila veća od jedinice, u brojitelj se, po dogovoru, uvek stavlja veća varijansa. Vrednost F izračunata iz eksperimentalnih podataka se upoređuje s vrednostima F datim u tabelama za izabrani nivo poverenja i za dati broj stepena slobode dva niza rezultata. Ako je $F_{eksp.} > F_{iz\ tabela}$, između dva niza rezultata postoji značajna razlika u preciznosti (Savić i Savić, 1989).

Analiza varijanse (ANOVA). Ako se žele uporediti dve ili više aritmetičke sredine, koristi se analiza varijanse, moćna statistička tehnika, kojom se mogu odvojiti i proceniti različiti uzorci. Realizuje se postavljanjem nulte hipoteze i upoređivanjem aritmetičkih sredina tako da se izračunava procena varijansa unutar uzorka i procena varijansa među uzorcima.

U jednosmernoj (one-way, ANOVA) analizi varijanse može proizići signifikantan rezultat zato što se jedan prosek može razlikovati od svih ostalih, ili se svi proseci mogu razlikovati međusobno, što u ovom slučaju znači da se elementi prate samo po jednom

parametru i da elementi iz jedne grupe nisu ni u kakvoj funkcionalnoj zavisnosti od elemenata iz ostalih grupa (*Kaštelan-Macan, 2003*).

Nulta hipoteza u ovom slučaju glasi: svi uzorci koji se porede potiču iz iste populacije sa srednjom vrednošću μ i standardnom devijacijom σ , uočene razlike potiču samo od slučajne prirode uzorka. Statističkim testom pokazujemo da li hipotezu treba odbaciti ili ne. Mada se ANOVA izvodi koristeći klasične softvere, biće prikazani osnovni koraci ove analize. Uobičajeno se deli na više manjih koraka:

- *Tabela podataka.* Polazi se od nekoliko grupa podataka pri čemu svaka grupa (uzorci) ima svoje elemente (podatke), (pojedinična merenja svakog uzorka) koje zajedno treba prikazati u okviru jedne matrice (tabele) u kojoj će se svaka grupa indeksirati sa j , a svaki element grupe indeksirati sa i . Koristeći indekse moguće je skupiti sve podatke u zajedničku tabelu, a da se podaci ne pomešaju, s obzirom da se označavaju sa x_{ji} . Tako treće merenje drugog uzorka označavamo sa x_{23} .
- *Srednja vrednost celog skupa* (x_{sr}). Sve elemente tabele saberemo i podelimo ukupnim brojem izvršenih merenja (anaize):

$$x_{sr} = \frac{\sum_j \sum_i x_{ji}}{N} \quad 9.8$$

- *Ukupni kvadrat odstupanja* (U_{ss}) predstavlja disperziju celog skupa:

$$U_{ss} = \sum_j \sum_i (x_{ji} - x_{sr})^2 \quad 9.9$$

- *Zbir kvadrata između grupa (uzorka)* (T_{ss}). Za svaku grupu nađemo prosečno odstupanje:

$$\sum_i \frac{(x_{ji} - x_{sr})}{n_j} \quad 9.10$$

Kvadriramo ovu vrednost i pomnožimo brojem elemenata u grupi:

$$n_j \left(\sum_i \frac{(x_{ji} - x_{sr})}{n_j} \right)^2 \quad 9.11$$

a potom saberemo vrednosti za svaku grupu:

$$T_{ss} = \sum_j n_j \left(\sum_i \frac{(x_{ji} - x_{sr})}{n_j} \right)^2 \quad 9.12$$

- *Zbir kvadrata unutar grupa* (P_{ss}). Dobija se iz razlike ukupnog kvadrata odstupanja (U_{ss}) i zbiru kvadrata između grupa (T_{ss}):

$$P_{ss} = U_{ss} - T_{ss} \quad 9.13$$

- **Varijansa između grupa** (T_{MS}), predstavlja zbir kvadrata između grupa (T_{SS}) podeljen stepenima slobode između grupa. Broj stepena slobode (df) između grupa jednak je broju grupa umanjenim za jedan:

$$T_{MS} = \frac{T_{SS}}{j-1} \quad 9.14$$

- **Varijansa unutar grupa** (s_p^2), predstavlja zbor kvadrata unutar grupa (P_{SS}) podeljen brojem stepena slobode unutar grupa. Ovaj broj stepena slobode (df) jednak je ukupnom broju elemenata umanjenom za broj kolona:

$$S_{P^2} = \frac{P_{SS}}{N-j} \quad 9.15$$

- **F količnik (F test)** računamo tako što varijansu između kolona (T_{MS}) podelimo varijansom unutar kolona (S_{P^2}):

$$F = \frac{T_{MS}}{S_{P^2}} \quad 9.16$$

Izračunato F se upoređuje sa tabelarnim za traženi nivo pouzdanosti i u slučaju $F_{izračunat} > F_{tabelarno}$ nultu hipotezu treba odbaciti. Što je F količnik veći to se grupe više razlikuju.

Kako bi se uporedile srednje vrednosti grupa (uzoraka) mogu se primeniti: test najmanje značajne razlike (LSD-test), Takijev test (Tukey-test), Dankenov (Duncan-test), Njutan-Kelsov (Newman-Keuls) i Šeferov (Scheffe test). Svi navedeni testovi su parametrijski, i u većem stepenu od F-testa su osjetljivi na ispunjenje pretpostavki da je raspodela merenja normalna i da su varijanse osnovnih grupa homogene (Čobanović, 2003).

Karakteristično za ove testove je da se pri utvrđivanju kritične vrednosti koristi ocenjena standardna greška razlike dve aritmetičke sredine i ocenjena standardna greška aritmetičke sredine, koje su zasnovane na ocenjenoj varijansi pogreške (S_{P^2}). U slučaju LSD testa koristi se standardna greška razlike dve aritmetičke sredine data sledećim izrazom:

$$S_{(\bar{x}_j - \bar{x}_i)} = \sqrt{S_{P^2} \left(\frac{1}{n_j} + \frac{1}{n_i} \right)} \quad 9.17$$

Ukoliko se radi o nejednakom broju ponovljenih analiza.

Ili,

$$S_{(\bar{x}_j - \bar{x}_i)} = \sqrt{\frac{2S_{P^2}}{n}} \quad 9.18$$

Ukoliko se radi o jednakom broju ponavljanja analize, tj. ako je $n_1 = n_2 = \dots = n$.

U slučaju ostalih testova koristi se standardna greška aritmetičke sredine data izrazom:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_p^2}{n}} \quad 9.19$$

Ukoliko se radi o jednakom broju ponavljanja analize.

Ukoliko je broj ponavljanja analize nejednak, tada se u izrazu (9.19) zamenjuje vrednošću \bar{n} , koji je dat izrazom:

$$\bar{n} = \frac{j}{[(1/n_1)+(1/n_2)+\dots+(1/n_j)]} \quad 9.20$$

gde je j broj uzoraka (grupa) (Kirk, 1968).

- *Test najmanje značajne razlike (LSD test)* zasnovan je na utvrđivanju sledeće kritične vrednosti:

$$LSD_{\alpha} = t_{\alpha(N-j)} S_{(\bar{x}_j - \bar{x}_i)} \quad 9.21$$

U izrazu (76) $t_{\alpha(N-j)}$ je kritična vrednost z tablice Studentove distribucije. Ovaj test se koristi kada je F-test značajan i kada se žele sačiniti upoređenja srednjih vrednosti uzoraka.

- *Takijev test* je sličan LSD testu. Ovaj test ima i naziv HSD (honesty significant difference) test. U primeni ovog testa utvrđuje se sledeća kritična vrednost:

$$HSD_{\alpha} = q_{\alpha(j;N-j)} S_{\bar{x}} \quad 9.22$$

Vrednost q_{α} u izrazu (9.22) utvrđuje se iz posebnih tablica po Takiju, u zavisnosti od broja grupa (uzoraka) i stepena slobode pogreške.

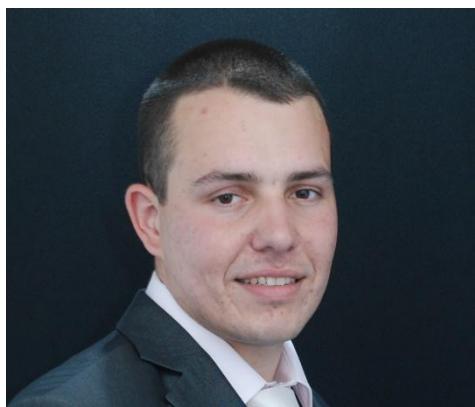
- *Dankenov test (vešestruki intervalni test)* ima čestu primenu u praktičnom radu. Kritična vrednost ovog testa utvrđuje se primenom sledećeg izraza (Montgomery, 1997):

$$R_p = r_{\alpha(p;N-j)} S_{\bar{x}} \quad (\text{za } p = 2,3,\dots,j) \quad 9.23$$

Kritična vrednost, r_{α} , iz izraza (9.23) koristi se iz posebnih tablica po Dankenu, u zavisnosti od stepena slobode pogreške i broja intervala sredina $p = 2,3,\dots,j$. U primeni ovog testa proseci uroraka se rangiraju prema veličini. Tada se razlika najvećeg i najmanjeg proseka upoređuje sa najmanje značajnim intervalom R_p , itd. Ukoliko je razlika $\geq R_p$, ona je statistički značajna. Ovaj test je vrlo efikasan i zbog toga se često koristi.

10. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

Biografski podaci



Milan N. Mitić je rođen 15.11.1983. godine u Nišu. Gimnaziju «Bora Stanković» završio je 2002. godine u Nišu. Na Odseku za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu diplomirao je 2008. godine. Doktorske studije iz hemije, na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, upisao je školske 2008/2009. godine i položio sve ispite predviđene planom i programom prosečnom ocenom 10,00.

Profesionalna karijera

Nakon završetka osnovnih studija angažovan je kao istraživač na projektu Evropske Unije, FP7-REG-POT-2007-3-01 «CHROMOLAB-ANTIOXIDANT» od 15.09.2008. Bio je na stručnom usavršavanju od 05.11.2008. do 20.12.2008. u laboratoriji National Institute for Agricultural Research, Montpellier, INRA, France. Decembra 2010. godine izabran je za asistenta na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu na Depertmanu za hemiju. Bio je angažovan na vežbama iz predmeta: Fizička hemija I, Fizička hemija II, Hemija na departmanu za fiziku, Elektrohemija i Savremene elektroanalitičke metode analize.

Iz doktorske disertacije Milan Mitić je objavio pet radova u međunarodnim časopisima i 11 radova saopštilo na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21 (8 bodova)

1. Snežana S. Mitić, Mirjana V. Obradović, **Milan N. Mitić**, Danijela A. Kostić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Milan D. Stojković, Elemental Composition of Various Sour Cherry and Table Grape Cultivars Using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry Method (ICP-OES), *Food Anal. Methods*, DOI 10.1007/s12161-011-9232-2, Online First (IF=1,932)

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu M22 (5 bodova)

2. **Milan N. Mitić**, Mirjana V. Obradović, Zora B. Grahovac, Aleksandra N. Pavlović, Antioxidant Capacities and Phenolic Levels of Different Varieties of Serbian White Wines, *Molecules*, 15 (3), 2016-2027, 2010. (IF=1,988)

Rad citiran u: Journal of Agricultural and Food Chemistry (M21, IF=2,816), International Journal of Molecular Sciences (M21, IF=2,279), Food Bioprocess Technology (M21, IF=3,576), Molecules (M22, IF=1,988), Journal of Medicinal Plant Research, Journal of Applied Pharmaceutical Science, Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară, i u knjizi Ida Sundari NIM M0305036, dengan judul „Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.)“

Rad u međunarodnom časopisu M23 (3 boda)

3. **Milan N. Mitić**, Mirjana V. Obradović, Danijela A. Kostić, Danijela Č. Nasković-Đokić, Ružica J. Micić, Phenolic Content and Radical Scavenging Capacity of Commercial Red Juices, *Hemisika Industrija*, 65(5), 611-619, 2011. (IF=0,137).
4. **Milan N. Mitić**, Mirjana V. Obradović, Danijela A. Kostić, Ružica J. Micić, Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Sour Cherries from Serbia, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, DOI: 10.2298/CICEQ110701046M. (IF=0,580).
5. **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. (IF= 0,505).

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnim značaja štampani u celini M33 (1 bod)

1. Mirjana V. Obradović, **Milan N. Mitić**, Aleksandra A. Pavlović, Snežana B. Tošić, Determination of Heavy Metals in Sour Cherry Using by ICP-OES. 10th International Multidisciplinary Scientific Geoconferences:SGEM, 2010, Vol II, 467-470.
2. **Milan N. Mitić**, Snežana S. Mitić, Blaga C. Radovanović, Hydroxicinnamic acids in red Serbian wines from different varieties, XXVth International Conference on Polyphenols-Polyphenols Communications 2010, Vol. 2 T5.54.574-575.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnim značaja štampani u izvodu M34 (0,5 bodova)

3. **Milan N. Mitić**, Mirjana V. Obradović, Catechin in Serbian red wines, 2nd Symposium of Chemistry and Environment, Bar, Montenegro, Book of Abstracts, 81, 2009.

4. **Milan N. Mitić**, Mirjana V. Obradović, Hydroxycinnamic acids in Serbian white wines from different varieties, 2nd Symposium of Chemistry and Environment, Bar, Montenegro, Book of Abstracts, 82, 2009.
5. **Milan N. Mitić**, Mirjana V. Obradović, Marija Radosavljević, Determination of antioxidant activity in Serbian white wines, 1st International Congres: Engineering, materials and management in the processing industry, Jahorina, Republic of Srpska, Book of Abstracts, 166, 2009.
6. Mirjana V. Obradović, **Milan N. Mitić**, Zora B. Grahovac, Determination of total monomeric anthocyanins in red wines, 1st International Congres: Engineering, materials and management in the processing industry, Jahorina, Republic of Srpska, Book of Abstracts, 190, 2009.
7. **M. Mitić**, M. Obradović, Z. Grahovac, Determination of polyphenols in wine Vranac, 8th Symposium «Novel technologies and economic development», Leskovac, Book of Abstracts, 58, 2009.
8. **M. Mitić**, M. Obradović, S. Mitić, Z. Grahovac, Determination of anthocyanins in sour cherry of different ripening stages, 8th Symposium «Novel technologies and economic development», Leskovac, Book of Abstracts, 78, 2009.

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu M64 (0,2 boda)

9. **Milan N. Mitić**, Gordana Ž. Milić, HPLC određivanje anthocijana u crvenom vinu, XLVII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, AH08, 18, 2009.
10. **Milan N. Mitić**, Određivanje polifenola u belom vinu, XLVII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, AH09, 19, 2009.
11. Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Milić, Danijela A. Kostić, **Milan N. Mitić**, Marija Radosavljević, Određivanje antioksidativne aktivnosti višnje u različitim fazama zrenja, , XLVII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, AH07, 17, 2009. (M64)

Objavljeni i saopšteni radovi kandidata koji nisu deo doktorske disertacije:

Rad u međunarodnom časopisu M23 (3 boda)

1. Kostić Danijela A, Mitić Snezana S, **Mitić Milan N**, Zarubica Aleksandra R, Velicković Jasmina M, Djordjević Aleksandra S, Randjelović Sasa S , Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of Papaver rhoes L. extracts from Southeast Serbia, *J. Med. Plant. Res.*, 4(17), 1727-1732, 2010 (M23, IF=0,879)
2. Ruzica Micić, Snezana Mitić, Aleksandra Pavlović, Snezana Tosić, **Milan Mitić**, Kinetic determination of traces of Th(IV) on the basis of its catalytic effect in environmental water samples, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 288, 845-850, 2011 (M23, IF=0,777)
3. Mitic Snežana S., Kostić Danijela A., Nasković-Đokić Danijela C., **Mitić Milan N.**, Rapid and Reliable HPLC Method for the Determination of Vitamin C in Pharmaceutical Samples,, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10, 105-111, 2011 (M23, IF=0,528)
4. Danijela Kostić, Snežana Mitić, Aleksandra Zarubica, **Milan Mitić**, Jasmina Veličković, Saša Randelović, Content of trace metals in medicinal plants and water extracts. *Hemisika Industrija*, 65(2), 165-170, 2011 (M23, IF=0,137)
5. Danijela A. Kostić, Snežana S. Mitić, Gordana Ž. Miletić, **Milan N. Mitić**, Slavica M. Sunarić, A Kinetic-Spectrophotometric Method for Determination of Gallic Acid in Wines, *Oxidation Communication*, 2011, prihvaćen za objavljinje (M23, IF=0,250).
6. Danijela A. Kostić, Snežana S. Mitić, Danijela C. Nasković-Đokić, Aleksandra R. Zarubica, **Milan N. Mitić**, Determination of bezalkonium chloride in nasal drops by high-performance liquid chromatography, *Hemisika industrija*, 2011, prihvaćen za objavljinje (M23, IF=0,137).
7. Danijela A. Kostić, Snežana S. Mitić, Jasmina B. Veličković, **Milan N. Mitić**, Saša S. Randelović, Content of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Crataegus Oxyacantha* L. Fruit from Southeast Serbia habita, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2011, prihvaćen za objavljinje (M23, IF=0,528).
8. Snežana S. Mitić, Aleksandra A. Pavlović, Snežana B. Tošić, Emilia T. Pecev, **Milan N. Mitić**, Milan B. Stojković, Development and application of method for clonazepam determination based on ligand-exchange reaction, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2011, prihvaćen za objavljinje (M23, IF=0,528).

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja M51 (2 boda)

9. Snežana S. Mitić, Aleksandra A. Pavlović, Snežana B. Tošić, Emilija T. Pecev, **Milan N. Mitić**, Ružica J. Micić, A kinetic method for the determination of diazepam based on ligand-exchange reaction, *Journal of Chemistry Pharmaceutical Research*, 3(2), 605-611, 2011.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u celini M33 (1 bod)

1. **Milan N. Mitić**, Mirjana V. Obradović, Aleksandra A. Pavlović, Snežana B. Tošić, Determination and Levels of Iron and Copper in Serbian White Wines, 10th International Multidisciplinary Scientific Geoconferences:SGEM, 2010, Vol II, 965-967. (M33).
2. Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Aleksandra A. Pavlović, Milan B. Stojković, **Milan N. Mitić**, Branka Stojanović, Alkali and Alkaline Earth Metal Content of Early Season Vegetables of Souther Serbian Regions, 10th International Multidisciplinary Scientific Geoconferences:SGEM, 2010, Vol II, 665-667. (M33).
3. Snežana S. Mitić, Valentina V. Živanović, **Milan N. Mitić**, Milan B. Stojković, Determination of Herbicide 2,4-D in Soil Samples by Kinetic-spectrophotometric Method, 10th International Multidisciplinary Scientific Geoconferences:SGEM, 2010, Vol II, 471-472. (M33).
4. Blaga C. Radovanović, Marko Andđelković, Aleksandra Radovanović, **Milan N. Mitić**, Determination of polyphenolic composition and antioxidant activity of grape Vranac during ripening, XXVth International Conference on Polyphenols-Polyphenols Communications 2010, Vol. 2 T5.68. 602-603. (M33)

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodu M34 (0,5 bodova)

5. S.Mitić, D. Kostić, **M. Mitić**, M. Radosavljević, S. Tošić, A. Pavlović, Determination of Zn in red and white wine samples by inductively coupled plasma emission spectroscopy, 1st International Congres: Engineering, materials and management in the processing industry, Jahorina, Republic of Srpska, Book of Abstracts, 176, 2009. (M34)

6. B.T. Stojanović, S.S. Mitić, M.B. Stojković, **M.N. Mitić**, J.LJ. Pavlović, I.D. Rašić Mišić, Heavy metal content determination in domestic peaches, Thirteenth Annual Conference, YUCOMAT 2011, Herceg Novi, Book of Abstracts, 157, 2011
7. D. Kostić, J. Veličković, S. Mitić, **M. Mitić**, S. Randelović, The content of phenolic compounds antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit from Southeast Serbia habitat, 9th Szmposium „Novel Technologies and economic development“, Leskovac, BPT-11/BFT-11, 55, 2011
8. I. Rašić-Mišić, G. Miletić, S. Mitić, **M. Mitić**, E. Pecev-Marinković, A simple method for the ampicilline determination in pharmaceuticals and human urine, Euroanalzsis XVI, Beograd, 2011.