

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mario HERCEZI

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST  
EKSTRAKTOV HMELJA RAZLIČNEGA  
GEOGRAFSKEGA POREKLA IN KULTIVARJEV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mario HERCEZI

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV HMELJA  
RAZLIČNEGA GEOGRAFSKEGA POREKLA IN KULTIVARJEV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANTIOXIDATIVE CHARACTERISTICS OF HOP EXTRACTS OF  
DIFFERENT GEOGRAPHICAL ORIGINS AND DIFFERENT  
CULTIVARS**

GRADUATION THESIS  
University study

Ljubljana, 2016

## **POPRAVKI**

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijske analize in obdelava podatkov sta bili opravljeni na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrich, za somentorja doc. dr. Iztok Jože Košir in za recenzentko prof. dr. Veronika Abram.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Somentor: doc. dr. Iztok Jože Košir

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mario Hercezi

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

<b>ŠD</b>	Dn
<b>DK</b>	UDK 633.791:547.56:577.1(043)=163.6
<b>KG</b>	hmelj/listi/storžki/ <i>Humulus lupulus</i> /fenolne spojine/alfa-kisline/beta-kisline/antioksidanti/antioksidativne lastnosti/DPPH/analiza sposobnosti redukcije/ HPLC
<b>AV</b>	HERCEZI, Mario
<b>SA</b>	POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/KOŠIR, Iztok (somentor)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
<b>KZ</b>	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
<b>ZA</b>	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
<b>LI</b>	2016
<b>IN</b>	ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV HMELJA RAZLIČNEGA GEOGRAFSKEGA POREKLA IN KULTIVARJEV
<b>TD</b>	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
<b>OP</b>	XIII, 41 str., 14 pregl., 12 sl., 4 pril., 48 vir.
<b>IJ</b>	sl
<b>JI</b>	sl/en
<b>AI</b>	V analizi smo uporabili posušene liste in storžke hmelja kultivarjev 'Aurora' (Aurora) in 'Hallertauer Magnum' (H. Magnum) (letnik 2009) iz Slovenije, Avstrije, Nemčije in Češke. Nameravali smo določiti vsebnost in profil fenolnih spojin, alfa- in beta-kislin, ksantohumola in antioksidativne učinkovitosti etanolnih ekstraktov obeh kultivarjev z različnih geografskih področij. Določili smo skupne fenolne spojine po Folin-Ciocalteujevi metodi in rezultate podali z ekvivalenti klorogenske kisline. V splošnem so imeli etanolni ekstrakti iz storžkov od 3- do 8-krat večjo koncentracijo fenolnih spojin kot listi. Kultivar H. Magnum je imel več fenolnih spojin kot kultivar Aurora. Antioksidativne lastnosti v etanolnih ekstraktih smo določili z metodo DPPH in z analizo sposobnosti redukcije. Pokazali smo, da z DPPH testom in analizo sposobnosti redukcije, ki se sicer obe uporabljava za določanje antioksidativnih učinkovitosti, pri enakih vzorcih dobimo različne rezultate. Alfa- in beta-kisline, ksantohumol in profil fenolnih spojin smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Kultivar H. Magnum je vseboval več alfa- in beta-kislin in manj ksantohumola v primerjavi s kultivarjem Aurora. Pri primerjavi HPLC kromatogramov fenolnih spojin listov in storžkov hmelja smo opazili prisotnost nekaterih vrhov, ki so bili specifični samo za etanolne ekstrakte listov oziroma samo za ekstrakte storžkov.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

**DN** Dn  
**DC** UDC 633.791:547.56:577.1(043)=163.6  
**CX** hops/leaves/cones/*Humulus lupulus*/phenolic compounds/alpha-acids/beta-acids/antioxidants/antioxidative properties/DPPH/ferric reducing ability of plasma/HPLC  
**AU** HERCEZI, Mario  
**AA** POKLAR-ULRIH, Nataša (supervisor)/KOŠIR, Iztok Jože (co-advisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)  
**PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
**PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
**PY** 2016  
**TI** ANTIOXIDATIVE CHARACTERISTICS OF HOP EXTRACTS OF DIFFERENT GEOGRAPHICAL ORIGINS AND DIFFERENT CULTIVARS  
**DT** Graduation thesis (university studies)  
**NO** XIII, 41 p., 23 tab., 12 fig., 4 ann., 48 ref.  
**LA** sl  
**AL** sl/en  
**AB** Air dried hop leaves and cones of two cultivars: 'Aurora' (Aurora) and 'Hallertauer Magnum' (H. Magnum) of the year 2009 from Slovenia, Austria, Germany and Czech Republic were used for the analysis. The goal was to determine content and profile of phenolic compounds in ethanol extracts, alfa- and beta-acids, xanthohumol and antioxidative characteristics of the leaves and the cones of both cultivars and different geographical regions. Folin-Ciocalteu method was used to determine total phenolic compounds and the results were expressed in chlorogenic acid equivalents. In general, the cones contained 3- to 8-fold more phenolic compounds than the leaves. The cultivar H. Magnum had more phenolic compounds than Aurora. Antioxidative properties of ethanol extracts were assessed by performing DPPH test and ferric reducing / antioxidative power activity assay. Although both assays are used for determining antioxidative properties, it was shown that for the same sample these two assays provided different results. Alpha- and beta-acids, xanthohumol and fractions of phenolic compounds were analyzed by high performance liquid chromatography. The cultivar H. Magnum contained more alfa- and beta-acids and less xanthohumol than the cultivar Aurora. From the HPLC chromatograms of phenolic compounds specific peaks were noticed in the ethanol extracts of the hop leaves only or in the hop cones only.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 OPIS RASTLINE HMELJ .....	2
2.1.1 Botanika.....	2
2.1.2 Klimatske zahteve za rast .....	2
2.1.3 Morfologija hmelja .....	3
2.1.3.1 Steblo .....	3
2.1.3.2 Listi .....	3
2.1.3.3 Generativni organi .....	3
2.1.3.4 Podzemni deli .....	5
2.2 KULTIVAR AURORA.....	5
2.3 KULTIVAR H. MAGNUM .....	6
2.4 TEHNOLOŠKA ZRELOST .....	6
2.5 UPORABA HMELJA .....	6
2.6 SEKUNDARNI METABOLITI.....	7
2.6.1 Fenolne spojine .....	7
2.6.2 Eterična olja .....	8
2.6.3 Alfa- in beta-kisline .....	9
2.6.4 Ksantohumol .....	10
2.6.5 Vpliv vremena na proizvodnjo sekundarnih metabolitov .....	10

<b>2.6.6 Vpliv vegetacijskega obdobja na količino sekundarnih metabolitov.....</b>	<b>11</b>
<b>2.7 RADIKALI.....</b>	<b>11</b>
<b>2.8 FENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI.....</b>	<b>12</b>
<b>2.9 PODATKI O NEPOSREDNI KONZUMACIJI PIVA IN POSREDNI KONZUMACIJI FENOLNIH SPOJIN.....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.1 Vzorčenje hmeljnih listov in storžkov .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.2 Agrotehnični pogoji rastišč hmelja .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 METODE .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.1 Spektrometrične analize .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Vpliv topila in različne temperature na izkoristek ekstrakcije fenolnih spojin.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3 Priprava ekstraktov.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.4 Določanje fenolnih spojin po Folin-Ciocalteu .....</b>	<b>17</b>
3.2.4.1 Princip.....	17
3.2.4.2 Reagenti .....	17
3.2.4.3 Instrumenti.....	17
3.2.4.4 Priprava umeritvene krivulje za določanje skupnih fenolnih spojin .....	18
3.2.4.5 Določanje skupnih fenolnih spojin v ekstraktih .....	18
<b>3.2.5 DPPH test .....</b>	<b>18</b>
3.2.5.1 Princip.....	18
3.2.5.2 Reagenti .....	19
3.2.5.3 Instrumenti.....	19
3.2.5.4 Izvedba .....	19
<b>3.2.6 Analiza sposobnosti redukcije.....</b>	<b>20</b>
3.2.6.1 Princip.....	20
3.2.6.2 Reagenti .....	20
3.2.6.3 Instrumenti.....	20
3.2.6.4 Izvedba .....	20
<b>3.2.7 HPLC .....</b>	<b>21</b>
3.2.7.1 Princip.....	21
3.2.7.2 Standardi in kemikalije .....	21
3.2.7.3 Instrumenti.....	22
3.2.7.4 Priprava vzorcev za HPLC .....	22
3.2.7.5 Ločba alfa- in beta-kislin ter ksantohumola s HPLC .....	22
3.2.7.6 Ločba fenolnih spojin s HPLC .....	23
3.2.7.7 Kvalitativno in kvantitativno določanje alfa-, beta-kislin, ksantohumola in fenolnih spojin .....	23

<b>4 REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 SKUPNE FENOLNE SPOJINE.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1 Vpliv topila in temperature ekstrakcije na vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktu .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.2 Skupne fenolne spojine v ekstraktih .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 ANTOOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1. Sposobnost lovljenja radikalov DPPH.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.2 Analiza sposobnosti redukcije .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 HPLC ANALIZA .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.1 Alfa- in beta-kisline .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.2 Ksantohumol .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.3 Fenolne spojine .....</b>	<b>33</b>
<b>5 SKLEPI .....</b>	<b>35</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>36</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>38</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Klasifikacija fenolnih spojin (Nestec in sod., 2012).....	8
<b>Preglednica 2:</b> Vsebnost fenolnih spojin v listih različnih kultivarjev hmelja pobranih v dveh različnih časovnih obdobjih leta 2008 (Urgeova in Polivka, 2009)..	11
<b>Preglednica 3:</b> Prikaz konzumacije čistega alkohola zaužitega s pivom in preračunan volumen na 5 % (v/v) pivo (WHO, 2011) .....	13
<b>Preglednica 4:</b> Oznake vzorcev.....	14
<b>Preglednica 5:</b> Kemijska analiza zemlje pobrane leta 2005 (Nemčija), 2006 (Avstrija) in 2013 (Slovenija in Češka) z rastišč hmeljnih rastlin.....	15
<b>Preglednica 6:</b> Gradientni program mobilne faze .....	23
<b>Preglednica 7:</b> Vpliv temperature in ekstrakcijskega topila na masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v ekstraktu .....	25
<b>Preglednica 8:</b> Skupne fenolne spojine, izražene z masno koncentracijo v mg KKE/mL, v ekstraktih iz listov in storžkov dveh kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav (Abram in sod., 2015) .....	26
<b>Preglednica 9:</b> Masa fenolnih spojin, ki v reakcijski zmesi povzroči 50 % zmanjšanje radikala DPPH (Abram in sod., 2015) .....	28
<b>Preglednica 10:</b> Rezultati analize sposobnosti redukcije ekstraktov iz listov in storžkov dveh kultivarjev in štirih držav (Abram in sod., 2015).....	30
<b>Preglednica 11:</b> Vsebnost kohumulona, n + adhumulona in skupnih alfa-kislin (seštevek kohumulona ter n + adhumulona) v zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav.....	32
<b>Preglednica 12:</b> Vsebnost kolupolona, n + adlupulona in skupnih beta-kislin (seštevek kolupulona ter n + adlupulona) v zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav .....	32
<b>Preglednica 13:</b> Vsebnost ksantohumola v etanolnih ekstraktih zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav.....	33
<b>Preglednica 14:</b> S HPLC analizo pridobljene vsebnosti fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav.....	34

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Oblike listov hmelja: 1 - rahlo deljeni, 2 - trikrpati, 3 - petkrpati (Rode in sod., 2002).....	3
<b>Slika 2:</b> Moško socvetje in zgradba moškega cveta (Rode in sod., 2002).....	4
<b>Slika 3:</b> Žensko socvetje: 1 - zunanji videz socvetja, 2 in 3 – par ženskih cvetov na prilstvu (Rode in sod., 2002) .....	4
<b>Slika 4:</b> Podzemni deli hmeljne rastline: 1 - stebelno tkivo s spečimi očesci, 2 - adventivne korenine, 3 - stranski poganjki (tekači), 4 - koreninsko tkivo, 5 - glavne korenine, 6 - odebela glavna korenina z založno funkcijo (Rode in sod., 2002).....	5
<b>Slika 5:</b> Strukturne formule alfa-kislin hmelja: kohumulon (1), humulon (2), adhumulon (3); beta-kislin hmelja: kolupulon (4), lupulon (5), adlupulon (6); (Haseleu in sod., 2009b) .....	10
<b>Slika 6:</b> Strukturna formula ksantohumola (Haseleu in sod., 2009b).....	10
<b>Slika 7:</b> Strukturna formula 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) v obliki radikala in njegova reducirana oblika (DPPH-H) (Molyneux, 2004) .....	19
<b>Slika 8:</b> Shema HPLC sistema (Kupiec, 2004).....	21
<b>Slika 9:</b> Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določanje mase skupnih fenolnih spojin .....	24
<b>Slika 10:</b> Grafični prikaz rezultatov določanja skupnih fenolnih spojin. Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.....	26
<b>Slika 11:</b> Grafični prikaz rezultatov DPPH testa. Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.....	29
<b>Slika 12:</b> Grafični prikaz rezultatov analize sposobnosti redukcije. Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.....	31

## KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov pri določanju skupnih fenolnih spojin
- Priloga A1:** Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja Aurora iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin
- Priloga A2:** Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja H. Magnum iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin
- Priloga A3:** Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja Aurora iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin
- Priloga A4:** Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja H. Magnum iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin
- Priloga B:** Absorbance vzorcev in grafi DPPH testa
- Priloga B1:** Absorbance vzorcev ekstraktov iz listov hmelja kultivarja Aurora dveh paralelk in kontrole za DPPH test
- Priloga B2:** Absorbance vzorcev ekstraktov iz listov hmelja kultivarja H. Magnum dveh paralelk in kontrole pri 517 nm za DPPH test
- Priloga B3:** Absorbance vzorcev ekstraktov iz storžkov hmelja kultivarja Aurora dveh paralelk in kontrole za DPPH test
- Priloga B4:** Absorbance vzorcev ekstraktov iz storžkov hmelja kultivarja H. Magnum dveh paralelk in kontrole za DPPH test
- Priloga B5:** Grafi DPPH testa vzorcev SAL, SML, AAL, AML
- Priloga B6:** Grafi DPPH testa vzorcev NAL, NML, ČAL, ČML
- Priloga B7:** Grafi DPPH testa vzorcev SAS, SMS, AAS, AMS
- Priloga B8:** Grafi DPPH testa vzorcev NAS, NMS, ČAS, ČMS
- Priloga C:** Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev testa analize sposobnosti redukcije
- Priloga C1:** Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja Aurora

- Priloga C2:** Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja H. Magnum
- Priloga C3:** Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja Aurora
- Priloga C4:** Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja H. Magnum
- Priloga C5:** Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev SAL, SML, AAL, AML
- Priloga C6:** Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev NAL, NML, ČAL, ČML
- Priloga C7:** Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev SAS, SMS, AAS, AMS
- Priloga C8:** Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev NAS, NMS, ČAS, ČMS
- Priloga D:** HPLC kromatogrami
- Priloga D1:** HPLC kromatogram alfa- in beta-kislin v ekstraktu vzorca SAS pri 314 nm
- Priloga D2:** HPLC kromatogram ksantohumola v ekstraktu vzorca SAS pri 370 nm
- Priloga D3:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SAL pri 320 nm
- Priloga D4:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AAL pri 320 nm
- Priloga D5:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NAL pri 320 nm
- Priloga D6:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČAL pri 320 nm
- Priloga D7:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SML pri 320 nm
- Priloga D8:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AML pri 320 nm
- Priloga D9:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NML pri 320 nm

**Priloga D10:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČML pri 320 nm

**Priloga D11:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SAS pri 320 nm

**Priloga D12:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AAS pri 320 nm

**Priloga D13:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NAS pri 320 nm

**Priloga D14:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČAS pri 320 nm

**Priloga D15:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SMS pri 320 nm

**Priloga D16:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AMS pri 320 nm

**Priloga D17:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NMS pri 320 nm

**Priloga D18:** HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČMS pri 320 nm

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>A</b>	absorbanca
<b>c</b>	molarna koncentracija spojine
<b>DAD</b>	detektor z diodno matriko (ang. <i>diode array detector</i> )
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
<b>FS</b>	fenolne spojine
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>k</b>	smerni koeficient premice
<b>KHE</b>	ekvivalent ksantohumola
<b>KKE</b>	ekvivalenti klorogenske kisline
<b>I<sub>0</sub></b>	intenziteta vpadne svetlobe
<b>I</b>	intenziteta svetlobnega žarka po prehodu skozi raztopino
<b>ISO 14235</b>	kakovost tal – določanje organskega ogljika z oksidacijo v krom žvepleni kislini
<b>M</b>	molska masa
<b>m</b>	masa
<b>P</b>	površina vrha na kromatogramu
<b>R</b>	faktor razredčitve
<b>R<sup>2</sup></b>	koreacijski faktor regresijske krivulje
<b>UV-Vis</b>	ultravioletno-vidno območje svetlobe (ang. <i>ultraviolet-visible</i> )
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>ε</b>	molski absorpcijski koeficient
<b>γ</b>	masna koncentracija

## 1 UVOD

Hmelj je rastlina, ki jo najprej povežemo z varjenjem piva. Praktično je tudi vsa svetovna pridelava hmelja namenjena pivovarski industriji. Glavne komponente, ki definirajo hmelj kot dodatek pivu so alfa-kisline, fenolne spojine ter eterična olja (Bernotiene in sod., 2004).

Predvsem v zadnjem desetletju ali dveh pa hmelj budi pozornost raziskovalcev s področja farmacije in tudi živilske industrije, ki iščeta nove niše uporabe hmelja in njegovih komponent bolj v prehranskih dopolnilih. V farmaciji se hmelj uporablja predvsem kot pomirjevalo in šele v zadnjem času se je usmerilo veliko raziskav tudi v iskanje drugih zdravilnih lastnosti. Ekstraktom hmelja so tako *in vitro* določili dobre antikancerogene, protivnetne in antioksidativne lastnosti (Krofta in sod., 2008). Za preniliran flavanoid 8, točneje, 8-prenilnaringenin, pa so ugotovili tudi sposobnost vezave na estrogenske receptorje in posledično estrogensko aktivnost, kar naj bi izkoristili pri ženskah v menopavzi, ko se pojavi pomanjkanje endogenega estrogena (Zanolli in Zavatti, 2008).

Rastline vsebujejo fenolne spojine, ki so kemijsko zelo raznolike. Fenolne spojine sintetizirajo vse rastline, vendar sta sestava in količina specifični za vsako posamezno vrsto. Profil fenolnih spojin, kot pravzaprav vseh sekundarnih metabolitov, pa se tudi spreminja glede na vegetacijsko obdobje rastline in zunanje, pedoklimatske pogoje rasti.

Fenolne spojine so znani naravni antioksidanti in so kot taki zanimivi tako za raziskovalce kot industrijo. Čeprav način absorpcije fenolnih spojin iz prebavnega trakta, njihov prenos po telesu in metabolizem še niso povsem raziskani, je dokazana pozitivna korelacija med uživanjem hrane bogate s fenolnimi snovmi in zdravjem, še posebno pri rakavih obolenjih, katerih nastanek povezujejo z radikali in ne reguliranim oksidativnim stresom (Pace Pereira Lima in sod., 2014).

### 1.1 NAMEN NALOGE

Namen diplomskega dela je bil v ekstraktih iz listov in storžkov hmelja sort Aurora in Hallertauer Magnum (H. Magnum) iz štirih držav (Slovenije, Avstrije, Nemčije in Češke) določiti vsebnost fenolnih spojin in primerjati fenolni profil pridobljenih ekstraktov ter njihovo antioksidativno učinkovitost.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Glede na različne biološke funkcije pričakujemo pomembnejšo razliko v vsebnosti in profilu fenolnih spojin v ekstraktih iz listov in storžkov rastline hmelj.
- Vsebnost fenolnih spojin, alfa- in beta-kislin bo odvisna od kultivarja in agrotehniških pogojev rastišča rastline.
- Antioksidativne lastnosti vzorcev bodo odvisne od vsebnosti in profila fenolnih spojin.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OPIS RASTLINE HMELJ

#### 2.1.1 Botanika

Hmelj – *Humulus lupulus* uvrščamo v red kopriv *Urticales* in družino konopljevk *Cannabaceae* (Oset in sod., 2009). V času evolucije sta se razvili dve vrsti: *Humulus lupulus* L. (navaden, večletni hmelj) in *Humulus japonicus* Sieb. et Zucc. (japonski, enoletni hmelj), ki sta danes citogenetsko stabilni, vsaka s svojim osnovnim številom kromosomov (Majer, 2000).

Vrsta *Humulus lupulus* L. je trajna dvodomna rastlina, ovijalka in predstavlja izvorno divji hmelj Evrope in Zahodne Azije. V okviru te vrste se je razvilo več podvrst (subspecies), ki se razlikujejo morfološko in citološko ter uspevajo v različnih predelih:

- evropski hmelj (*Humulus lupulus* L. ssp. *europaeus*)
- novomehiški hmelj (*Humulus lupulus* L. ssp. *neomexicanus*)
- hmelj z listjem srčaste oblike (*Humulus lupulus* ssp. *cordifolius*)

Kljub temu, da je hmelj dvodomna rastlinska vrsta, se občasno pojavljajo tudi enodomne rastline (interseksi) ali celo dvospolni cvetovi (Majer, 2000). Hmelj ima diploidno somatsko število kromosomov enako  $2n = 20$ . Razen diploidov poznamo tudi triploide ( $3n = 30$ ; npr. sorta Celeia) in tetraploide, ki so pri hmelju manj zanimivi (Oset in sod., 2009). Za pridelovanje je primerna le vrsta *Humulus lupulus* L., ki je trajnica. Trajnost gojenega hmelja 10 in več let je omogočena z vsakoletno rezjo (Pavlovič in sod., 2010).

Komercialno vrednost imajo samo ženske rastline, medtem ko se moške rastline uporabljam le za žlahetenje. Zaradi heterozigotne narave hmelja, kot posledice dvodomnosti, ga v pridelovanju razmnožujejo izključno vegetativno, kar omogoča vzdrževanje homogenetske populacije (Majer, 2000). Gospodarsko pomembne so tudi triploidne ženske rastline, za katere je pogosto značilna zelo bujna rast in sterilnost cvetov (Oset in sod., 2009).

#### 2.1.2 Klimatske zahteve za rast

Hmelj potrebuje za svojo optimalno rast skozi celotno sezono  $1700^{\circ}\text{C}$  efektivne temperature (vsota vseh razlik med povprečno dnevno temperaturo (nad  $5^{\circ}\text{C}$ ) in temperaturo praga ki je  $5^{\circ}\text{C}$ ), direktno svetlobo ter dolg dan, tj. vsaj 15 ur. Zahteva veliko vlage in v obdobju rasti potrebuje 500 do 600 mm čim bolj ustrezno razporejenih padavin. Kot posledica dolžine dneva in sezone, je pridelovanje hmelja omejeno na  $35^{\circ} - 55^{\circ}$  geografske dolžine (Pavlovič in sod., 2010)

## 2.1.3 Morfologija hmelja

### 2.1.3.1 Steblo

Steblo je tanko, v začetku zeljasto kasneje pa oleseni oziroma pol oleseni. V višino lahko zraste od 8 do 15 metrov, odvisno od opore. Steblo ima obliko lijane in zelo hitro raste (15 - 20 cm v 24 urah), pri višini 50 cm pa se že začne s krožnimi gibi ovijati in vzpenjati po opori. V preseku je steblo šesterokotno, po površini rebrasto in obraslo z navadnimi in kljukastimi dlačicami, ki mu pomagajo, da se pripenja na oporo. Steblo je razdeljeno na členke (noduse) in internodije, tako da se na vsakem členku razvije par nasprotno postavljenih listov (Kišgeci, 2002).

### 2.1.3.2 Listi

Listi hmelja so postavljeni pravokotno na členke steba, po obodu so nazobčani in dlakavi po površini (Slika 1). Oblika lista je različna (heterofilija) in je odvisna od položaja na steblu. Načeloma dominirajo listi s 5 do 7 režnji, med tem ko se niže na rastlini formirajo listi z 3 do 5 režnji ali listi z obliko srca. Smatra se, da hmelj običajno razvije okoli 600 listov po rastlini. Skupna površina listov ene rastline je tako večja od  $5 \text{ m}^2$  oziroma je površina povprečnega lista od  $80 \text{ do } 90 \text{ cm}^2$  (Kišgeci, 2002).



Slika 1: Oblike listov hmelja: 1 - rahlo deljeni, 2 - trikrpati, 3 - petkrpati (Rode in sod., 2002)

Na spodnji in zgornji strani lista so fine, mehke dlačice. Krožne rumene žlezne dlačice pa so na spodnji strani tako ženskih kot moških listov, nekoliko manj pogosto pa se pojavljajo na stranskih in mladih listih. Relativno število teh žlez je odvisno od sorte (Katsiotis in sod., 1990).

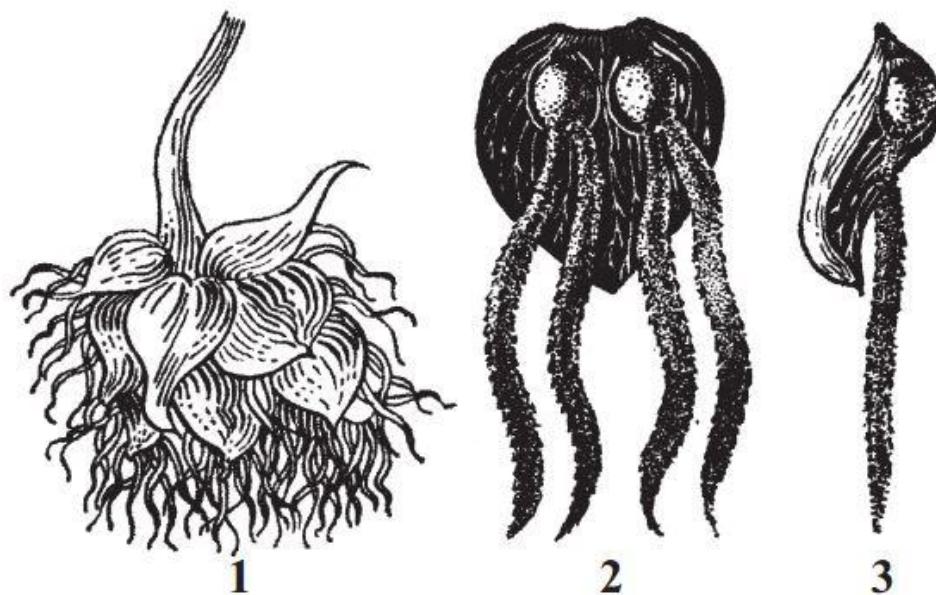
### 2.1.3.3 Generativni organi

Moška in ženska rastlina sta morfološko podobni, razlikujeta se le v socvetju. Moško socvetje je latasto (Slika 2), žensko socvetje (Slika 3) pa je navidezni klas ali storžek. Na

eni rastlini se lahko razvije od 1.500 do 5.000 socvetij in vsako od njih lahko vsebuje od 40 do 60 cvetov. Cvetenje ženskih cvetov traja od 7 do 25, oziroma v povprečju od 10 do 12 dni. Velikost in oblika storžkov je odvisna od sorte in od načina pridelave. Oplojeni storžki so večji in bolj grobo grajeni. Ta karakteristika se še posebej ceni v Angliji in ZDA. Z raznimi študijami je bila ugotovljena pozitivna korelacija med velikostjo storžkov in kotom opore, po kateri raste hmelj. Tako so za sorto Bačka pokazali, da znaša suha masa storžka, ki je rasel na pravokotni opori, 0,14 g, medtem ko je suha masa storžka, ki je rasel na opori pod kotom  $47^\circ$  kar 0,2 g (Kišgeci, 2002).



Slika 2: Moško socvetje in zgradba moškega cveta (Rode in sod., 2002)

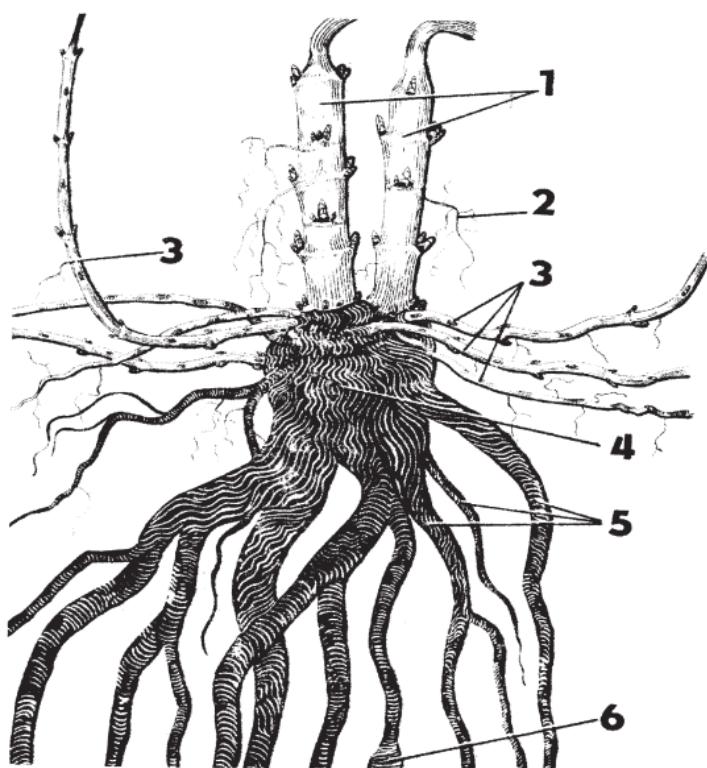


Slika 3: Žensko socvetje: 1 - zunanji videz socvetja, 2 in 3 – par ženskih cvetov na prilistu (Rode in sod., 2002)

Spomladni socvetje ženskih rastlin formira storžke, ki jih sestavljajo krovne luske in pod njimi plodne luske s številnimi lupulinskimi žlezami, v katerih se izloča rumen smolni prah t.i. lupulin (Van Cleemput in sod., 2009).

#### 2.1.3.4 Podzemni deli

Podzemni deli pri zreli hmeljni rastlini so sestavljeni tako iz koreninskega tkiva, kot tkiva steba, in oba skupaj tvorita tako imenovano koreniko ali štor, ki je trajni, večletni del rastline (Slika 4). Poleg sklopa glavnih korenin, ki služijo pritrditvi rastline in shranjevanju zalog, se iz teh razraščajo še vlaknaste korenine, ki služijo privzemu hranil iz okolice. Na spodnjem odebeljenem delu enoletnega steba (trte), ki je še v zemlji pa se razvijejo t.i. nadzemne korenine, ki se razpredajo tik pod površino tal. Novi nadzemni deli se razvijejo iz brstičev na razvejanem stebelnem tkivu, ki leži tik pod površino. Na koreniki pa so tudi poganjki (t.i. »tekači«), ki ne rastejo navzgor pač pa vodoravno tik pod površino in poženejo kot samostojna rastlina na določeni oddaljenosti od matične rastline (Rode in sod., 2002).



Slika 4: Podzemni deli hmeljne rastline: 1 - stebelno tkivo s specimi očesci, 2 - adventivne korenine, 3 - stranski poganjki (tekači), 4 - koreninsko tkivo, 5 - glavne korenine, 6 - odebeljena glavna korenina z založno funkcijo (Rode in sod., 2002)

#### 2.2 KULTIVAR AURORA

Aurora je aromatična sorta, požlahnjena na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), in je potomka angleške sorte Northern Brewer ter slovenske dednine. Prepoznavna je po prijetni hmeljni aromi in grenčici, ki se odražata v zelo dobri pivovarski vrednosti (Katalog ..., 2016). Rastline imajo obliko srednje širokega valja, 60 mm dolge zalistnike, ki odganjajo tudi na spodnjem delu trte. Storžki so povprečju dolgi 25 mm in gosto raščeni. 100 suhih storžkov tehta povprečno 15 g (Šuštar-Vozlič in sod., 2002). Vsebuje 7,2 do 12,6 % alfa-kislin in 0,9 do 1,6 mL/100 g hmelja eteričnih olj. Optimalna

zrelost (tehnološka) za sorto Aurora je od 25. avgusta do 10. septembra. V tem času vsebuje največ alfa-kislin in ima dobro sestavo eteričnih olj in so storžki kompaktni, ne več zeleni a tudi še nimajo odprtih lističev, da bi pri obiranju izpadal lupulin in bi bile s tem izgube. Aurora obdrži primerno zrelost najdlje med vsemi sortami v Sloveniji (Katalog ..., 2016).

### 2.3 KULTIVAR H. MAGNUM

Sorto H. Magum so leta 1983 vzgojili v mestu Hüll v nemškem inštitutu za hmeljarstvo in sicer je H. Magnum križanec ameriške sorte Galena in moške rastline 75/5/3. Med sortami hmelja ima ene večjih storžkov in sicer merijo v dolžino do 35 mm, v povprečju tehta 100 suhih storžkov 37 g. Razmerje med alfa- in beta-kislinami je 2,8. Razmerje med eteričnimi in alfa-kislinami pa je 0,15 (Šuštar-Vozlič in sod., 2002). Kultivar spada z vsebnostjo alfa-kislin od 10,9 do 15,2 % in od 1,8 do 3,8 % eteričnih olj v suhi snovi za eno bolj bogatih z grenčinami. Tehnološko zrelost dosega v Sloveniji med 1. in 5. septembrom in velja za srednjo pozno sorto (Oset in sod., 2009).

### 2.4 TEHNOLOŠKA ZRELOST

Fiziološko je plod zrel, ko je sposoben kalitve, tehnološko zrelost pa določi človek glede na željene parametre (skladiščenje, predelava). V času tehnološke zrelosti dosežejo hmeljni storžki vsebnost grenčinih (alfa-kisline) in aromatičnih sestavin (eterična olja) za sorto značilne vrednosti. Sorte hmelja delimo glede na pričetek tehnološke zrelosti na zgodnje, srednje in pozne sorte. Tehnološka zrelost je primarno odvisna od sorte, nanjo pa vplivajo še vremenski in agrotehniški pogoji v rastni dobi (Oset in sod., 2009). S spremeljanjem dinamike parametrov tehnološke zrelosti (dolžina storžkov, vsebnost vlage v storžkih, masa suhih storžkov in vsebnost alfa-kislin) na več pedološko različnih lokacijah v časovnem intervalu od 3 do 4 dni se lahko zelo zanesljivo napove čas, ko je določena sorta dejansko tehnološko zrela, kar pomeni največji pridelek in najvišjo vsebnost alfa-kislin, ki sicer po relativno kratkem obdobju tehnološke zrelosti začne upadati. V tem času so storžki še zaprti, tako da se lupulin, pri manipuliraju s storžki čim manj izgublja (Uredba..., 2010).

### 2.5 UPORABA HMELJA

Hmelj je zaradi pestrosti svojih sekundarnih metabolitov in njihovih lastnosti zanimiva rastlina predvsem za živilsko, zadnje čase pa tudi za farmacevtsko industrijo. V živilski industriji ga poznamo kot dodatek pri varjenju pijač, prvi zapisi pa omenjajo, da so ga v ta namen uporabljali že Babilonci okoli 2000 let pred našim štetjem (Bernotiene in sod., 2004).

Glavne karakteristike, ki definirajo hmelj kot zanimiv dodatek pivu, so predvsem alfa-kisline (in nekoliko manj beta-kisline) ter eterična olja. Tako hmelj glede na vsebnost alfa-kislin in aroma pogosto delimo v tri skupine:

- a) aromatični hmelj
- b) hmelj z visoko vsebnostjo alfa-kislin
- c) hmelj z lastnostmi zgornjih dveh.

Sestava sekundarnih metabolitov se spreminja med posameznimi sortami. Posušeni storžki hmelja iz skupin b) in c) vsebujejo v suhi snovi 6 – 13 % alfa-kislin ter 0,5 – 2 % eteričnih olj, medtem ko storžki iz skupine a) vsebujejo cca 3 – 7,5 % alfa-kislin. Poleg senzoričnih lastnosti pa ima hmelj vpliv tudi na kemijsko in mikrobiološko stabilnost piva (Bernotiene in sod., 2004).

V farmaciji hmelj sicer še nima tako jasne uporabe kot na primer v živilski industriji, vendar se v je v zadnjem času veliko raziskav usmerilo v iskanje zdravilnih lastnosti. Za ekstrakte hmelja so tako ugotovili dokaj dobre antikancerogene, protivnetne in antioksidativne učinkovitosti. Za preniliran flavanoid 8-prenilnaringenin prisoten v hmelju so ugotovili sposobnost vezave na estrogenske receptorje in posledično estrogensko aktivnost. To lastnost naj bi izkoristili pri ženskah v menopavzi, ko se pojavi pomanjkanje endogenega estrogena. (Zanoli in Zavatti, 2008).

## 2.6 SEKUNDARNI METABOLITI

Sekundarni metaboliti so organske spojine, ki niso vključene v običajno rast in razvoj organizma, v nasprotju s primarnimi metaboliti, ki imajo ključno vlogo pri fotosintezi (za rastline), dihanju in v preživetju vrste. Pomanjkanje sekundarnih metabolitov ne povzroči takojšnje smrti organizma, pač pa za organizem predstavlja dolgoročno tveganje in ranljivost pri preživetju (Agostini-Costa in sod., 2012). Ravno zaradi tega jim stroka pripisuje pomembno vlogo pri obrambi rastline, bodisi pred neugodnimi okolijskimi razmerami, ali pred škodljivci in občasno tudi kot pomoč pri razmnoževanju (privabljajujo oprševalcev). Zato se ti metaboliti sintetizirajo glede na potrebe oziroma stanje, v katerem se rastlina nahaja. Sekundarne metabolite pri rastlinah lahko delimo na več načinov. Eden od njih je razdelitev v tri glavne skupine in sicer na izoprenoide ali terpene, alkaloide in fenolne spojine (Kabera in sod., 2014). Sploh fenolne spojine so nas še posebno zanimale v tem diplomskem delu.

### 2.6.1 Fenolne spojine

Izraz fenolne spojine vključuje razvejano skupino organskih spojin z benzenovim ali aromatskim obročem in z vsaj eno hidroksilno skupino. Tako danes poznamo že vrsto spojin od enostavnih fenolov, do spojin z enim, dvemi ali tremi ogljiki v stranski verigi in pa di- in polimeri itd. (Mann in sod., 1996). Običajno jih klasificiramo po številu ogljikovih atomov v osnovnem skeletu, kot je razvidno v preglednici 1.

Preglednica 1: Klasifikacija fenolnih spojin (Nestec in sod., 2012)

	Osnovni skelet	Snov
Ne-flavonoidi	C <sub>6</sub>	enostavnii fenoli
	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	hidroksibenzojske kisline
	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	acetofenoni, fenilacetati
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	hidroksicimetna kislina, fenilpropani, kumarini, kromoni
	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	naftokinoni
	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	ksantoni
	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	stilbeni, antrakinoni
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	lignini
	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	katehol melanini
	(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub> :glukoza	hidrolizabilni tanini
Flavonoidi	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	lignini
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	flavonoli
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	flavoni
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	flavanoni
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	flavanoli
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	antocianidini
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	izoflavoni
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	biflavonoidi
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	kondenzirani tanini (catehin polimeri, proantocianidini)

Sinteza fenolnih spojin je skoraj ekskluzivno vezana na rastline, toda ravno tip fenolnih spojin je močno odvisen od posamezne skupine kateri rastlina pripada. V dosti manjši meri kot pri rastlinah se sintetizirajo fenolne spojine tudi v nekaterih plesnih in bakterijah (Mann in sod., 1996). Sinteza fenolnih spojin je bila v veliki meri povezana z evolucijskimi prilagoditvami rastlin na kopno. Kljub temu, da ima veliko fenolnih spojin strukturno vlogo v celični steni, pa rastline sintetizirajo tudi številne ne-strukturne fenolne spojine, ki imajo vlogo pri obrambi, trajnosti (npr. lesa), barvi cvetov, vonju in okusu, ali pa so širše znani kot naravni antioksidanti (Dermastia, 2006). V celicah se fenolne spojine v večini primerov nahajajo kot derivati, na primer metil estri, glikozidi, ali pa imajo pripete druge skupine. Nekateri derivati izkazujejo dosti večjo biološko aktivnost kot njene osnovne spojine. Še posebno veliko biološko aktivnost so izkazali prenilni (izoprenska enota s petimi ogljikovimi atomi) derivati fenolnih spojin (Yazaki in sod., 2009).

Po literaturnih podatkih vsebujejo zračno suhi hmeljni storžki 4 – 14 % fenolnih spojin. Njihova vsebnost pa naj bi z zorenjem naraščala. Prav tako obstajajo tudi razlike med aromatičnimi in visoko grenčičnimi sortami. Pri aromatičnih kultivarjih se vsebnost fenolnih spojin v času zorenja veča in potem ostane relativno konstantna, medtem ko pri visokogrenčičnih kultivarjih opažajo zmanjšanje vsebnosti tekom zorenja. Za aromatične kultivarje prav tako velja, da vsebujejo več nizkomolekularnih fenolnih spojin. Med fenolnimi spojinami so količinsko najbolj zastopani prenilflavonoidi, katerih glavnji predstavnik v hmelju je ksantohumol (Čeh in sod., 2007).

## 2.6.2 Eterična olja

Eterična olja v rastlinah so mešanica različnih spojin. Glavni sestavni deli so izoprenske ali terpenske spojine (90 %) in sicer so to povečini monoterpeni, C<sub>10</sub> spojine (sestoje iz dveh izoprenskej enot) in seskviterpeni, C<sub>15</sub> (vsebujejo tri izoprenske enote), poleg tega so tu še

fenilpropanski ( $C_6C_3$ ) derivati, neciklični ogljikovodiki ter enostavne fenolne spojine (Dermastia, 2006).

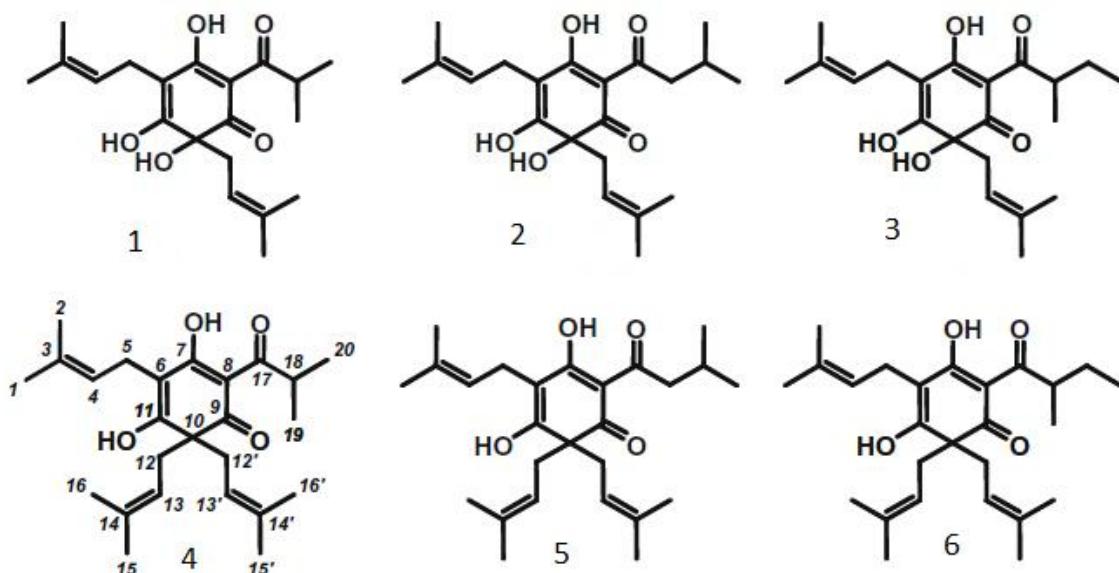
Hmelj so prvotno ocenjevali le glede na vsebnost alfa-kislin in delež kohumulona. Kasneje pa so proizvajalci in pivovarji vse več pozornosti namenili tudi sestavi in količini eteričnih olj. Ta so večji del odgovorna za specifično aroma hmelja. Bolj kot sama količina posameznih eteričnih olj je aroma odvisna od razmerij med spojinami v eteričnih oljih (Kralj in sod., 1991). Količina, sestava in razmerje med posameznimi spojinami v oljih je različna in je pogojena z vegetacijskim obdobjem ter kultivarjem hmelja. Vsebnost eteričnega olja in njegova sestava se začne oblikovati z zapiranjem storžka in vsebnost močno narašča do polne zrelosti storžka. Po tehnološki zrelosti pri nekaterih vrstah hmelja, vsebnost eteričnega olja narašča zaradi vsebnosti mircena, medtem ko vsebnost seskviterpenov (razen farnezena) pada. V posušenih storžkih najdemo približno od 0,5 do 2 % eteričnih olj, medtem ko je njihova vsebnost v listih bistveno manjša (Virant, 2003). Kljub raznolikosti v profilu eteričnih olj najdemo v storžkih dva značilna predstavnika in sicer alfa-humulen in beta-mikren ter ostale spojine, ki se pogosto pojavljajo, vendar v relativno majhnem deležu kot na primer linalol, undekanon-2, geranil acetat, humulen epoksid-2, alfa-selinen (Kralj in sod., 1991). Bernotiene in sodelavci so z analizo eteričnih olj različnih kultivarjev ugotovili določene vzorce, ki so značilni za posamezne tipe sort, in sicer je količina mikrena višja v grenčičnih in manjša v aromatičnih sortah. Obratno pa velja za alfa-humuleni. (Bernotiene in sod., 2004). V listih prevladujeta alfa-humulen in beta-kariofilen, v dosti manjši količini pa se pojavljajo še kadinen, kariofilen, delta-germakren in kadinen. (Katsiotis in sod., 1990). Zanimivo je tudi, da je v listih le okoli 1 % beta-mikrena, med tem ko ga v storžkih najdemo tudi do 60 % (Langezaal, 1992).

### 2.6.3 Alfa- in beta-kisline

Grenke komponente v hmeljnih storžkih delimo v dve skupini in sicer alfa- in beta-kisline (Slika 5) (Haseleu in sod., 2009a). Alfa-kisline vključujejo humulon (molekulska formula  $C_{21}H_{30}O_5$ ) in štiri analoge z enakimi funkcionalnimi skupinami, vendar različnim številom ogljikovih atomov v stranski verigi. Beta-kisline vključujejo lupulon (molekulska formula  $C_{26}H_{38}O_4$ ) in analoge (Bernotiene in sod., 2004). Kemijska struktura je predstavljena v sliki 5.

Alfa- in beta-kisline so v žleznih strukturah (lupulinske žleze), ki jih je veliko v storžkih ženskih rastlin hmelja. Določene sorte hmelja lahko vsebujejo v suhi snovi tudi do 19 % alfa-kislin, to so tako imenovani super alfa oziroma grenčične sorte, med tem ko ostale sorte vsebujejo med 4 – 13 % alfa-kislin (De Keukeleire in sod., 2003).

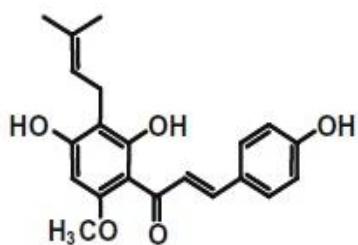
Količina in sestava alfa-kislin je vsaj s pivovarskega vidika še najbolj pomembna, saj pri kuhanju pivine izomerizirajo v izo-alfa-kisline, ki so bolj topne v vodi in bolj grenke kot izvorne spojine. Od tu tudi značilen grenak okus piva (Jaskula-Goiris in Luc De Cooman, 2010).



Slika 5: Strukturne formule alfa-kislinih hemelja: kohumulon (1), humulon (2), adhumulon (3); beta-kislinih hemelja: kolupulon (4), lupulon (5), adlupulon (6); (Haseleu in sod., 2009b)

#### 2.6.4 Ksantohumol

Ksantohumol je strukturno enostaven preniliran derivat halkona, kar pomeni, da je na osnovni odprt skelet flavonoida pripeta prenilna skupina (Slika 6). Ksantohumol se pojavlja le v rastlini hmelja, *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae), kjer je glavni prenilflavonoid v ženskem socvetju (storžku) in predstavlja 80 – 90 % skupnih flavonoidov ter približno 0,1 – 1 % suhe mase storžkov (Yazaki in sod., 2009). Ksantohumol se izloča kot del smole v žleznih trihomih, ki jih najdemo storžkih. Prav tako ga najdemo v trihomih na spodnji strani mladih listov. V smoli je poleg ksantohumola prisotnih še vsaj 13 sorodnih flavonoidov, vendar se ti pojavljajo v 10- do 100-krat manjši koncentraciji v primerjavi s ksantohumolom. Večina flavonoidov vsebuje prosto hidroksilno skupino na mestu 20 in lahko zato izomerizira v ustrezne flavanone kot npr. izoksantohumol, 6-prenilnaringenin in 8-prenilnaringenin (Stevens in Page, 2004).



Slika 6: Strukturna formula ksantohumola (Haseleu in sod., 2009b)

## 2.6.5 Vpliv vremena na proizvodnjo sekundarnih metabolitov

Rast in razvoj rastline je neposredno odvisen od količine padavin, števila sončnih dni, relativne vlage in temperature. To se izraža v kinetiki rasti rastline, času cvetenja, količini in velikosti plodov. Očem skrita pa običajno ostaja celična fiziologija rastline, oziroma

kako se rastlina preko verige presnovnih poti prilagaja bolj ali manj stresnim vremenskim razmeram (Pavlovič in sod., 2012).

Močan vpliv na količino alfa-kislin v storžkih imajo padavine v času cvetenja in nastajanja storžkov. Idealno bi voda sicer morala biti kar se da enakomerno razpoložljiva skozi celotno obdobje rasti. Večja količina sončnih ur pozitivno vpliva na sintezo alfa-kislin, vendar povzroči tudi osušitev zemlje, kar lahko negativno vpliva na razvoj rastline. Pokazalo se je tudi, da je vpliv vremena na sintezo alfa-kislin različen pri različnih sortah. Tako je Pavlovič s sodelavci (2010) ugotovil, da je sinteza alfa-kislin pri sorti Aurora dosti bolj odvisna od vremenskih razmer kot pri sorti H. Magnum (Pavlovič in sod., 2010). Kopecky in Ježek (2007) pa sta dokazala, da je bil v sušnem letu 1996 pridelek hmelja več kot za polovico manjši od onega v letu 1998, ko je bilo padavin v presežku. Vendar pa je bil delež alfa-kislin največji v suhi snovi storžkov prav iz leta 1996 in delež alfa-kislin najmanjši v suhi snovi storžkov iz leta 1998 (Kopecky in Ježek, 2007).

### 2.6.6 Vpliv vegetacijskega obdobja na količino sekundarnih metabolitov

Sestava in količina sekundarnih metabolitov se v rastlinah spreminja tudi skozi vegetacijska obdobja. To sta bolj podrobno raziskovala Urgeova in Polivka (Urgeova in Polivka, 2009), ki sta v listih hmelja različnih kultivarjev iz Piešťany, Slovaška, spremljala vsebnost fenolnih spojin v različnih vegetacijskih obdobjih. Z vzorčenjem listov šestih kultivarjev v mesecu juniju in septembru leta 2008 sta pokazala (razvidno iz preglednice 2), da prihaja pri vsebnosti fenolnih spojin v listih v mesecu juniju (času tik pred cvetenjem rastline) do večjih razlik med posameznimi kultivarji, medtem ko je koncentracija fenolnih spojin v listih v mesecu septembru (po koncu vegetacijskega obdobja) padla in bila precej enaka pri vseh kultivarjih (Urgeova in Polivka, 2009).

Preglednica 2: Vsebnost fenolnih spojin v listih različnih kultivarjev hmelja pobranih v dveh različnih časovnih obdobjih leta 2008 (Urgeova in Polivka, 2009)

Kultivar	Vsebnost fenolnih spojin (mg/g suhe snovi)	
	junij 2008	september 2008
K-31	6,99 ± 0,14	4,53 ± 0,12
K-72	12,48 ± 0,36	3,03 ± 0,09
Bor	14,34 ± 0,15	3,77 ± 0,20
Sládek	12,32 ± 0,22	3,30 ± 0,12
Zlatan	13,38 ± 0,14	3,57 ± 0,11
Premiant	9,50 ± 0,33	4,68 ± 0,06

## 2.7 RADIKALI

Obstaja kar nekaj načinov kako definirati radikale (ang. *free radicals*), vendar je še najširša definicija ta, da je radikal vsaka snov, ki ima enega ali več nesparjenih elektronov. Ta definicija tako vključuje vodikov atom z enim prostim elektronom, večino ionov prehodnih kovin in molekulo kisika. Nekatere definicije radikalov včasih vsebujejo še zahtevo, da morajo biti prosti elektroni v zunanjji (valenčni) lupini, vendar s tem izgubimo kar nekaj ionov prehodnih kovin (Halliwell in Gutteridge, 1990).

Vezi v molekulih se običajno same po sebi ne razdrejo tako, da bi molekula imela nesparjen elektron. Nastanek radikalov je tako v osnovi lahko posledica encimske ali ne-encimske reakcije. Ob posebnih, lahko bi tudi rekli izrednih razmerah, se to v organizmu lahko zgodi zaradi različnih vrst stresa (npr. odziv imunskega sistema), v dihalni verigi, pri presnovi hrane oziroma je to splošna posledica staranja. Zaradi prisotnosti nesparjenega elektrona pa so te snovi izredno reaktivne in so hitro sposobne odvzeti elektron drugim molekulam, ki nato same postanejo nestabilne in tako nadaljujejo reakcijo odvzema elektrona. Zato se radikali sami po sebi, oziroma zaradi verižnih reakcij, ki jih sprožijo in njihovih stranskih produktov, smatrajo kot škodljivi organizmu (Das Sarma in sod., 2010), posebno zaradi delovanja na molekule DNA, proteine in lipide (Pečar in Mravljak, 2015). Navkljub predhodno omenjeni škodljivosti radikalov za organizem pa so reaktivne oblike kisika in reaktivne oblike dušika v dovolj majhni oziroma ustrezni količini, za katero ne vemo katera je, še vedno pomembne za celice in človeka, saj sodelujejo pri obrambnem mehanizmu in imajo fiziološki pomen v medcelični signalizaciji (Sainz in sod., 2012). Prav to je dvojna vloga radikalov, pri določenih opravilih so dobri in koristni, še celo nenadomestljivi, hkrati pa nevarni, če jih je preveč in se pojavljajo tam, kjer to ni potrebno (Pečar in Mravljak, 2012).

Za človeka najbolj pomembne in pogoste skupine radikalov so:

- reaktivne oblike kisika, ki vključujejo superoksidni anion ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidroksilni radikal ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), peroksilni radikal ( $\text{RO}_2^{\cdot}$ ), alkoksilni radikal ( $\text{RO}^{\cdot}$ ), singlet kisika ( ${}^1\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ );
- reaktivne oblike dušika, ki vključujejo dušikov oksid ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), dušikov dioksid ( $\text{NO}_2$ );
- ioni prehodnih kovin (Gutowski in Kowalczyk, 2013).

## 2.8 FENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI

Zelo splošno bi lahko antikoksidante definirali kot vsako snov, ki pomembnejše zavira ali preprečuje oksidacijo substrata. Po osnovnem principu delovanja bi lahko antioksidante delili na skupino, ki preprečuje napad reaktivnih oblik kisika na substrat in na skupino, ki prekine verižne reakcije, običajno z lovljenjem kisikovih radikalov, ki bi sicer nadaljevali verižno reakcijo (Nguyen in sod., 2003).

Znano je, da so fenolne spojine antioksidanti. Njihove antioksidativne lastnosti izhajajo predvsem iz lahko odstranjivega vodika iz -OH skupine na benzenovem obroču, zaradi relativno nizke disociacijske entalpije med kisikom in vodikom v tej skupini. S prenosom vodikovega atoma na peroksilni radikal se ta pretvorí v hidroperoksid, ostane pa tudi ariloksilni radikal, kot je ponazorjeno na spodnji enačbi (Nguyen in sod., 2003).



Ariloksilni radikal nato reagira v različnih sekundarnih reakcijah in sicer lahko:

- reagira s kisikovim radikalom in s tem zaključi nadaljnji proces,
- reagira sam s sabo in se tvori Ar-O-Ar,

- prične novo verigo oksidacije, tako da odvzame vodikov atom iz substrata; t.i. pro- oksidacijski učinek,
- lahko odvzame vodikov atom drugim donorjem vodika in hkrati sinergistično inhibira nadaljnji proces.

Pomembno je, da se na koncu reakcije tvori stabilen produkt in tako zavre nadaljnjo verižno reakcijo nastajanja radikalov. Učinkovitost antioksidanta je tako posredno tudi odvisna h kateri sekundarni reakciji se bo nagibal preostali ariloksilni radikal (Nguyen in sod., 2003).

Fenolne spojine predstavljajo najbolj raznoliko vrsto antioksidantov. Njihov dnevni vnos pri človeku se ocenjuje na 1 g, kar je hkrati približno 10-krat večja količina od zaužitega vitamina C in kar 100-krat večja od vitamina E (Ndhlala in sod., 2010). Čeprav je antioksidativna učinkovitost mnogih fenolnih spojin znana in je v zadnjem času deležna velike pozornosti, je ta aktivnost povečini še vedno omejena na laboratorijske poskuse in vitro, ki izključujejo usodo fenolnih spojin v človeškem telesu. Listi in storžki hmelja sicer niso pomemben vir človeške prehrane, imajo pa antioksidanti ki so prisotni v storžkih veliko vlogo pri pridelavi in skladiščenja piva, saj delujejo kot zaščita pred razvojem nesprejemljivega vonja (Krofta in sod., 2008).

## 2.9 PODATKI O NEPOSREDNI KONZUMACIJI PIVA IN POSREDNI KONZUMACIJI FENOLNIH SPOJIN

Po poročilu Svetovne zdravstvene organizacije o konzumaciji alkohola iz leta 2011 v povprečju vsak prebivalec Slovenije nad 15 let starosti zaužije samo s konzumacijo piva 4,1 litra čistega alkohola. Če v grobem upoštevamo, da se največ konzumira pivo s 5 % (v/v) alkohola pomeni, da povprečni Slovenec star nad 15 let zaužije 82 litrov piva na leto (Global..., 2011). Podatki o konzumaciji piva v nekaterih drugih evropskih državah so zbrani v preglednici 3. Rezultati raziskovalke Lugasi (2003), ki je preučevala skupno količino fenolnih spojin v pivu, so pokazali da evropska piva vsebujejo od 270 mg/L do 470 mg/L fenolnih spojin (Lugasi, 2003). To pomeni da povprečni Slovenec nad 15 let, s prej omenjeno konzumacijo piva, letno zaužije med 22,14 g in 38,54 g fenolnih spojin.

Preglednica 3: Prikaz konzumacije čistega alkohola zaužitega s pivom in preračunan volumen na 5 % (v/v) pivo (WHO, 2011)

Država	Konzumacija alkohola s pivom [L]	Konzumacija 5 % (v/v) piva [L]
Slovenija	4,1	82
Avstrija	6,7	134
Nemčija	6,22	124,4
Češka	8,51	170,2
Hrvaška	4,66	93,2
Italija	1,73	34,6
Francija	2,31	46,2
Švedska	2,6	52
ZDA	4,47	89,4
Avstralija	4,56	91,2
Kitajska	1,5	30

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorčenje hmeljnih listov in storžkov

Za analize smo zbrali v letu 2009 nabrane liste in storžke hmelja kultivarjev Aurora in H. Magnum, štirih geografskih lokacij in sicer Slovenije (Žalec), Avstrije (Leutschach), Nemčije (Hüll) in Češke (Žatec). Listi in storžki so bili pobrani v času tehnološke zrelosti storžkov in sicer v enaki količini (do volumna približno 5 L) iz spodnjega, srednjega in zgornjega dela rastline ter nato premešani, s čemer smo poskusili zagotoviti homogenost in reprezentativnost vzorca za analizo. Listi in storžki so bili sušeni pri temperaturi 50 – 55 °C, dokler niso bili zračno suhi. Do analize so bili shranjeni v papirnati oziroma plastični vreči.

Za lažji prikaz rezultatov smo v nekaterih preglednicah in slikah imena vzorcev (Preglednica 4) skrajšali in uporabili nomenklaturo: (D)ržava – (K)ultivar – (L)isti ali (S)toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali številko 1 oziroma 2.

Preglednica 4: Oznake vzorcev

Država	Kultivar	Listi	Storžki
Slovenija	Aurora	SAL	SAS
	H. Magnum	SML	SMS
Avstrija	Aurora	AAL	AAS
	H. Magnum	AML	AMS
Nemčija	Aurora	NAL	NAS
	H. Magnum	NML	NMS
Češka	Aurora	ČAL	ČAS
	H. Magnum	ČML	ČMS

##### 3.1.2 Agrotehnični pogoji rastišč hmelja

Aurora kultivarji so bili posajeni leta 2005 v Sloveniji, 2003 v Avstriji, 1996 v Nemčiji in 2006 v Češki. H. Magnum kultivarji so bili posajeni leta 2001 v Sloveniji, 2007 v Avstriji, 1999 v Nemčiji in 2006 v Češki.

Rastišče hmelja v Žalcu (Slovenija) je na srednje globoki evtrični rjavi zemlji nad peščeno-gramozno podlago. Zgornji sloj zemlje je teksturno klasificiran kot glina/ilovica oziroma peščena glina/ilovica (srednja do težka zemlja). Zemlja v rastišču Leutschach (Avstrija) je zelo peščeno ilovnata, medtem ko je zemlja v rastišču Hüll (Nemčija) zelo ilovnata. Zemlja v rastišču Žatec (Češka) je lahka peščena ilovica.

Vsebnost humusa na vseh lokacijah je bila dobra, čeravno nekoliko majhna na področju rastišča na Češkem. Vrednosti pH zemlje so bile med 6,0 in 7,2. Vsebnost fosforja je bila najmanjša na avstrijskem rastišču za kultivar Aurora in na Češkem (razred B založenosti s fosforjem), medtem ko je bilo rastišče v Sloveniji in avstrijsko rastišče za kultivar H.

Magnum dobro založeno s fosforjem. Zemlja na slovenskem in nemškem rastišču za kultivar Aurora je vsebovala več fosforja kot ga je sicer potrebno. Rezultati kemijske analize zemlje so za vse lokacije zbrani v preglednici 5.

Preglednica 5: Kemijska analiza zemlje pobrane leta 2005 (Nemčija), 2006 (Avstrija) in 2013 (Slovenija in Češka) z rastišč hmeljnih rastlin

Država	Kultivar	pH	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100 g)	K <sub>2</sub> O (mg/100 g)	Mg (mg/100 g)	Humus (%)
Slovenija	Aurora	7,2	28,0 D	34,6 D	39,3 E	3,7 C
	H. Magnum	6,7	24,1 C	34,8 D	15,9 D	2,6 C
Avstrija	Aurora	6,0	8,9 B	11,9 C	16,2 D	2,0 C
	H. Magnum	6,0	16,6 C	37,1 E	17,4 D	3,0 C
Nemčija	Aurora	6,6	43,0 E	32,0 D	17,0 D	2,4 C
	H. Magnum	6,6	43,0 E	32,0 D	17,0 D	2,4 C
Češka	Aurora	6,8	9,6 B	6,1 A/B	9,8 C	0,5 A
	H. Magnum	6,8	9,6 B	6,1 A/B	9,8 C	0,5 A

Legenda: Črke poleg vrednosti označujejo nivo založenosti zemlje z elementi (P, K, Mg): A, zelo nizek; B, nizek; C, dober, D, prezaložen; E, pretiran. pH, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in K<sub>2</sub>O so bili določeni s CAL metodo, magnezij s CaCl<sub>2</sub> metodo, vsebnost humusa pa z ISO 14235 metodo.

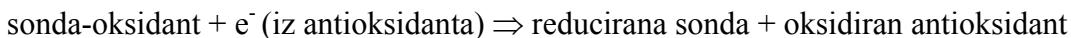
### 3.2 METODE

Za določanje antioksidativnih učinkovitosti vzorcev je na voljo pesta izbira metod. V grobem pa bi jih lahko po reakcijskem mehanizmu razdelili v tri skupine:

- metode, ki temeljijo na reakcija prenosa vodikovega atoma (ang. HAT – Hydrogen Atom Transfer)
- metode, ki temeljijo na reakciji prenosa elektrona (ang. SET – Single Electron Transfer)
- metode, ki združujejo zgoraj omenjena principa (Ndhlala in sod., 2010).

Metode, ki temeljijo na HAT mehanizmu v svojem sistemu vsebujejo sintetični generator radikalov, sonda, ki se oksidira ter antioksidant. Prenos vodika je pomembna stopnja v verižnih reakcijah radikalov, zato se metode, ki temeljijo na prenosu vodika uporabljajo za ugotavljanje učinkovitosti antioksidantov, da prekinejo verižne reakcije pri nastanku novih radikalov.

Metode, ki temeljijo na prenosu elektrona, vključujejo redoks reakcijo, v kateri je oksidant hkrati tudi sonda za spremeljanje reakcije. Metode s prenosom elektrona vsebujejo dve komponenti in sicer oksidant (v vlogi sonde) in antioksidant. Za te metode velja naslednje:



Barvna sprememba se pojavi pri sondi, ko ta odvzame elektron reducentu - antioksidantu. Stopnja barvne spremembe je sorazmerna s koncentracijo antioksidanta v reakcijski zmesi. Končna točka reakcije je dosežena, ko se spremenjanje barve ustavi.

Metode ki smo jih izbrali v našem delu določanja skupnih fenolnih spojin (Folin-Ciocalteu) in določanje antioksidativnih lastnosti (DPPH, analiza sposobnosti redukcije) primarno temeljijo na prenosu elektrona (Ndhala in sod., 2010).

### 3.2.1 Spektrometrične analize

Skupne fenolne spojine, antioksidacijsko učinkovitost vzorcev z 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), sposobnost redukcije ter detekcijo eluiranih spojin pri HPLC smo določevali ali sledili spektrometrično. Kemijske spojine absorbirajo svetlobo (ozioroma elektromagnetno valovanje) in na ta način zmanjšajo intenziteto žarka, s katerim smo presvetlili vzorec. Absorpcijska spektrometrija je osnovana na merjenju spremembe intenzitete elektromagnetnega valovanja. Običajno delimo absorpcijske metode na osnovi vrste uporabljenega elektromagnetnega valovanja. Tako uporabljamo rentgenske žarke, ultravioletno, vidno ali infrardečo svetlobo ter mikrovalovno in radiofrekvenčno valovanje. Valovne dolžine za naše analize so bile v UV-VIS območju, to je od 200 nm do 800 nm.

Kadar žarek monokromatske svetlobe potuje skozi snov, se intenziteta žarka zmanjša zaradi zvrsti, ki absorbirajo določene valovne dolžine. Intenziteta svetlobnega žarka, ki zapusti snov je odvisna od poti, ki jo prepotuje žarek skozi vzorec, koncentracije snovi, ki absorbira svetlobo in v manjši meri tudi od temperature. Relacijo, ki združuje te parametre, imenujemo Beer-Lambertov zakon in je osnova kvantitativne analize v absorpcijski spektrometriji.

$$A = \log I_0/I = \epsilon cl \quad \dots (2)$$

v kateri je A absorbanca,  $I_0$  intenziteta vpadne svetlobe,  $I$  intenziteta svetlobnega žarka, ki zapusti snov,  $\epsilon$  molski absorpcijski koeficient ( $(\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), c molarna koncentracija spojine ( $\text{mol/L}$ ) in l dolžina optične poti (cm).

Sodobnejši spektrometri, to je spektrometri z diodno matriko, imajo namesto monokromatorja polikromator. V tem primeru sta kiveti s preiskovano raztopino in topilom takoj za svetilom. Sledi jima polikromator, ki se od monokromatorja razlikuje po tem, da nima izstopne reže, temveč nekakšen zaslon, grajen iz niza senzorjev, na katere pade v vsakem trenutku »celotna mavrica«, to je žarek svetlobe s široko paleto valovnih dolžin in kot rezultat meritve ne dobimo le podatka o spremembi intenzitete svetlobe neke valovne dolžine, temveč kar celoten spekter preiskovane snovi. Spektrometri z diodno matriko so zelo primerni za HPLC analize, saj omogočajo tridimenzionalno sliko (čas, intenziteta, valovna dolžina) (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

### 3.2.2 Vpliv topila in različne temperaturе na izkoristek ekstrakcije fenolnih spojin

V predposkusu smo preverili katero topilo in temperatura sta najbolj primerna pogoja za ekstrakcijo fenolnih spojin iz listov in storžkov hmelja. Izbrali smo dvoje topil: 96 % etanol in metanol ter ekstrahirali fenolne spojine pri temperaturi 30 °C in 60 °C. Vzorce smo pripravili na enak način kot je opisan v poglavju 3.2.3, s to razliko, da smo spremenjali topilo in temperaturo ekstrakcije. Fenolne spojine smo določili po Folin-Ciocalteu, kot je opisano v poglavju 3.2.4.

### 3.2.3 Priprava ekstraktov

Posušene liste in storžke hmelja smo strli v tarilnici do fine, enakomerne konsistence. Nato smo v 14 mL epruveto z zamaškom prenesli 200 mg homogeniziranih listov oziroma storžkov ter dodali 10 mL 96 % etanola in jo zamašili. Ekstrakcija fenolnih spojin je potekala 24 ur v vodni kopeli (Kambič, Slovenija) s stresanjem vzorcev pri 60 °C. Po končani ekstrakciji smo vzorce centrifugirali v centrifugi Centric 322B (Tehnica, Slovenija) 10 minut pri 3800 obratov/min. Supernatant, približno 8 mL, smo odvzeli za analize, usedlino pa zavrgli. Tako pripravljene ekstrakte smo hranili v hladilniku pri 8 °C oziroma v skrinji, če je bilo potrebno vzorce hraniti dlje kot 3 tedne.

### 3.2.4 Določanje fenolnih spojin po Folin-Ciocalteu

Prvotno sta metodo razvila Folin in Denis, kasneje sta jo izpopolnila Folin in Ciocalteu za določanje aminokisline tirozina (ki vsebuje fenolno skupino) v proteinih. Singleton in Rossi sta potem metodo modificirala še za določanje skupnih fenolnih spojin (Waterman in Mole, 1994).

#### 3.2.4.1 Princip

Določanje skupnih fenolnih spojin po Folin-Ciocalteu metodi temelji na reakciji med Folin-Ciocalteu reagentom, ki je kompleksna mešanica fosfomolibdenske in fosfovolframove kisline, v katerih sta molibden in volfram v 6+ oksidacijskem stanju, z reducirajočimi snovmi, ki imajo hidroksilno skupino. V principu gre za oksidacijsko-reduktionsko reakcijo. Pri redukciji z reducirajočimi agenti, kot s fenolnimi spojinami v alkalnem mediju, se tvori tako imenovano molibdensko modro oziroma molibdenov oksid, pri katerih je srednje oksidacijsko stanje kovin med 5 in 6. Po končani redukciji se razvije modra barva, absorbanco pomerimo spektrometrično proti slepemu vzorcu in preračunamo koncentracijo ali maso fenolnih spojin iz umeritvene krivulje, ki jo pripravimo z galno ali klorogensko kislino.

#### 3.2.4.2 Reagenti

- Folin-Ciocalteujev reagent (Merck, Nemčija), ki smo ga razredčili z deionizirano vodo v razmerju 1 : 2
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20 % raztopina (Merck, Nemčija)
- klorogenska kislina,  $M = 354,31 \text{ g/mol}$  (Sigma, Nemčija)
- 96 % etanol (Merck, Nemčija)

#### 3.2.4.3 Instrumenti

- Tehnica AT 201 (Mettler Toledo, Švica)
- Štoparica
- Avtomatske pipete
- Spektrometer HP 8453 (Hewlett-Packard, ZDA)

- Centrifuga 1: Centric 322B (Tehtnica, Slovenija)
- Vrtinčnik MS3 Basic (IKA, Nemčija)

### 3.2.4.4 Priprava umeritvene krivulje za določanje skupnih fenolnih spojin

Za umeritveno krivuljo smo pripravili 1 mmol/L raztopino klorogenske kisline v 96 % etanolu, iz katere smo pripravili deset raztopin, ki so vsebovale od 0 do 80 µg klorogenske kisline. Za določanje smo pipetirali od 20 do 200 µL raztopine klorogenske kisline in jih razredčili z deionizirano vodo do 2,75 mL. Vsaki raztopini smo dodali še 0,5 mL Folin-Ciocalteujevega reagenta, predhodno razredčenega v razmerju 1:2 z deionizirano vodo, vklopili štoparico, pomešali in po točno petih minutah dodali še 0,5 mL raztopine 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ter zopet pomešali. Vzporedno smo po enakem postopku pripravili tudi slepi vzorec le da smo volumen vzorca nadomestili z etanolom. Po 90 minutah smo pomerili absorbanco pri 746 nm proti slepemu vzorcu ter izrisali graf odvisnosti absorbance od mase klorogenske kisline v reakcijski zmesi. Enačbo tako dobljene premice smo uporabili za določanje mase skupnih fenolnih spojin v vzorcih. Vsako določitev smo izvedli v treh ponovitvah.

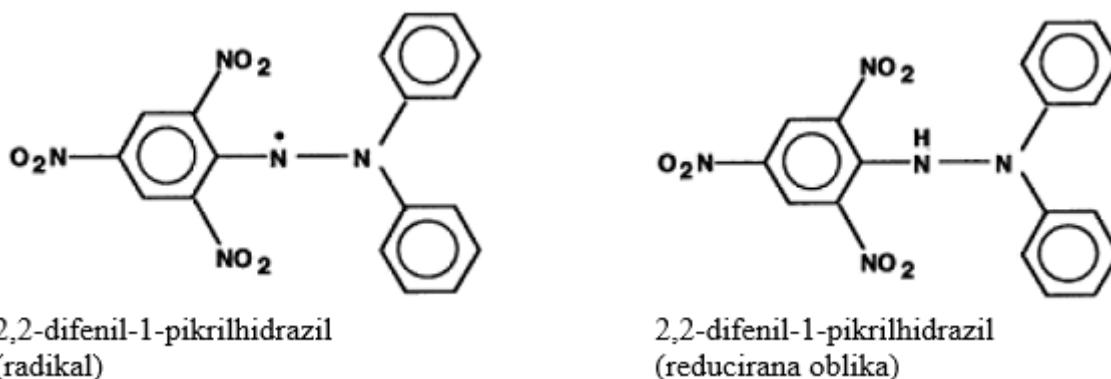
### 3.2.4.5 Določanje skupnih fenolnih spojin v ekstraktih

S predposkusom smo določili, da je potrebno uporabiti pri listih 100 µL ekstrakta, pri storžkih pa približno 25 µL ekstrakta. Te smo potem razredčili z deionizirano vodo do skupnega volumna 2,75 mL in dodali 0,5 mL razredčenega Folin-Ciocalteujevega reagenta, zmes dobro premešali in vklopili štoparico. Po točno petih minutah smo dodali še 0,5 mL 20 % raztopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in po 90 minutah pomerili absorbanco pri 746 nm proti slepemu vzorcu, ki je namesto ekstrakta vseboval etanol. Maso skupnih fenolnih spojin smo izračunali iz umeritvene krivulje in njihovo vsebnost izrazili z masno koncentracijo z ekvivalenti klorogenske kisline (KKE) v mg/mL ekstrakta. Vsako določitev smo opravili v treh ponovitvah.

## 3.2.5 DPPH test

### 3.2.5.1 Princip

Spojina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) je znana kot stabilen radikal z nesparjenim elektronom, ki zaradi delokalizacije nesparjenega elektrona znotraj molekule preprečuje njeno dimerizacijo, kar se sicer zgodi z večino ostalih radikalov. Delokalizacija nesparjenega elektrona je tudi razlog za vijolično barvo in absorbcijo svetlobe pri 517 nm v etanolni raztopini. Ko etanolni raztopini DPPH dodamo snov, ki lahko odda vodikov atom, se DPPH reducira (Slika 7), vijolična barva izginja oziroma prehaja v rumeno. Absorbanco vzorca pomerimo pri 517 nm, vzporedno, pri enaki valovni dolžini, izmerimo absorbanco tudi t.i. kontrolni raztopini, ki je po dogovoru 0,51 mmol/L etanolna raztopina DPPH in ima absorbanco okoli 1. Absorbanca etanolne raztopine DPPH, ki vsebuje antioksidant s časom reakcije pada glede na koncentracijo in učinkovitost snovi z antioksidativnimi lastnostmi. Razliko v absorbancah teh dveh raztopin lahko izrazimo kot odstotek preostalih DPPH radikalov, ali pa kot koncentracijo oziroma množino vzorca, ki je potrebna za 50 % inhibicijo DPPH radikalov (Molyneux, 2004).



Slika 7: Strukturna formula 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) v obliki radikala in njegova reducirana oblika (DPPH-H) (Molyneux, 2004)

### 3.2.5.2 Reagenti

- DPPH 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, M = 394,32 g/mol (Sigma, Nemčija)
- 0,51 mmol/L raztopina DPPH pripravljena s 96 % etanolom (Merck, Nemčija)
- Etanol 96 % etanol (Merck, Nemčija)

### 3.2.5.3 Instrumenti

- Tehtnica AT201 (Mettler Toledo, Švica)
- Magnetna mešala
- Štoparica
- Avtomatske pipete
- Spektrometer HP 8453 (Hewlett-Packard, ZDA)
- Vrtinčnik MS3 Basic (IKA, Nemčija)

### 3.2.5.4 Izvedba

Izhodno 0,51 mmol/L raztopine DPPH smo pripravili tako, da smo s 4,00 mg DPPH raztopili v 20 mL 96 % etanola. Za pripravo kontrolne raztopine smo pipetirali v mikrocentrifugirko 250  $\mu$ L te etanolne raztopine DPPH in dodali 1 mL 96 % etanola.

Pri analizi vzorca ekstrakta smo v mikrocentrifugirko pipetirali 250  $\mu$ L ustrezno razredčenega vzorca, dodali 750  $\mu$ L 96 % etanola in 250  $\mu$ L 0,51 mmol/L raztopine DPPH, vklopili štoparico in pomešali na vrtinčniku. Po točno 15 minutah smo pomerili absorbanco kontrolne raztopine ( $A_k$ ) in vzorca ( $A_{vz}$ ) pri 517 nm. Spektrometer smo predhodno umerili z destilirano vodo. Analize smo izvedli z vsaj tremi razredčitvami vzorca ekstrakta v treh paralelkah.

### 3.2.6 Analiza sposobnosti redukcije

#### 3.2.6.1 Princip

Merjenje sposobnosti oziroma moči redukcije je lahko v neposredni korelaciji z antioksidativno učinkovitostjo vzorca. Analiza temelji na prenosu elektrona, kjer se kot oksidant uporablja železova sol, kalijev heksacianoferat (III). Med analizo sposobnosti redukcije se prisotnost reducentov (antioksidantov) v testiranem vzorcu odraži z redukcijo  $\text{Fe}^{3+}$  fericianidnega kompleksa v  $\text{Fe}^{2+}$  obliko, kar smo spremljali z merjenjem absorbance pri 740 nm in podatke prikazali v grafu odvisnosti absorbance od koncentracije fenolnih spojin (Juntachote in sod., 2006).

#### 3.2.6.2 Reagenti

- fosfatni pufer, pH 6,8
  - 3,38 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nemčija)
  - 3,53 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Nemčija)
  - 1 L  $\text{H}_2\text{O}$
- triklorocenta kislina, 20 % raztopina (Merck, Nemčija)
- kalijev heksacianoferat (III), 1 % raztopina (Merck, Nemčija)
- železov (III) klorid, 1 % raztopina (Carlo Erba Reagenti, Italija)

#### 3.2.6.3 Instrumenti

- Tehnica AT201 (Mettler Toledo, Švica)
- pH meter Seven Easy (Mettler Toledo, Švica)
- Magnetna mešala
- Štoparica
- Avtomatske pipete
- Spektrometer HP 8453 (Hewlett-Packard, ZDA)
- Centrifuga 1: Centric 322B (Tehnica, Slovenija)
- Centrifuga 2: 5415C (Eppendorf, Nemčija)
- Vrtinčnik MS3 Basic (IKA, Nemčija)

#### 3.2.6.4 Izvedba

V epruvete smo odpipetirali 0,5 mL ekstrakta listov oziroma storžkov hmelja in dodali 2,5 mL fosfatnega pufra (pH 6,8), 2,5 mL trikloracetne kisline (20 % raztopina), 2,5 mL kalijevega heksacianoferata (III) (1 % raztopina) in vse dobro premešali. Dobljeno zmes smo centrifugirali 15 minut pri 13.000 obr/min v centrifugi 5415C (Eppendorf, Nemčija). Po centrifugiranju smo prenesli 2,5 mL supernatanta v epruveto, kjer smo dodali 2,5 mL destilirane vode in 1 mL železovega (III) klorida in vklopili štoparico. Po 15 minutah smo pomerili absorbanco pri 740 nm proti slepemu vzorcu, ki je bil pripravljen po enakem postopku, le da smo namesto vzorca dali topilo (96 % etanol). Analize smo izvedli z najmanj tremi različnimi razredčtvami ekstrakta in v treh ponovitvah.

### 3.2.7 HPLC

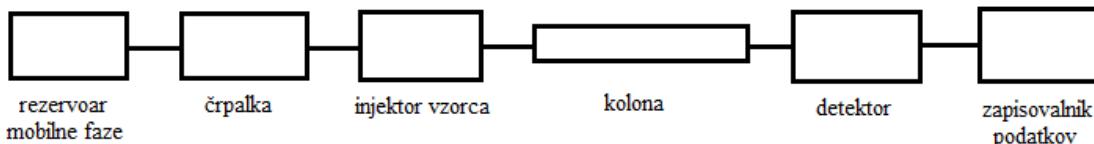
#### 3.2.7.1 Princip

Vse separacijske tehnike temeljijo na fizikalnih lastnostih spojin. Snovi z zelo različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi ločujemo z enostavnimi tehnikami kot so solventna ekstrakcija, destilacija, centrifugiranje, ipd. Za bolj zahtevne ločbe moramo iskati še tako majhne razlike v lastnostih snovi in ustvariti prave pogoje, da bo ločba uspešna. Zato je za uspešno ločbo dobro poznati polarnost, ionski značaj, velikost (maso) in obliko snovi (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Kromatografija je fizikalno kemijska metoda za ločitev tekočih ali plinastih zmesi v prostorsko ločene cone. Osnova kromatografske separacije je v razliki hitrosti migracije posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (plin, tekočina) zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina).

Detektorji zaznajo in merijo količine snovi, ki se eluirajo iz kolone. Meritev poteka kontinuirano, čas zadrževanja na koloni pa je karakterističen za posamezno snov.

Za naš HPLC sistem smo uporabili detektor z diodno matriko (DAD), ki je v principu UV-Vis detektor, le da omogoča tridimenzionalno sliko (čas, intenziteta, valovna dolžina). Ti detektorji so zelo primerni za razvoj novih metod, še bolj pa za določanje nečistoč ter sorodnih spojin, ki se na koloni zelo težko ločijo (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).



Slika 8: Shema HPLC sistema (Kupiec, 2004)

#### 3.2.7.2 Standardi in kemikalije

- ICE-2, hmeljni ekstrakt (Labor Veritas, Švica), standard za določanje alfa- in beta-kislin ter fenolnih spojin z znano sestavo:
  - kohumulon 14,45 %
  - n + adhumulon 34,94 % (to sta analoga humulona: nhumulon in adhomulon, podana kot skupna vsota, saj ju pri HPLC analizi ne moremo ločiti)
  - lupulon 12,92 %
  - n + adlupulon 12,02 % (to sta analoga lupolona: nlupulon in adlupulon, podana kot skupna vsota, saj ju pri HPLC analizi ne moremo ločiti)
- standard za določanje ksantohumola, 90,0 % čistost (Hopsteiner, Nemčija)
- ocetna kislina (Fluka, Nemčija)
- acetonitril (Fluka, Nemčija)

- $H_3PO_4$  (Fluka, Nemčija)
- metanol (Fluka, Nemčija)

### 3.2.7.3 Instrumenti

- avtomatske pipete
- rotavapor B-491 (Büchi, Švica)
- ultrazvočna kopel TK52 (Bandelin-Sonorex, Nemčija)
- HPLC: Agilent 1200 (Agilent, ZDA), detektor DAD (Agilent, ZDA), kvarterna črpalka (Agilent, ZDA)
- kromatografska kolona: Chromolith® Performance, 100 mm x 4,6 mm x 3 µm (Merck, Nemčija)
- kromatografska kolona: Discovery® C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 µm (Supelco, Nemčija)

### 3.2.7.4 Priprava vzorcev za HPLC

Del ekstraktov iz listov in storžkov smo uporabili tudi za HPLC analizo. Ko smo vzorce preliminarno analizirali s HPLC, se je izkazalo da je koncentracija fenolnih spojin in alfa-in beta-kislin premajhna, saj vrhov na kromatogramu skoraj da ni bilo ali pa so bili zelo majhni. Zato smo se odločili, da vzorec petkrat koncentriramo z rotavaporjem B-491 (Büchi, Švica). Pri tem smo uporabili silirane bučke in s tem preprečili sprijemanje posušenega vzorca na steni bučke. V bučko smo odpipetirali 5 mL ekstrakta listov oziroma storžkov hmelja. Z rotavaporjem smo najprej topilo odparili pri temperaturi 40 °C do suhega. Ko smo odparili topilo (etanol), smo v bučko dodali 1 mL metanola, ker je bil nehlapan suhi ostanek hmeljnih smol in fenolnih spojin bolj topen v metanolu kot etanolu. Vse delce, ki so še ostali sprijeti in neraztopljeni, smo razapljalili s pomočjo ultrazvočne kopeli (Bandelin-Sonorex, Nemčija) približno 2 minuti oziroma toliko časa, dokler nismo več opazili sprijetih delcev.

### 3.2.7.5 Ločba alfa- in beta-kislin ter ksantohumola s HPLC

Alfa- in beta-kisline ter ksantohumol smo kvalitativno in kvantitativno določili s HPLC sistemom Agilent 1200. Za ločbo spojin smo uporabili:

Kolona: reverzno fazna kolona Chromolith® Performance, 100 mm x 4,6 mm x 3 µm (Merck, Nemčija)

Mobilna faza: izokratsko, 210 mL  $H_2O$ , 5 mL  $H_3PO_4$  (Fluka, Nemčija), 850 mL metanol (Fluka, Nemčija)

Temperatura kolone: 30 °C

Pretok mobilne faze: 1 mL/min.

Detekcija: DAD (314 nm in 370 nm)

### 3.2.7.6 Ločba fenolnih spojin s HPLC

HPLC analizo fenolnih spojin smo izvedli na HPLC sistemu Agilent 1200 z naslednjo kolono in pogoji:

Kolona: reverzno fazna kolona Discovery® C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 µm.

Mobilna faza:

- A: 25 mL ocetna kislina (Fluka, Nemčija), 975 mL deionizirana voda
- B: 25 mL ocetna kislina (Fluka, Nemčija), 100 mL acetonitril (Fluka, Nemčija), 770 mL deionizirana voda

Temperatura kolone: 30 °C.

Pretok mobilne faze: 1 mL/min

Injekcijski volumen: 5 µL

Detekcija: DAD (320 nm)

Preglednica 6: Gradientni program mobilne faze

Čas (min)	A (delež %)	B (delež %)
0	100	0
70	0	100
75	100	0

### 3.2.7.7 Kvalitativno in kvantitativno določanje alfa-, beta-kislin, ksantohumola in fenolnih spojin

Za kvalitativno in kvantitativno določanje alfa- in beta-kislin ter fenolnih spojin smo uporabili ICE-2 standard z vnaprej znano sestavo. Omenjeni standard je služil kot eksterni standard za kvalitativno in kvantitativno določanje alfa-kislin (kohumulon in n + adhumulon), beta-kislin (kolupulon in n + adlupulon) in zgolj za kvantitativno določanje fenolnih spojin. Za kvalitativno in kvantitativno določanje ksantohumola smo uporabili eksterni standard ksantohumola, 90 % čistosti.

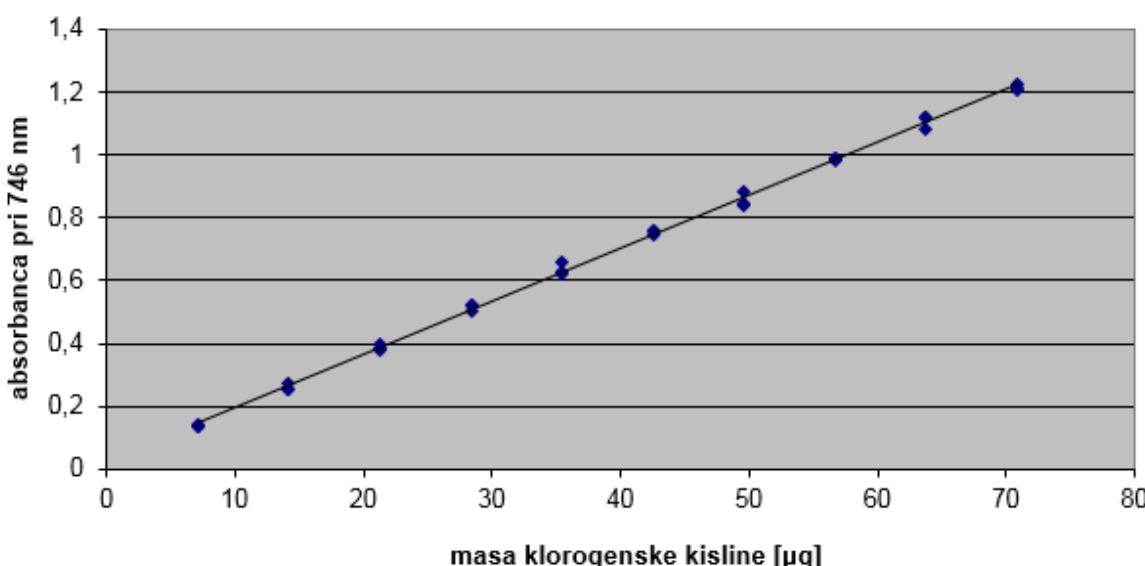
Eluirane snovi smo detektirali z DAD detektorjem. Alfa- in beta-kisline smo določali pri 314 nm, ksantohumol pri 370 nm in fenolne spojine pri 320 nm. Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo omenjene metode uporablajo že dlje časa, tako smo že vnaprej vedeli, kateri retencijski časi in vrhovi pripadajo posameznim komponentam v ICE 2 - hmeljnem ekstraktu. Ker smo poznali tudi točno koncentracijo posamezne komponente v standardu ( $C_S$ ) in površino pripadajočega vrha ( $P_S$ ) ter površino vrha vzorca ( $P_X$ ), smo lahko izračunali tudi koncentracijo določene spojine v vzorcu ( $C_X$ ).

$$C_X = P_X * C_S * P_S^{-1} \quad \dots (3)$$

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 SKUPNE FENOLNE SPOJINE

Skupne fenolne spojine smo določali spektrometrično po Folin-Ciocalteujevi metodi. Za kvantitativno določitev skupnih fenolnih spojin smo naredili umeritveno krivuljo (Slika 9) s klorogensko kislino in pridobljene rezultate izrazili kot ekvivalente masne koncentracije klorogenske kisline v mg KKE/mL ekstrakta iz hmeljnih listov ali storžkov.



Slika 9: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določanje mase skupnih fenolnih spojin

Z metodo najmanjših kvadratov smo narisali regresijsko premico in dobili naslednjo odvisnost absorbance od mase klorogenske kisline in korelacijski faktor:

$$A_{746} = 0,0169 * m_{KK} + 0,0276; R^2 = 0,9986 \quad \dots(4)$$

Kjer je:

$A_{746}$  absorbanca izmerjena pri 746 nm

$m_{KK}$  masa klorogenske kisline [µg]

$R^2$  korelacijski faktor

#### 4.1.1 Vpliv topila in temperature ekstrakcije na vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktu

Preizkus, v katerem smo spremenjali pogoje ekstrakcije smo izvedli, ker nas je zanimal kakšen vpliv imata ta dva parametra na vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu. V literaturi se namreč omenjajo različna topila in njihove kombinacije, so pa to bolj ali manj polarna topila. V literaturi se prav tako zasledijo zelo različne temperature ekstrakcij, od sobne temperature pa tja do 60 °C. Nekateri avtorji odsvetujejo višje temperature zaradi povišane stopnje oksidacije fenolnih spojin tekom 24 urne ekstrakcije, spet drugi omenjajo možnost

termičnega razpada, medtem ko je za nekatere ekstrakcija pri 60 °C standardni postopek. Pri tem se moramo zavedati, da so fenolne spojine kemijo zelo raznolike spojine, da imajo zato različne fizikalne in kemijske lastnosti in se tako razlikujejo tudi po termični stabilnosti. Zato je tudi jasno, da ne obstaja univerzalno topilo, ki bi bilo specifično za tako široko skupino kot so fenolne spojine in da z izbiro topila poskušamo zajeti bodisi čim večji profil, ali pa le zelo ozko skupino snovi, odvisno od namena in cilja raziskav. Da bi preizkusili vpliv topila in temperature smo izvedli preliminaren preizkus in sicer smo za analizo skupnih fenolnih spojin vzeli le slovenske vzorce, spremenjali pa smo pogoje ekstrakcije in sicer, temperaturo (30 °C, 60 °C) in topilo (96 % etanol, metanol). Ker so nas zanimali zgolj preliminarne vrednosti smo opravili le eno serijo meritev. Dobljeni rezultati so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Vpliv temperature in ekstrakcijskega topila na masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v ekstraktu

	30 °C, etanol	60 °C, etanol	60 °C, metanol
	γ (mg KKE/mL)	γ (mg KKE/mL)	γ (mg KKE/mL)
Aurora listi	0,19	0,21	0,44
H. Magnum listi	0,20	0,22	0,58
Aurora storžki	1,21	1,30	1,54
H. Magnum storžki	1,31	1,60	1,38

Razlik med etanolno ekstrakcijo pri temperaturi 30 °C oziroma 60 °C skoraj ni (razen pri storžkih kultivarja H. Magnum), oziroma je masna koncentracija skupnih fenolnih spojin pri 30 °C le malo manjša kot pri 60 °C. Po drugi strani pa je ekstrakcija v metanolu pri 60 °C za več kot dvakrat povečala masno koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktu listov obeh kultivarjev in le približno za 15 % v ekstraktu storžkov kultivarja Aurora, medtem ko je masna koncentracija pri storžkih kultivarja H. Magnum padla za 15 %. Izgleda, da je v listih prisotna kakšna večja skupina fenolnih spojin, ki se dosti bolje ekstrahirira v metanolu kot etanolu.

Iz dobljenih, sicer preliminarnih, rezultatov gre sklepati, da temperatura (vsaj do 60 °C) nima večjega vpliva na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojin medtem ko pa ima, po pričakovanjih, topilo dosti večjo vlogo. Pokazali smo, da če bi za našo ekstrakcijo uporabili metanol, bi vsaj iz listov ekstrahirali dvakrat več fenolnih spojin, z uporabo še drugih topil pa bi verjetno dobili drugačne rezultate. Z izbiro topil bi se spremenjal profil kot tudi količina skupnih ekstrahiranih fenolnih spojin, kar bi se verjetno odrazilo tudi pri antioksidacijskih učinkovitostih. Tako lahko zaključimo, da naši rezultati veljajo le za ozek krog pogojev. Zavedati se moramo tudi, da metanol v živilstvu ni primerno topilo in smo zato raje izbrali etanol in s tem sledili standardni industrijski praksi.

#### 4.1.2 Skupne fenolne spojine v ekstraktih

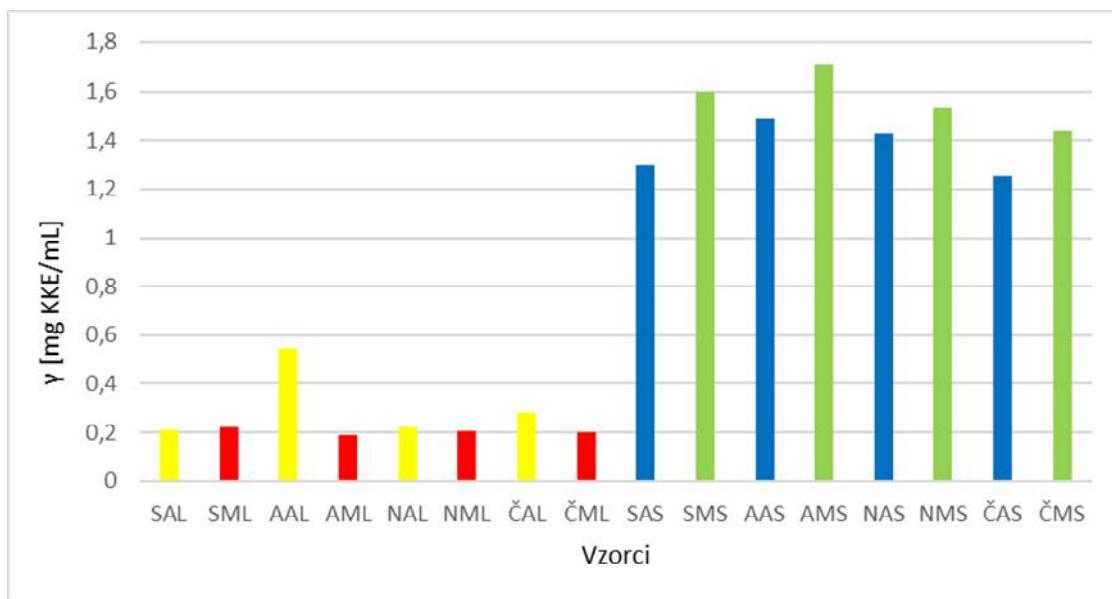
V letu 2009 smo zbrali osem vzorcev listov in storžkov hmelja dveh kultivarjev (Aurora in H. Magnum) na štirih lokacijah v štirih državah (Slovenija, Avstrija, Nemčija in Češka). Iz vsakega vzorca smo pripravili po dve ekstrakciji fenolnih spojin z etanolem in dobljene

ekstrakte uporabili za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v treh ponovitvah za vsak vzorec. Dobljene rezultate smo izrazili z masno koncentracijo v mg KKE/mL v preglednici 8, sliki 10 in v prilogah A1 - A4.

Preglednica 8: Skupne fenolne spojine, izražene z masno koncentracijo v mg KKE/mL, v ekstraktih iz listov in storžkov dveh kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav (Abram in sod., 2015)

Vzorec	$\gamma$ (mg KKE/mL)	Vzorec	$\gamma$ (mg KKE/mL)
SAL1	0,213 ± 0,005	SAS1	1,299 ± 0,016
SML1	0,223 ± 0,007	SMS1	1,599 ± 0,020
AAL1	0,542 ± 0,018	AAS1	1,486 ± 0,002
AML1	0,192 ± 0,010	AMS1	1,705 ± 0,016
NAL1	0,222 ± 0,006	NAS1	1,428 ± 0,020
NML1	0,207 ± 0,006	NMS1	1,533 ± 0,049
ČAL1	0,282 ± 0,004	ČAS1	1,255 ± 0,017
ČML1	0,199 ± 0,010	ČMS1	1,440 ± 0,023

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Rezultati so povprečne vrednosti ± standardna deviacija.



Slika 10: Grafični prikaz rezultatov določanja skupnih fenolnih spojin. Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.

Znano je, da Folin-Ciocalteujev reagent reagira ne samo s fenolnimi spojinami, pač tudi z vrsto ostalih spojin, kot so askorbinska kislina, ogljikovi hidrati, aromatski amini, organske kisline, proteini, železov sulfat, kalijev nitrat, kalijev fosfat in manganov sulfat (Ndhlala in sod., 2010). Kljub relativno dolgemu seznamu snovi, ki prav tako reagirajo s Folin-Ciocalteujevim reagentom je omenjena metoda praktično edina, s katero lahko hitro, enostavno in poceni določimo vsebnost fenolnih spojin.

Pri določanju skupnih fenolnih spojin smo ugotovili naslednje. Najbolj očitna razlika v masnih koncentracijah se pojavi med ekstrakti listov in storžkov, saj smo v storžkih določili od 3- do 8-krat večjo masno koncentracijo fenolnih spojin kot v listih. Pri listih je imel največ skupnih fenolnih spojin ekstrakt avstrijske Aurore (0,542 mg KKE/mL), najmanj pa avstrijski H. Magnum (0,192 mg KKE/mL). Največjo masno koncentracijo

fenolnih spojin v storžkih je vseboval ekstrakt avstrijskega H. Magnuma (1,705 mg KKE/mL), najmanjšo pa ekstrakt češke Aurore (1,255 mg KKE/mL). Kar je zanimivo pri skupnih fenolnih spojinah v ekstraktih listov avstrijske Aurore je, da je ta skoraj 2,5-krat večja od masnih koncentracij fenolnih spojin ostalih vzorcev listnih ekstraktov ne glede na kultivar in lokacijo. Čeprav so med koncentracijami ekstraktov storžkov določene razlike, vzorca storžkov, ki bi tako izstopal nad povprečjem ni prepoznati. Iz preglednice 8 lahko vidimo, da storžki kultivarja H. Magnum vsebujejo v grobem 15 % več fenolnih spojin kot storžki kultivarja Aurora. Kljub razlikam tako vzorci listov kot storžkov znotraj posameznega kultivarja z različnih lokacij izkazujejo kar dobro uniformnost v masni koncentraciji fenolnih spojin. Takšni rezultati analiz pravzaprav ne presenečajo, saj so bili vzorci pobrani v tehnološki zrelosti storžkov in morajo že po definiciji tehnološke zrelosti ustrezati zastavljenim parametrom, kar rezultira v relativni uniformiranoosti vzorcev, čeprav se ve, da rastišče in klimatski pogoji vplivajo na vsebnost fenolnih spojin v rastlinah (Kacjan-Maršić in sod., 2011).

## 4.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV

### 4.2.1. Sposobnost lovljenja radikalov DPPH

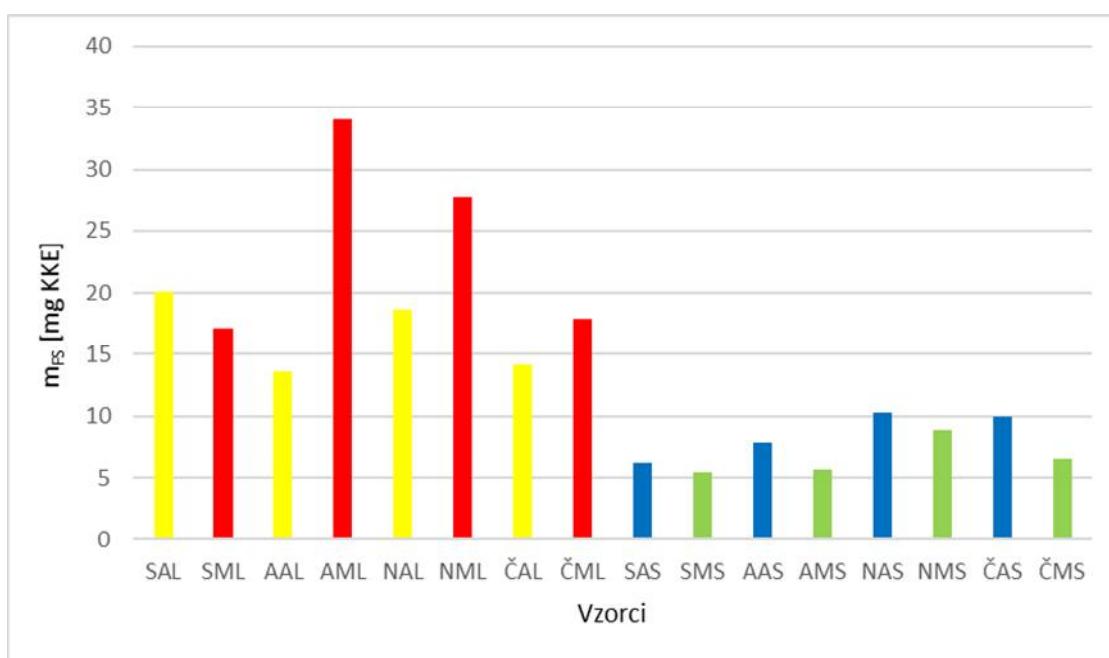
Z uporabo stabilnega radikala DPPH smo določali antioksidativne sposobnosti ekstraktov listov in storžkov hmelja kultivarjev Aurora in H. Magnum vzgojenih v Sloveniji, Avstriji, Nemčiji, Češki. Zanimala nas je masa fenolnih spojin, katera povzroči 50 % zmanjšanje radikala DPPH v 15 minutah.

Za izračun količine fenolnih spojin smo najprej iz vrednosti  $A_{vz}$  izračunali  $\Delta A = A_k - A_{vz}$  in še  $\Delta A/A_k$ . Potem smo narisali graf odvisnosti  $\Delta A/A_k$  od faktorja razredčitve (R) ekstrakta. Iz dobljene premice smo lahko določili razredčitev in potem posredno preko izhodiščne masne koncentracije fenolnih spojin v vzorcu (Priloge A1 - A4) ter znanega volumena (250  $\mu\text{L}$ ) izračunali še maso fenolnih spojin v reakcijski zmesi, ki je ustrezala  $\Delta A/A_k = 0,5$  oziroma je predstavljala 50 % zmanjšanje stabilnega radikala DPPH. Dobljeni rezultati so zbrani v preglednici 9 in sliki 11. Absorbance vzorcev (vsaj tri razredčitve in tri ponovitve) in kontrolnih raztopin pa so prikazane v prilogah B1 - B4, grafi odvisnosti  $\Delta A/A_k$  od razredčitve pa so prikazani v prilogah B5 - B8.

Preglednica 9: Masa fenolnih spojin, ki v reakcijski zmesi povzroči 50 % zmanjšanje radikala DPPH (Abram in sod., 2015)

Vzorec	$m_{FS}$ (mg KKE)	$m_{FS}$ (mg KKE) povprečna
SAL1	20,3	$20,1 \pm 0,4$
SAL2	19,8	
SML1	17,0	$17,1 \pm 0,1$
SML2	17,2	
AAL1	13,6	$13,7 \pm 0,1$
AAL2	13,7	
AML1	33,6	$34,1 \pm 0,6$
AML2	34,5	
NAL1	19,6	$18,6 \pm 1,4$
NAL2	17,6	
NML1	30,5	$27,8 \pm 3,9$
NML2	25,0	
ČAL1	14,4	$14,2 \pm 0,3$
ČAL2	14,0	
ČML1	17,5	$17,9 \pm 0,5$
ČML2	18,2	
SAS1	6,2	$6,2 \pm 0,0$
SAS2	6,2	
SMS1	5,4	$5,4 \pm 0,0$
SMS2	5,4	
AAS1	7,6	$7,8 \pm 0,2$
AAS2	7,9	
AMS1	5,7	$5,7 \pm 0,0$
AMS2	5,7	
NAS1	10,8	$10,3 \pm 0,8$
NAS2	9,7	
NMS1	8,6	$8,9 \pm 0,4$
NMS2	9,1	
ČAS1	9,9	$10,0 \pm 0,1$
ČAS2	10,0	
ČMS1	6,3	$6,5 \pm 0,3$
ČMS2	6,7	

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $m_{FS}$  je masa fenolnih spojin, medtem ko je  $m_{FS}$  povprečna vrednost dveh paralelk  $\pm$  standardna deviacija.



Slika 11: Grafični prikaz rezultatov DPPH testa. Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.

Z interpretacijo podatkov v preglednici 9, kjer manjše vrednosti predstavljajo boljšo, večje pa slabšo sposobnost lovljenja radikala DPPH in posledično antioksidativnimi lastnostmi lahko sklepamo naslednje.

Najbolj očitna razlika v sposobnosti lovljenja radikala DPPH se je pokazala med ekstrakti listov in storžkov. Pri ekstraktih listov smo za 50 % zmanjšanje radikala DPPH znotraj istega časovnega okvirja potrebovali doli večjo količino fenolnih spojin, kot bi ga za enak učinek dosegli z nekajkrat manjšo maso fenolnih spojin iz ekstraktov storžkov. Pomembno je vedeti, da so rezultati DPPH analize odvisni tako od koncentracije fenolnih spojin v ekstraktih kot tudi profila tako fenolnih in drugih spojin, ki so antioksidanti. Iz dobljenih rezultatov, na podlagi analize DPPH, je mogoče sklepati, da so v ekstraktih storžkov prisotni bolj učinkoviti antioksidanti kot v ekstraktih listov hmelja. Posledično lahko zaključimo, da obstajajo razlike v vrsti fenolnih spojin v listih in storžkih hmelja. Med ekstrakti listov kultivarja Aurora in H. Magnum se pojavljajo določene razlike in sicer so listi kultivarja H. Magnum v povprečju izkazali nekoliko slabšo sposobnost lovljenja radikalov kot ekstrakti listov kultivarja Aurora, kjer sta bila najbolj učinkovita vzorca iz Avstrije in Češke.

Če primerjamo vzorce storžkov, opazimo, da so ekstrakti storžkov kultivarja H. Magnum izkazali boljšo sposobnost lovljenja radikala DPPH kot storžki kultivarja Aurora.

#### 4.2.2 Analiza sposobnosti redukcije

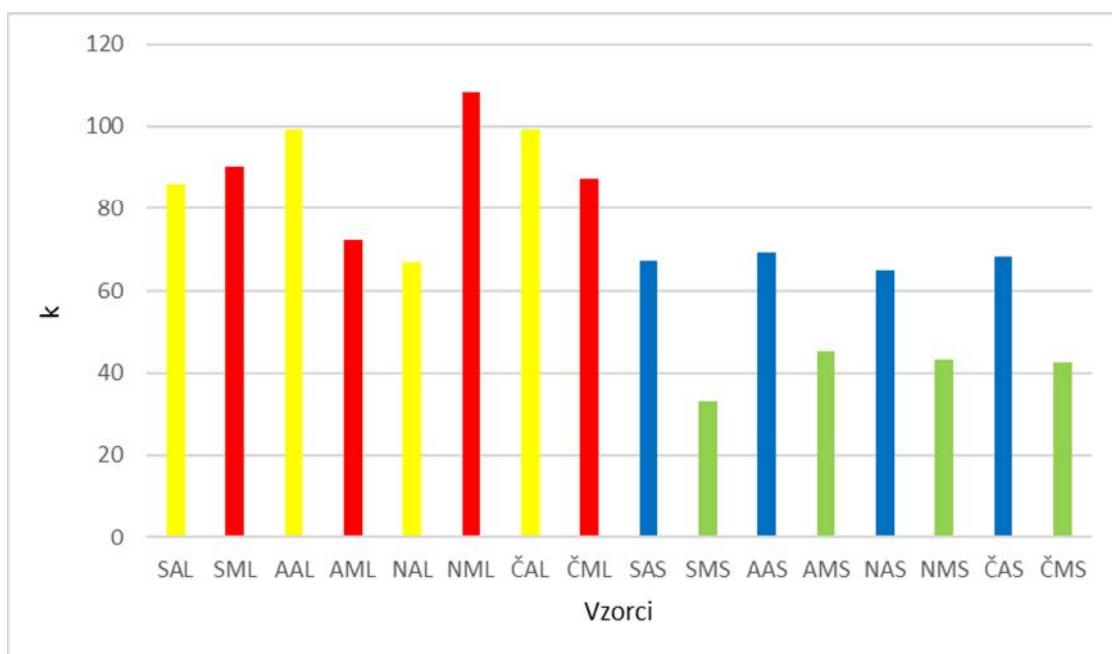
Analizo sposobnosti redukcije smo izvedli, da bi ocenili redukcijsko sposobnost ekstraktov in s tem njihove antioksidativne sposobnosti. Iz izmerjenih absorbanc A1, A2, A3, treh različnih razredčitev ekstraktov listov ali storžkov in znanih masnih koncentracij fenolnih spojin v reakcijski zmesi ( $\gamma_{FS}$ ) (podatki so zbrani v prilogah C1 - C4) smo z metodo

najmanjših kvadratov narisali graf odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin (priloge C5 - C8) in določili naklon premice za vsak posamezen vzorec. Večji kot je naklon premice ( $k$ ) večjo redukcijsko oziroma antioksidativno učinkovitost ima vzorec (Klančnik in sod., 2009). Dobljeni rezultati so prikazani v preglednici 10 in sliki 12.

Preglednica 10: Rezultati analize sposobnosti redukcije ekstraktov iz listov in storžkov dveh kultivarjev in štirih držav (Abram in sod., 2015)

Vzorec	Naklon premice	Vzorec	Naklon premice		
SAL1	86,2	$86,1 \pm 0,1$	SAS1	63,0	$67,2 \pm 5,9$
SAL2	86,1		SAS2	71,3	
SML1	88,9	$90,3 \pm 2,0$	SMS1	29,8	$33,2 \pm 4,8$
SML2	91,8		SMS2	36,6	
AAL1	100,9	$99,1 \pm 2,5$	AAS1	70,6	$69,2 \pm 2,1$
AAL2	97,4		AAS2	67,7	
AML1	69,8	$72,4 \pm 3,6$	AMS1	45,6	$45,1 \pm 0,8$
AML2	74,9		AMS2	44,5	
NAL1	63,6	$67,0 \pm 4,8$	NAS1	66,1	$64,9 \pm 1,7$
NAL2	70,3		NAS2	63,7	
NML1	92,0	$108,2 \pm 22,9$	NMS1	41,1	$43,2 \pm 3,0$
NML2	124,4		NMS2	45,3	
ČAL1	103,2	$99,3 \pm 5,5$	ČAS1	67,1	$68,1 \pm 1,5$
ČAL2	95,4		ČAS2	69,2	
ČML1	83,2	$87,3 \pm 5,8$	ČMS1	40,1	$42,5 \pm 3,4$
ČML2	91,4		ČMS2	45,0	

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $m_{FS}$  je masa fenolnih spojin, medtem ko je naklon premic povprečna vrednost dveh paralelk  $\pm$  standardna deviacija



Slika 12: Grafični prikaz rezultatov analize sposobnosti redukcije. Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.

Razlike v sposobnosti redukcije so se pojavljale na vseh nivojih. Najbolj opazna razlika se pojavi ponovno med ekstrakti listov in storžkov, vendar so se tokrat presenetljivo, v nasprotju z rezultati iz analize DPPH, za najboljše reducente pokazali ekstrakti listov in ne storžkov.

Med kultivarjem Aurora in H. Magnum je prvi izkazal večjo redukcijsko moč v ekstraktih storžkov in sicer v vzorcih vseh držav. Tako lahko sklepamo, da je ta lastnost pogojena s kultivarjem. Slednjega ne moremo trditi za hmeljne liste, saj so rezultati analize vzorcev listov obeh kultivarjev iz držav Češke in Slovenije dokaj podobni ter le vzorec kultivarja Aurora iz Avstrije kažejo znatno večjo sposobnost redukcije kot vzorec kultivarja H. Magnum iz istega geografskega porekla. Sta pa rezultata sposobnosti redukcije vzorcev listov kultivarja Aurora in H. Magnum iz Nemčije zelo zanimiva. Vzorec listov kultivarja Aurora iz Nemčije izkazuje najmanjšo moč redukcije tako znotraj kultivarja kot v primerjavi s kultivarji H. Magnum različnih geografskih poreklov. Listi kultivarja H. Magnum iz Nemčije pa izkazujejo največjo moč redukcije tako znotraj kultivarja, kot v primerjavi s kultivarji H. Magnum različnih geografskih poreklov, kot tudi v primerjavi s storžki obeh kultivarjev.

Pri vzorcih storžkov je tudi zanimivo, da so znotraj posameznega kultivarja vrednosti sposobnosti redukcije zelo podobne, ne glede na geografsko poreklo (izjema je le vzorec kultivarja H. Magnum iz Slovenije). Glede na to da so bili storžki pobrani v tehnološki zrelosti, bi lahko relativno uniformnost rezultatov povezali s tem parametrom. To pa ne moremo trditi za vzorce listov, kjer prihaja znotraj posameznega kultivarja do dosti večjih razlik med vzorci različnih geografskih poreklov.

#### 4.3 HPLC ANALIZA

Za izvedbo HPLC analize smo se odločili, ker nas je zanimal profil fenolnih spojin, kot tudi količina alfa-, beta-kislin in ksantohumola. Predpostavka je bila, da bi ti podatki bili v podporo analizam antioksidativnih sposobnosti ekstraktov in bi prispevali k razlagi antioksidativne učinkovitosti.

##### 4.3.1 Alfa- in beta-kisline

Alfa- in beta-kisline ter ksantohumol smo določevali le v ekstraktih storžkov, saj je po izkušnjah raziskovalcev iz Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije njihova vsebnost v ekstraktih listov zanemarljiva. Rezultati so podani v g snovi/100 g zračno suhega vzorca v preglednicah 11 in 12. Vzorčni kromatogram je podan kot priloga D1.

Preglednica 11: Vsebnost kohumulona, n + adhumulona in skupnih alfa-kislin (seštevek kohumulona ter n + adhumulona) v zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav

Kultivar	Spojina	Slovenija	Avstrija	Nemčija	Češka
		(g spojine/100 g zračno suhega vzorca)			
Aurora storžki	kohumulon	0,49	0,59	0,54	0,38
	n + adhumulon	1,95	2,39	2,02	1,72
	skupne alfa-kisline	2,44	2,98	2,56	2,10
H. Magnum storžki	kohumulon	0,78	0,76	0,82	0,59
	n + adhumulon	3,01	2,60	2,60	1,83
	skupne alfa-kisline	3,79	3,36	3,42	2,42

Preglednica 12: Vsebnost kolupolona, n + adlupulona in skupnih beta-kislin (seštevek kolupulona ter n + adlupulona) v zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav

Kultivar	Spojina	Slovenija	Avstrija	Nemčija	Češka
		(g spojine/100 g zračno suhega vzorca)			
Aurora storžki	kolupulon	0,30	0,24	0,29	0,20
	n + adlupulon	0,41	0,40	0,30	0,22
	skupne beta-kisline	0,71	0,64	0,59	0,42
H. Magnum storžki	kolupulon	0,37	0,23	0,37	0,29
	n + adlupulon	0,60	0,45	0,49	0,35
	skupne beta-kisline	0,97	0,68	0,86	0,64

Iz priloženih preglednic 11 in 12, v katerih so vsebnosti alfa- in beta-kislin je možno opaziti določene podobnosti in razlike med različnimi kultivarji in državami. V ekstraktih kultivarja H. Magnum smo določili več alfa- in beta-kislin kot v ekstraktih kultivarja Aurora. To je bilo tudi pričakovati, saj velja H. Magnum za bolj greničen kultivar, medtem ko je Aurora bolj aromatičen in posledično vsebuje nekoliko manj alfa- in beta-kislin. Zanimiva je tudi primerjava rezultatov HPLC analiz alfa- in beta-kislin obeh kultivarjev med posameznimi državami. Tako so imeli med vsemi državami ekstrakti vzorcev iz Češke najmanjšo vsebnost alfa- in beta-kislin pri obeh kultivarjih. Nasprotno pa so imeli največ alfa- in beta-kislin, med vzorci različnih geografskih porekla (z izjemo alfa-kislin v ekstraktu kultivarja Aurora), prav slovenski vzorci. Ti rezultati odražajo stanje enega leta - 2009 in štirih različnih, geografsko majhnih področij oziroma rastišč.

#### 4.3.2 Ksantohumol

Ksantohumol smo določevali le v etanolnih ekstraktih storžkov, saj je po izkušnjah raziskovalcev iz Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije njihova koncentracija v ekstraktih listov zanemarljiva. Rezultati so podani kot masna koncentracija v mg KHE/L ekstrakta v preglednici 13. Vzorčni kromatogrami je podan v prilogi D2.

Preglednica 13: Vsebnost ksantohumola v etanolnih ekstraktih zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav

Kultivar	Spojina	Slovenija	Avstrija	Nemčija	Češka
		γ (mg KHE/L)			
Aurora storžki	Ksantohumol	0,20	0,28	0,27	0,30
H. Magnum storžki		0,20	0,17	0,19	0,16

Če primerjamo vsebnost ksantohumola v ekstraktih storžkov kultivarjev Aurora in H. Magnum znotraj posamezne države opazimo, da obstajajo značilne razlike med kultivarjem. Z izjemo slovenskih vzorcev, kjer sta vsebnosti ksantohumola enaki, je vsebnost ksantohumola od 1,5- do 2-krat večja v ekstraktih Aurore iz drugih držav.

Iz preglednice rezultatov je prav tako razvidno, da je, z izjemo vzorcev iz Slovenije, vsebnost ksantohumola v ekstraktih znotraj istega kultivarja dokaj podobna ne glede na državo porekla.

#### 4.3.3 Fenolne spojine

Zaenkrat smo žeeli s kromatografsko ločbo videti samo eluacijski profil fenolnih spojin v ekstraktih iz listov in jih primerjati z onim od storžkov. Fenolnih spojin nismo identificirali, poiskali smo le značilne vrhove, ki so se pojavljali v kromatogramih in izračunali koncentracijo fenolnih spojin. Koncentracijo fenolnih spojin smo izračunali na podoben način kot prej alfa- in beta-kisline ter ksantohumol, le da tu nismo kvalitativno identificirali vsak vrh posebej.

Ker nismo poznali niti katera fenolna spojina se je eluirala z določenim retencijskim časom, niti njene molske mase, smo koncentracijo fenolnih spojin izrazili kot ekvivalent ksantohumola, katerega koncentracijo in molsko maso smo poznali. Podobna metoda izražanja koncentracije polimerov se pogosto uporablja, ko sestava polimerne snovi ni natančno definirana ali znana. Zato pri izračunu, če se le da uporabimo osnovno komponento polimera, tisto katera je zastopana v večini, ima podobno molsko maso oziroma tisto, ki pokaže najbolj ustrezni odziv na detektorju. Ker poznamo molsko maso in koncentracijo izbrane snovi, v našem primeru ksantohumol, uporabimo slednjo kot eksterni standard za izračun koncentracije fenolnih spojin in rezultat podamo kot masno koncentracijo v mg KHE/L ekstrakta. Rezultati so podani v preglednici 14, kromatogrami pa v prilogah D3 - D18.

Preglednica 14: S HPLC analizo pridobljene vsebnosti fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih zračno suhih storžkih kultivarjev Aurora in H. Magnum iz štirih držav

$t_R$ [min]	5,5	7,1	9,6	11,6	15,9	20-21	21,7	23	28,3	30,3	31,8	35,1	41,9
$\gamma$ (mg KHE/L)													
Aurora list													
Slovenija	0,35	0,66	0,00	1,61	23,16	1,90	2,41	11,29	6,48	14,45	14,45	6,49	9,59
Avstria	0,51	0,39	0,00	4,55	267,5	7,02	15,85	46,98	27,85	75,94	117,3	4,61	15,50
Nemčija	1,06	1,34	0,00	4,22	58,31	4,62	7,58	22,76	14,00	40,64	31,13	6,67	10,97
Češka	0,40	1,03	0,00	3,1	25,71	4,29	3,93	17,49	2,98	12,63	21,99	2,85	3,13
H. Magnum listi													
Slovenija	0,46	0,47	0,00	6,86	32,56	4,00	7,78	18,47	14,89	24,95	17,55	7,98	17,25
Avstria	1,35	3,67	0,00	4,82	40,29	2,99	3,59	18,18	18,12	38,76	23,68	4,97	17,04
Nemčija	0,35	0,60	0,00	2,80	16,30	1,73	1,63	10,56	4,23	11,17	10,05	2,67	5,77
Češka	0,30	1,03	0,00	5,11	11,54	2,20	2,54	10,20	2,89	8,73	5,16	1,19	8,20
Aurora storžki													
Slovenija	0,00	0,00	1,65	3,00	42,2	1,54	7,19	23,99	6,23	24,87	10,72	0,00	22,71
Avstria	0,00	0,00	1,42	2,21	107,2	1,73	12,93	54,09	7,57	34,16	24,81	0,00	35,45
Nemčija	0,00	0,00	1,33	1,70	89,91	1,82	13,43	49,69	5,69	26,04	22,48	0,00	28,64
Češka	0,00	0,00	1,28	1,82	44,72	2,15	12,25	41,25	5,73	24,80	10,95	0,00	26,85
H. Magnum storžki													
Slovenija	0,00	0,00	1,42	1,08	6,19	1,82	2,4	7,25	3,59	6,01	1,08	0,00	23,76
Avstria	0,00	0,00	1,30	2,28	45,54	1,42	5,15	21,83	18,44	20,41	9,87	0,00	19,22
Nemčija	0,00	0,00	1,44	0,92	12,33	3,43	3,51	10,73	7,69	6,83	3,60	0,00	20,25
Češka	0,00	0,00	1,70	1,77	10,4	1,27	3,86	13,95	3,44	6,13	1,78	0,00	16,92

HPLC analizo etanolnih ekstraktov smo opravili, saj so nas zanimale tako kvalitativne kot kvantitativne podobnosti in razlike med posameznimi kromatogrami ekstraktov iz listov in storžkov hmelja različnih kultivarjev ter geografskih lokacij. V kromatogramih smo opazili največje razlike pri retencijskih časih 5,5; 7,1; 9,6; 11,6; 20-21; 21,7; 23; 28,3; 30,3; 31,8; 35,1 in 41,9 min. Tako v kromatogramih ekstraktov iz listov katerih koli lokacij ni bilo vrhov pri retencijskem času 9,6 min, v ekstraktih iz storžkov pa ne vrhov pri 5,5, 7,1 in 35,1 min.

Od vzorcev sta predvsem zanimiva ekstrakta listov in storžkov kultivarja Aurora iz Avstrije, kjer se pri vrhu ob 15,9 min in nekoliko manj a kljub temu izstopajoče pri vrhu 30,3 in 31,8 pojavlja zelo visoka vrednost napram ostalim kultivarjem iz drugih držav.

Iz preglednice 14 je moč videti tudi značilne razlike v vsebnosti posameznih fenolnih spojin storžkov kultivarja Aurora in H. Magnum. Ne glede na lokacijo se pri večini retencijskih časov izkaže, da vsebujejo storžki kultivarja Aurora več fenolnih spojin kot storžki kultivarja H. Magnum. Take razlike se ne kažejo pri ekstraktih listov. Zanimivo je tudi, da se znotraj skupine vzorcev listov oziroma vzorcev storžkov pojavljajo vrhovi ob enakih retencijskih časih, kar priča o tem, da se sintetizirajo enaki sekundarni metaboliti. Kot je pa razvidno iz različnih površin pod vrhovi, pa je količina le teh odvisna od posameznega kultivarja in rastišča.

## 5 SKLEPI

Na podlagi opravljenih analiz in pridobljenih rezultatov sklepamo da:

- je količina ekstrahiranih fenolnih spojin predvsem odvisna od izbire topila za ekstrakcijo,
- je količina fenolnih spojin v etanolnih ekstraktih iz listov in storžkov hmelja odvisna od kultivarja in agrotehniških pogojev rastišča rastline,
- etanolni ekstrakti storžkov hmelja vsebujejo več fenolnih spojin kot listi,
- vsebujejo storžki kultivarja H. Magnum več fenolnih spojin kot storžki kultivarja Aurora,
- so ekstrakti listov hmelja slabši lovilci radikalov DPPH kot ekstrakti storžkov,
- imajo ekstrakti listov boljšo sposobnost redukcije kot ekstrakti storžkov hmelja
- so bile antioksidativne lastnosti vzorcev bolj odvisne od dela rastline (listi ali storžki) kot pa od kultivarja ali geografskega porekla,
- vsebuje kultivar H. Magnum več alfa- in beta-kislin kot kultivar Aurora,
- vsebuje kultivar Aurora več ksantohumola od kultivarja H. Magnum,
- so v storžkih hmelja prisotne nekatere fenolne spojine, ki jih ni v listih in obratno.

## 6 POVZETEK

Hmelj oziroma bolj natančno hmeljev storžek se trenutno skoraj ekskluzivno uporablja za živilsko industrijo kot dodatek pri varjenju piva, kjer z organoleptičnega vidika pomembno prispeva k vonju in okusu, s kemijskega vidika pa k stabilnosti piva. Poleg že uveljavljene uporabe v živilski industriji pa raziskovalci poskušajo odkriti uporabo tudi za druge industrije, predvsem farmacevtsko. Kljub trenutni uporabi storžkov zaradi pomembne vsebnosti alfa- in beta-kislin, ksantohumola ter fenolnih spojin, pri pridelavi hmelja kot stranski in neizkoriščen produkt ostane še cela rastlina.

V diplomskem delu nas je v etanolnih ekstraktih storžkov in listov hmelja, kultivarjev Aurora in H. Magnum iz držav Slovenija, Avstrija, Nemčija in Češka zanimala vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidativna lastnost ekstraktov (kar smo pomerili z DPPH testom in analizo sposobnosti redukcije), vsebnost alfa- in beta kislin, ksantohumola ter HPLC kromatogrami fenolnih spojin.

Skupne fenolne spojine smo določali po Folin-Ciocalteu, kjer se je v reakcijski zmesi prisotnost reducirajočih agentov (fenolnih spojin) odrazila v spremembi barve, to pa smo spektrometrično pomerili pri 746 nm. Rezultate smo izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline. Listi so vsebovali od 3- do 8-krat manj fenolnih spojin. Med ekstrakti storžkov je največ fenolnih spojin vseboval vzorec AMS z 1,705 mg KKE/mL pri listih pa vzorec AAL z 0,542 mg KKE/mL.

Pri testu DPPH smo spektrometrično pri 517 nm zasledovali spremembo barve v reakcijski zmesi, kjer se je DPPH kot stabilen radikal ob prisotnosti reducentov (antioksidantov) reduciral v DPPH-H. Rezultat smo izrazili kot tisto maso fenolnih spojin, katera v reakcijski zmesi povzroči 50 % zmanjšanje DPPH radikala. Najslabšo antioksidacijsko lastnost je izkazal vzorec AML z rezultatom 34,1 mg KKE, najboljšo pa vzorec SMS s 5,4 mg KKE.

Analizo sposobnosti redukcije smo izvedli, da bi ocenili redukcijsko sposobnost ekstraktov in s tem posredno njihove antioksidativne lastnosti. Pri analizi sposobnosti redukcije se prisotnost reducentov (antioksidantov) odrazi z redukcijo  $\text{Fe}^{3+}$  fericianidnega kompleksa v  $\text{Fe}^{2+}$  obliko, kar smo spremljali z merjenjem absorbance pri 740 nm in podatke prikazali v grafu odvisnosti absorbance od koncentracije fenolnih. Večji kot je bil naklon premice boljše redukcijske sposobnosti je imel ekstrakt. Najboljšo moč redukcije je pokazal vzorec NML z vrednostjo 108,2, najslabšo pa SMS z vrednostjo 33,2.

Pri HPLC analizi smo določevali vsebnost alfa- in beta-kislin, ksantohumola in profil fenolnih spojin. Največ alfa- kot tudi beta-kislin je vseboval vzorec SMS in sicer 3,79 g/100 g zračno suhega vzorca alfa-kislin in 0,97 g/100 g zračno suhega vzorca beta-kislin. Največ ksantohumola pa je imel vzorec ČAS in sicer 0,30 mg KHE/L.

Posamezne vrhove v HPLC analizi fenolnih spojin smo ovrednotili le kvantitativno in rezultate podali kot ekvivalente ksantohumola (mg KHE/L), med tem ko jih identificirati nismo mogli saj nismo imeli ustreznih standardov. Pri pregledu kromatogramov ekstraktov

listov smo ugotovili odsotnost vrha pri retencijskem času 9,6 min, v ekstraktih iz storžkov pa odsotnost vrhov pri 5,5, 7,1 in 35,1 min in sicer neodvisno od lokacije ali kultivarja.

## 7 VIRI

- Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Smole Možina S., Košir, I.J., Kač, M., Demšar L., Poklar Ulrich N. 2015. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*, 64: 124-134
- Agostini-Costa T.S., Vieira R.F., Bizzo H.R., Silveira D., Gimenes M.A., 2012. Secondary metabolites, V: Chromatography and its applications. Dhanarasu S. (ed.). Rijeka, InTech: 131-164
- Bernotiene G., Nivinskiene O., Butkiene R., Mockute D. 2004. Chemical composition of essential oils of hops *Humulus lupulus* L. growing wild in Aukštaitija. *Chemija*, 15, 2: 31-36
- Čeh B., Kač M., Košir I.J., Veronika A. 2007. Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 989-1000
- Das Sarma A., Rahaman Mallick A., Ghosh A.K. 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1, 3: 185-192
- De Keukeleire J., Ooms G., Heyerick A., Roldan-Ruiz I., Van Bockstaele E., De Keukeleire D. 2003. Formation and accumulation of  $\alpha$ -acids,  $\beta$ -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 15: 4436-4441
- Dermastia M. 2006. Sekundarni metaboliti. Zbornik projektov problemsko orientiranega učenja študentov prvega letnika študija Biologija 2005/2006. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 5-7
- Gutowski M., Kowalczyk S. 2013. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 60, 1: 1-16
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85
- Haseleu G., Intelmann D., Hofmann T. 2009a. Identification and RP-HPLC-ESI-MS/MS quantitation of bitter-tasting  $\beta$ -acid transformation products in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7480-7489
- Haseleu G., Intelmann D., Hofmann T. 2009b. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from  $\beta$ -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chemistry*, 116: 71-81

- Jaskula-Goiris B., Luc De Cooman G.A. 2010. Hop alpha-acids isomerisation and utilisation: an experimental review. *Cerevisia*, 35: 57-70
- Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S., Bauer F. 2006. The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Science*, 72: 446-456
- Kabera J.N., Semana E., Mussa A.R., He X. 2014. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 377-392
- Kacjan-Maršić N., Demšar L., Abram, V., Novak, M., Vidrih, R. 2011. Quality parameters and total phenolic content in tomato fruits regarding cultivar and microclimatic conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35: 185-194
- Katalog slovenskih sort hmelja. 2016. Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije: 12  
[http://www.ihps.si//index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=22&Itemid=55](http://www.ihps.si//index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=22&Itemid=55) (13.6.2016)
- Katsiotis S.T., Langezaal C.R., Scheffer J.J.C. 1990. Composition of the essential oils from leaves of various *Humulus lupulus* L. cultivars. *Flavor and Fragrance Journal*, 5: 97-100
- Kišgeci J. 2002. Hmelj. Beograd, Partenon: 32-41
- Kopecky J., Ježek J. 2007. Influence of weather conditions and irrigation on yield and quality of hops. V: International hop growers' convention. Proceedings of the scientific commission. Tettnang, Germany, 24 – 28 June 2007. Wolnzach, Hop Research Center Hüll: 118-118
- Kralj D., Zupanec J., Vasilij D., Kralj S., Pšeničnik J. 1991. Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. *Journal of the Institute of Brewing*, 97: 197-206
- Krofta K., Mikyška A., Haškova D. 2008. Antioxidant characteristics of hops and hop products. *Journal of the Institute of Brewing*, 114: 160-166
- Kupiec T. 2004. Quality-control analytical methods: high-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8, 3: 223-227
- Langezaal C.R. 1992. A pharmacognostical study of hop, *Humulus lupulus* L. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 15, 4: 178-179
- Lugasi A. 2003. Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Alimentaria*, 32, 2: 181-192

Majer D. 2000. Vodni stres pri hmeljnih rastlinah ali O pomenu vode za življenje rastlin, o stresu pri rastlinah, o namakanju in o vplivu vodnega stresa na hmeljne rastline. Žalec, Hmeljarsko združenje Slovenije: 17-18

Mann J., Davidson R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V., Harborne J.B. 1994. Natural products: their chemistry and biological significance. Essex, Longman Scientific & Technical: 363-363

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26, 2: 211-219

Ndhlala A.R., Moyo M., Van Staden J. 2010. Natural antioxidant: Fascinating or mythical biomolecules? Molecules, 15: 6905-6930

Nestec S., Lallemand L., McCarthy A. 2012. Production of chlorogenic and dactylifric acid species. Patent application WO2012126789A1: 3-3

Nguyen M.T., Kryachko E.S., Vanquickenborne L.G. 2003. General and theoretical aspects of phenols. V: The chemistry of phenols. Rappoport Z. (ed.). West Sussex, John Wiley & Sons Ltd: 139-142

Oset M., Čerenak A., Radišek S. 2009. Opisna sortna lista za hmelj 2009. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gospodarstvo in prehrano RS: 6-6

Pace Pereira Lima P., Vianello F., Correa C.R., Arnoux da Silva Campos R., Galhardo Borguini M. 2014. Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. Food and Nutrition Sciences, 5: 1065-1082

Pavlovič V., Čerenak A., Pavlovič M., Košir I.J., Rozman Č., Bohanec M., Čeh B., Naglič B. 2010. Modelling of quality prediction for hops (*Humulus lupulus L.*) in relation to meteorological variables. V: BALWOIS 2010: Conference on water observation and information system for decision support. Ohrid, Macedonia. 25 - 29 May 2010. Morell M. (ed.). Skopje. Balwois: 5  
[http://balwois.com/proceedings/?k9\\_balwois\\_conference=All&k9\\_balwois\\_topics=All&k9\\_balwois\\_country=All&k9\\_balwois\\_author=6800](http://balwois.com/proceedings/?k9_balwois_conference=All&k9_balwois_topics=All&k9_balwois_country=All&k9_balwois_author=6800) (12.5.2012)

Pavlovič V., Pavlovic M., Čerenak A., Košir I.J., Čeh B., Rozman C., Turk J., Pazek K., Krofta K., Gregorič G. 2012. Environment and weather influence on quality and market value of hops. Planet, Soil and Environment, 58, 4: 155-160

Pečar S., Mravljak J. 2015. Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 12-12

Rode J., Zmrzlak M., Kovačevič M. 2002. Hmeljna rastlina. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 21-30

- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalno kemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-50, 88-113
- Sainz R.M., Lombo F., Mayo J.C. 2012. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers*, 4: 442-474
- Stevens J.F., Page J.E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65: 1317-1330
- Šuštar-Vozlič J., Čerenak A., Ferant N. 2002. Žlahnenje hmelja in hmeljni kultivarji. V: Priročnik za hmeljarje. Majer D. (ur.). Žalec, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo: 31-50
- Uredba o spremembah in dopolnitvah uredbe o ureditvi trga s hmeljem. 2010. Uradni list Republike Slovenije, št. 20/60: 9155-9166
- Urgeova E., Polivka L. 2009. Secondary metabolites with antibacterial effects from leaves of different hop cultivars during vegetal periods. *Nova Biotechnologica*, 9, 3: 327-332
- Van Cleemput M., Cattoor K., De Boscher K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A. 2009. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *Journal of Natural Products*, 72: 1220-1230
- Virant M. 2003. Kemijske značilnosti na rastlini naravno posušenega hmelja in njihov vpliv na kakovost piva. Zbornik Biotehniške fakultete Univerza v Ljubljani, Kmetijstvo (Zootehnika), 82: 157-166
- Waterman P., Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 66-103
- WHO. 2011. Global status report on alcohol and health. Geneva, World Health Organization: 273-277
- Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y. 2009. Prenylation of aromatic compound, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*, 70: 1739-1745
- Zanol P., Zavatti, M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 3: 383-396

## ZAHVALA

Iskrena zahvala gre recenzentki prof. dr. Veroniki Abram ne le za strokovni pregled diplome pač pa tudi za vztrajno spodbudo tekom nastanka tega dela.

Prof. dr. Nataši Poklar Ulrich se zahvaljujem za mentorstvo in nasvete.

Hvala tudi somentorju doc. dr. Iztoku Jožetu Koširju ter Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije za izvedene HPLC analize.

Posebna zahvala pa gre moji družini, še posebno mami tako za moralno kot finančno podporo tekom študija.

## PRILOGE

Priloga A: Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov pri določanju skupnih fenolnih spojin

Priloga A1: Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja Aurora iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin

		Aurora listi		
		1	2	3
Slovenija 1	A 746 nm	0,3968	0,3779	0,3742
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,218	0,207	0,205
Slovenija 2	A 746 nm	0,3853	0,3935	0,3925
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,212	0,217	0,216
Avstrija 1	A 746 nm	0,9190	0,9038	0,9151
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,527	0,518	0,525
Avstrija 2	A 746 nm	0,9760	0,9708	0,9740
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,561	0,558	0,560
Nemčija 1	A 746 nm	0,4231	0,4028	0,4042
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,234	0,222	0,223
Nemčija 2	A 746 nm	0,3939	0,3984	0,3949
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,217	0,219	0,217
Češka 1	A 746 nm	0,4944	0,5024	0,5026
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,276	0,281	0,281
Češka 2	A 746 nm	0,5139	0,5077	0,5051
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,288	0,284	0,283

Priloga A2: Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja H. Magnum iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin

		H. Magnum listi		
		1	2	3
Slovenija 1	A 746 nm	0,3920	0,3868	0,4125
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,216	0,213	0,228
Slovenija 2	A 746 nm	0,4172	0,4047	0,4165
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,231	0,223	0,230
Avstrija 1	A 746 nm	0,3880	0,3460	0,3552
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,213	0,188	0,194
Avstrija 2	A 746 nm	0,3342	0,3469	0,3410
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,181	0,189	0,185
Nemčija 1	A 746 nm	0,3675	0,3682	0,3686
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,201	0,202	0,202
Nemčija 2	A 746 nm	0,3787	0,3826	0,3956
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,208	0,210	0,218
Češka 1	A 746 nm	0,3820	0,3746	0,3790
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,210	0,205	0,208
Češka 2	A 746 nm	0,3469	0,3585	0,3381
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	0,189	0,196	0,184

Priloga A3: Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja Aurora iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin

		Aurora storžki		
		1	2	3
Slovenija 1	A 746 nm	0,5728	0,5785	0,5836
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,291	1,304	1,316
Slovenija 2	A 746 nm	0,5851	0,5734	0,5655
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,320	1,292	1,273
Avstria 1	A 746 nm	0,6550	0,6394	0,6425
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,485	1,448	1,455
Avstria 2	A 746 nm	0,6653	0,6646	0,6587
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,509	1,508	1,494
Nemčija 1	A 746 nm	0,6225	0,6394	0,6443
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,408	1,448	1,460
Nemčija 2	A 746 nm	0,6224	0,6251	0,6315
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,408	1,414	1,429
Češka 1	A 746 nm	0,5552	0,5523	0,5730
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,249	1,242	1,291
Češka 2	A 746 nm	0,5561	0,5580	0,5520
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,251	1,255	1,241

Priloga A4: Absorbance in masne koncentracije vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja H. Magnum iz štirih držav pri določanju skupnih fenolnih spojin

		H. Magnum storžki		
		1	2	3
Slovenija 1	A 746 nm	0,7145	0,7129	0,7064
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,626	1,622	1,607
Slovenija 2	A 746 nm	0,6955	0,6922	0,6983
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,581	1,573	1,588
Avstria 1	A 746 nm	0,7499	0,7456	0,7501
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,709	1,699	1,710
Avstria 2	A 746 nm	0,7591	0,7471	0,7357
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,731	1,703	1,676
Nemčija 1	A 746 nm	0,6735	0,6848	0,6767
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,529	1,555	1,536
Nemčija 2	A 746 nm	0,7118	0,6618	0,6446
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,619	1,501	1,460
Češka 1	A 746 nm	0,6405	0,6357	0,6212
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,451	1,439	1,405
Češka 2	A 746 nm	0,6414	0,6269	0,6507
	$\gamma$ [mg KKE/mL]	1,453	1,419	1,475

Priloga B: Absorbance vzorcev in grafi DPPH testa

Priloga B1: Absorbance vzorcev ekstraktov iz listov hmelja kultivarja Aurora dveh paralelki in kontrole za DPPH test

Vzorci	R	A1	A2	A3	A <sub>kontrola</sub>
SAL1	2	0,41909	0,42270	0,42051	1,04760
	3	0,63711	0,62202	0,61306	
	5	0,80308	0,77939	0,77779	
SAL2	2	0,42173	0,39903	0,40486	1,04760
	3	0,63005	0,60425	0,59304	
	5	0,79679	0,76566	0,76644	
AAL1	10	0,55018	0,54779	0,54453	1,10320
	13	0,65651	0,65430	0,65410	
	30	0,79537	0,80087	0,80569	
AAL2	10	0,53749	0,52269	0,52528	1,10320
	13	0,65576	0,64904	0,64317	
	20	0,79277	0,80399	0,80883	
NAL1	2	0,35738	0,36601	0,36055	1,14480
	3	0,56323	0,53498	0,59024	
	5	0,80669	0,82484	0,82699	
NAL2	2	0,43744	0,43556	0,43613	1,14480
	3	0,65930	0,64892	0,63891	
	5	0,87446	0,87257	0,85967	
ČAL1	2	0,14758	0,14932	0,14958	1,09370
	3	0,30332	0,29721	0,30398	
	5	0,57524	0,55969	0,57034	
ČAL2	2	0,15268	0,14790	0,14319	1,09250
	3	0,26101	0,26742	0,27858	
	5	0,52783	0,53887	0,54324	

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelki dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2. R predstavlja razredčitev, A1, A2, A3 absorbanco treh ponovitev, A<sub>kontrola</sub> absorbanco kontrolne raztopine DPPH.

Priloga B2: Absorbance vzorcev ekstraktov iz listov hmelja kultivarja H. Magnum dveh paralelk in kontrole pri 517 nm za DPPH test

Vzorci	R	A1	A2	A3	Akontrola
SML1	2	0,33536	0,31956	0,32150	1,04760
	3	0,55325	0,53465	0,53082	
	5	0,76224	0,73104	0,73762	
SML2	2	0,34699	0,30742	0,29234	1,04760
	3	0,54293	0,51706	0,51758	
	5	0,75649	0,72829	0,72815	
AML1	2	0,66741	0,66591	0,67042	1,06220
	3	0,79170	0,81402	0,78279	
	4	0,86129	0,85524	0,86272	
AML2	2	0,72210	0,70531	0,70285	1,06220
	3	0,81776	0,82046	0,82894	
	4	0,90449	0,88872	0,88668	
NML1	2	0,54066	0,53715	0,55867	1,15680
	3	0,74191	0,71288	0,76239	
	5	0,88508	0,91510	0,93478	
NML2	2	0,56501	0,56182	0,54930	1,13410
	3	0,73853	0,74728	0,74898	
	5	0,84739	0,88900	0,88907	
ČML1	1,333	0,16253	0,16777	0,17473	1,05210
	2	0,32158	0,33951	0,33754	
	3	0,51651	0,53728	0,52759	
ČML2	1,333	0,40505	0,38403	0,40599	1,01530
	2	0,57626	0,58532	0,58702	
	3	0,75556	0,76303	0,76021	

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2. R predstavlja razredčitev, A1, A2, A3 absorbanco treh ponovitev, A<sub>kontrola</sub> absorbanco kontrolne raztopine DPPH.

Priloga B3: Absorbance vzorcev ekstraktov iz storžkov hmelja kultivarja Aurora dveh paralelk in kontrole za DPPH test

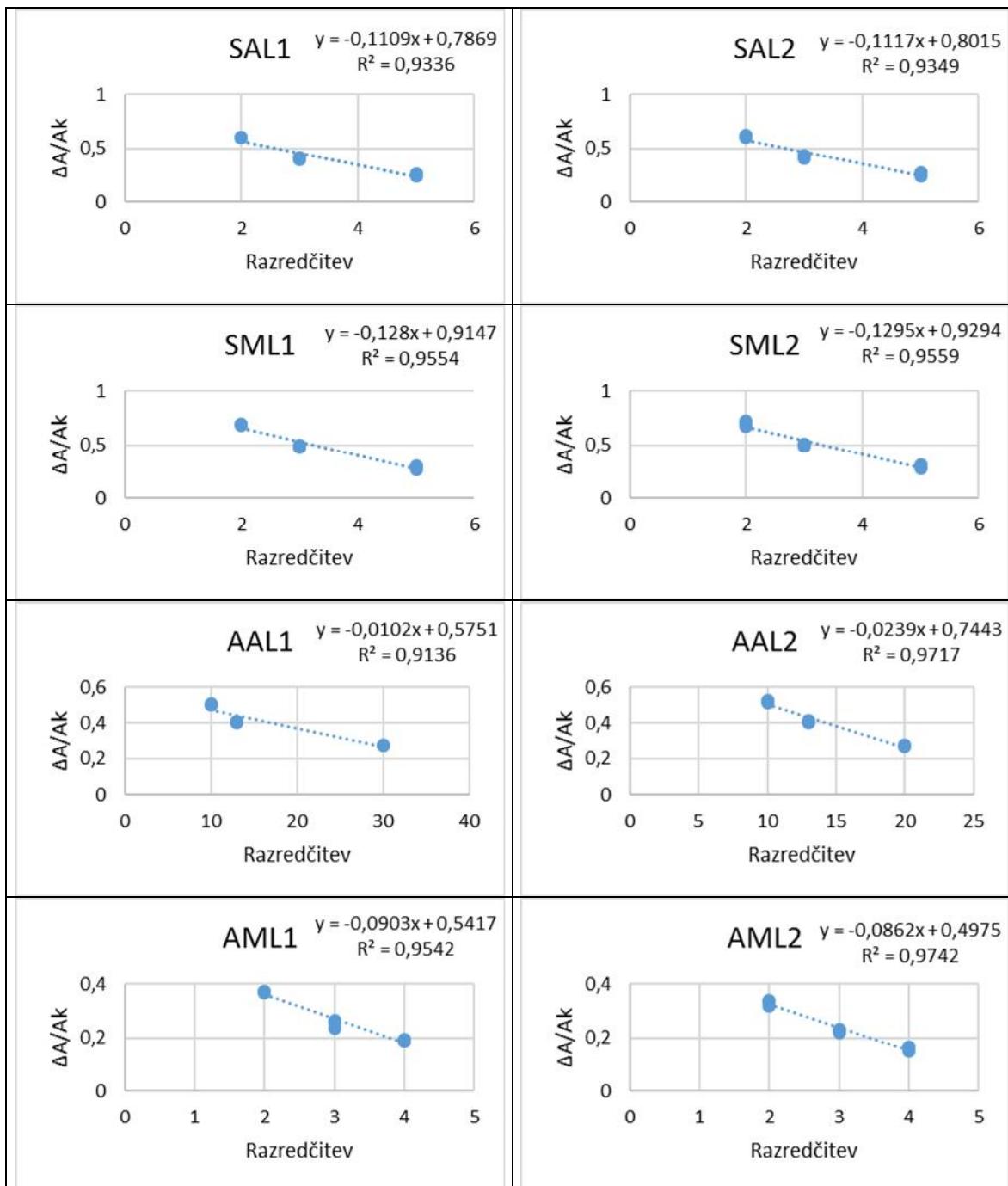
Vzorci	R	A1	A2	A3	Akontrola
SAS1	20	0,24237	0,23380	0,23070	1,11260
	30	0,38808	0,33656	0,34480	
	50	0,58239	0,52205	0,54097	
	70	0,72823	0,68762	0,67710	
SAS2	20	0,23690	0,23015	0,24714	1,11260
	30	0,33184	0,30195	0,30366	
	50	0,57328	0,54352	0,54435	
	70	0,73739	0,71752	0,73232	
AAS1	30	0,30241	0,30112	0,31940	0,97347
	50	0,55983	0,53102	0,53034	
	70	0,65031	0,66236	0,66246	
AAS2	30	0,32740	0,33245	0,33216	0,97347
	50	0,51959	0,51674	0,52200	
	70	0,67823	0,67386	0,68109	
NAS1	10	0,35545	0,36476	0,36778	1,12310
	30	0,53907	0,55900	0,55549	
	50	0,71777	0,71019	0,72338	
	70	0,81268	0,82620	0,82488	
NAS2	10	0,36556	0,36760	0,37055	1,19730
	30	0,53524	0,54040	0,53777	
	50	0,71996	0,71527	0,72853	
	70	0,85677	0,84498	0,83558	
ČAS1	10	0,27303	0,27786	0,28002	1,45010
	20	0,54501	0,56274	0,56836	
	50	1,05750	1,05810	1,04260	
ČAS2	10	0,26772	0,29092	0,27820	1,45010
	20	0,59040	0,61802	0,61998	
	50	1,03070	1,04120	1,05450	

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2. R predstavlja razredčitev, A1, A2, A3 absorbanco treh ponovitev, A<sub>kontrola</sub> absorbanco kontrolne raztopine DPPH.

Priloga B4: Absorbance vzorcev ekstraktov iz storžkov hmelja kultivarja H. Magnum dveh paralelk in kontrole za DPPH test

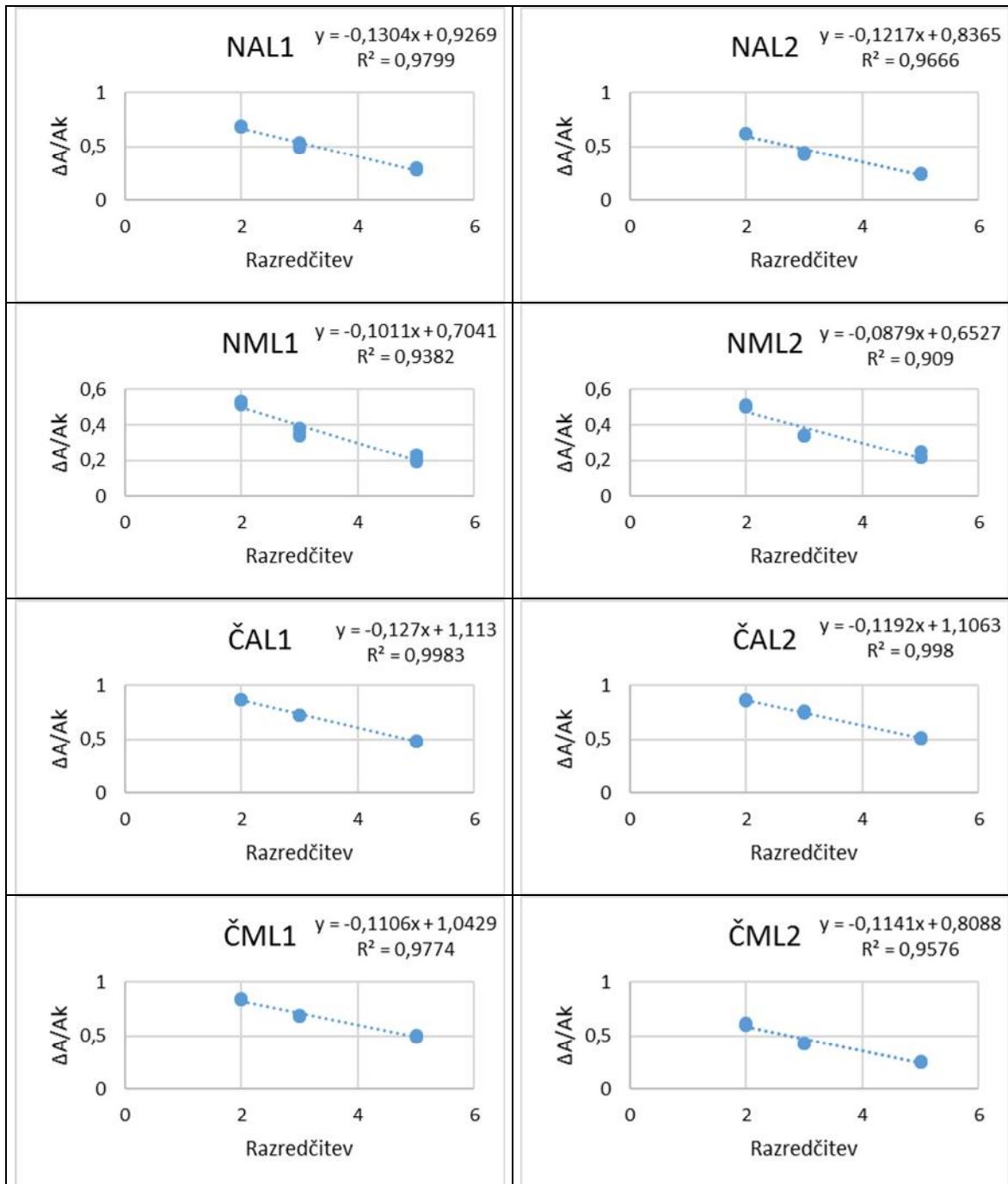
Vzorci	R	A1	A2	A3	Akontrola
SMS1	30	0,21437	0,20986	0,20832	1,04760
	50	0,36389	0,33207	0,33363	
	70	0,52166	0,52778	0,54879	
SMS2	30	0,22099	0,21385	0,20801	1,04760
	50	0,34642	0,34628	0,36802	
	70	0,55216	0,52876	0,52783	
AMS1	30	0,18227	0,17756	0,17690	1,04790
	50	0,30792	0,32425	0,31412	
	70	0,49358	0,49212	0,47808	
AMS2	30	0,17332	0,17754	0,17348	1,04790
	50	0,29891	0,31545	0,31785	
	70	0,49403	0,50154	0,49475	
NMS1	10	0,43220	0,44583	0,42804	1,19430
	30	0,42910	0,43273	0,42993	
	50	0,63696	0,60787	0,64553	
	70	0,74924	0,76855	0,75744	
NMS2	10	0,42871	0,44221	0,44473	1,22000
	30	0,42714	0,45379	0,45833	
	50	0,67314	0,68075	0,69285	
	70	0,78206	0,76277	0,80915	
ČMS1	10	0,26801	0,26939	0,26244	1,09230
	20	0,20334	0,20017	0,18467	
	50	0,52803	0,49962	0,49645	
ČMS2	10	0,25180	0,25018	0,24310	1,09230
	20	0,19125	0,20318	0,20211	
	50	0,51268	0,49032	0,52151	

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2. R predstavlja razredčitev, A1, A2, A3 absorbanco treh ponovitev, A<sub>kontrola</sub> absorbanco kontrolne raztopine DPPH.



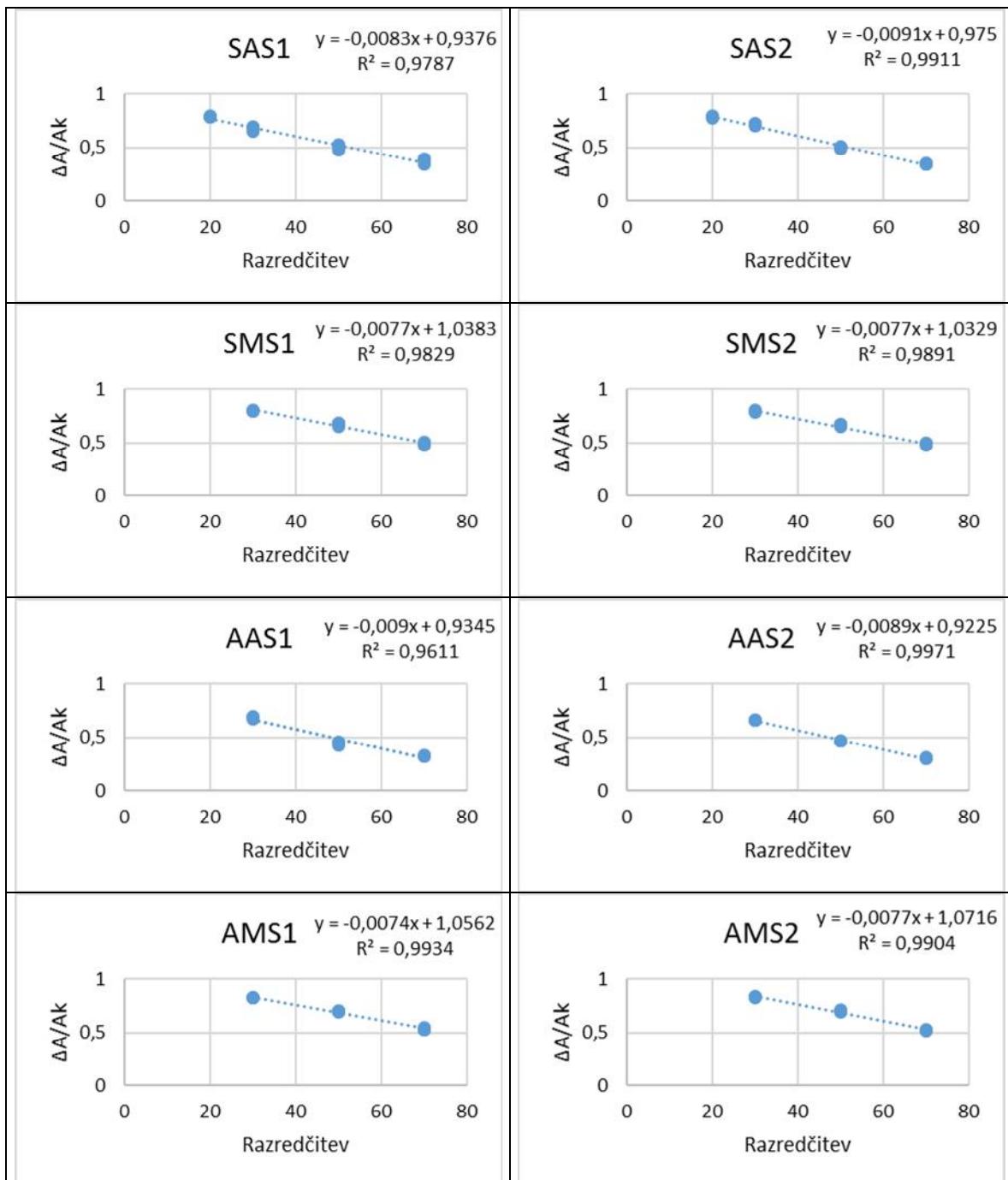
Priloga B5: Grafi DPPH testa vzorcev SAL, SML, AAL, AML

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.  
 Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.



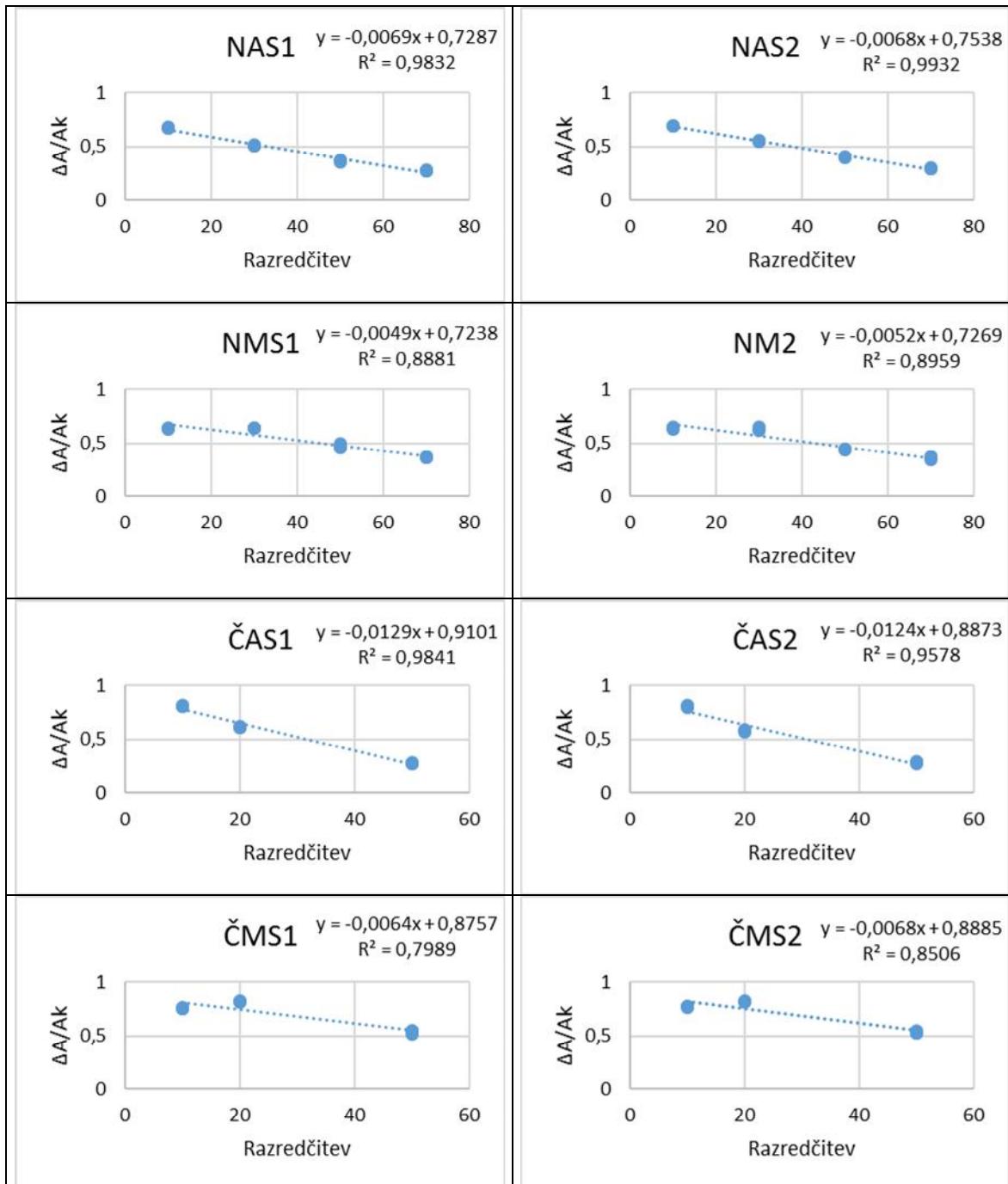
Priloga B6: Grafi DPPH testa vzorcev NAL, NML, ČAL, ČML

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.  
 Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.



Priloga B7: Grafi DPPH testa vzorcev SAS, SMS, AAS, AMS

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.  
 Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.



Priloga B8: Grafi DPPH testa vzorcev NAS, NMS, ČAS, ČMS

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki.  
 Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.

Priloga C: Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev testa analize sposobnosti redukcije

Priloga C1: Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja Aurora

Vzorec	$V_{\text{supernatanta}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$\gamma_{\text{FS}}$ (g/L)	A1	A2	A3
SAL1	500	0,00547	0,34225	0,35048	0,36591
	333	0,00365	0,18873	0,19471	0,18834
	250	0,00273	0,10914	0,12350	0,12317
SAL2	500	0,00557	0,44707	0,46516	0,45199
	333	0,00372	0,30224	0,28114	0,28727
	250	0,00279	0,21338	0,21659	0,21856
AAL1	333	0,00909	0,85023	0,83929	0,84524
	250	0,00682	0,61081	0,62164	0,61447
	167	0,00456	0,38623	0,38586	0,39125
AAL2	333	0,00971	0,92979	0,89882	0,89339
	250	0,00729	0,66705	0,65047	0,64792
	167	0,00487	0,43971	0,43519	0,43245
NAL1	333	0,00393	0,31079	0,30260	0,30474
	250	0,00294	0,24148	0,22843	0,24321
	167	0,00196	0,18826	0,18253	0,17140
NAL2	333	0,00378	0,33207	0,31548	0,29522
	250	0,00283	0,22915	0,23888	0,25778
	167	0,00188	0,17467	0,19193	0,17676
ČAL1	333	0,00484	0,52800	0,52866	0,51099
	250	0,00365	0,38725	0,37895	0,38515
	167	0,00242	0,27921	0,27447	0,26399
ČAL2	333	0,00495	0,49633	0,48992	0,50100
	250	0,00372	0,35438	0,36991	0,36821
	167	0,00247	0,25149	0,26983	0,25741

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $V_{\text{supernatanta}}$  predstavlja volumen izhodiščnega supernatanta;  $\gamma_{\text{FS}}$  masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A1, A2, A3 absorbance treh ponovitev.

Priloga C2: Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov listov hmelja kultivarja H. Magnum

Vzorec	$V_{\text{supernatanta}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$\gamma_{\text{FS}}$ (g/L)	A1	A2	A3
SML1	500	0,00570	0,44504	0,44066	0,44534
	333	0,00380	0,29002	0,28808	0,29658
	250	0,00286	0,19735	0,20272	0,20703
	167	0,00190	0,10496	0,09980	0,10536
SML2	500	0,00594	0,46165	0,46009	0,46978
	333	0,00396	0,26490	0,27676	0,27037
	250	0,00297	0,19375	0,18390	0,19025
	167	0,00198	0,10298	0,10227	0,09440
AML1	500	0,00516	0,33545	0,33898	0,31239
	333	0,00344	0,22146	0,20842	0,20737
	250	0,00258	0,14803	0,14924	0,15577
	167	0,00172	0,09038	0,08848	0,08719
AML2	500	0,00484	0,31947	0,32196	0,31651
	333	0,00323	0,19869	0,18885	0,18909
	250	0,00242	0,13588	0,13228	0,14007
	167	0,00161	0,07447	0,07733	0,07993
NML1	333	0,00349	0,34110	0,34587	0,35654
	250	0,00262	0,28594	0,26135	0,26072
	167	0,00175	0,18558	0,18882	0,18847
NML2	333	0,00367	0,48283	0,48582	0,42373
	250	0,00276	0,34408	0,36191	0,31825
	167	0,00184	0,23852	0,23339	0,23650
ČML2	333	0,00359	0,34389	0,34817	0,33434
	250	0,00271	0,25658	0,25463	0,27064
	167	0,00180	0,19506	0,18381	0,19862
ČML2	333	0,00331	0,37483	0,38436	0,39110
	250	0,00247	0,29909	0,31919	0,30255
	167	0,00164	0,22444	0,23029	0,23857

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $V_{\text{supernatanta}}$  predstavlja volumen izhodiščnega supernatanta;  $\gamma_{\text{FS}}$  masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A1, A2, A3 absorbance treh ponovitev.

Priloga C3: Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja Aurora

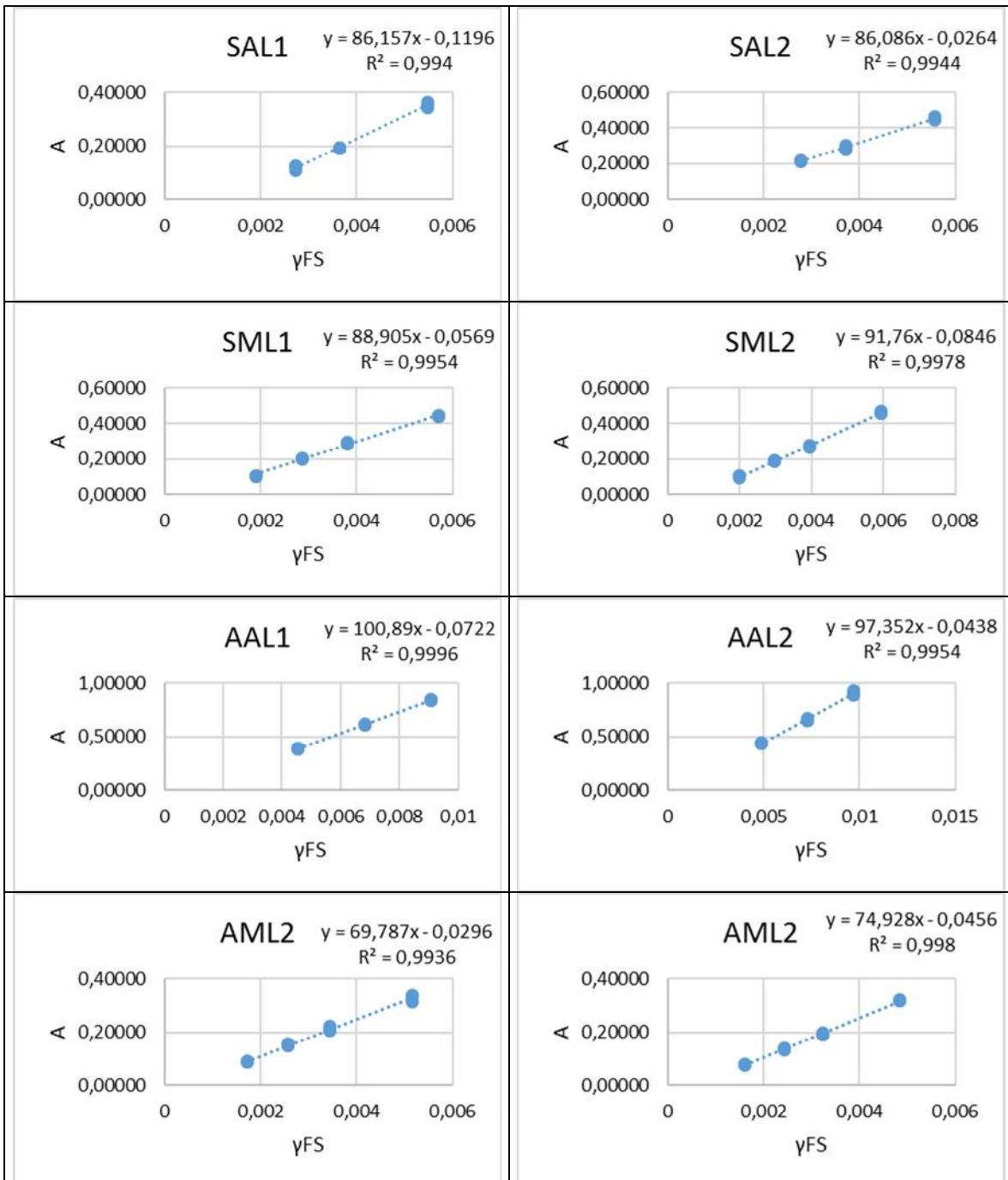
Vzorec	$V_{\text{supernatanta}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$\gamma_{\text{FS}}$ (g/L)	A1	A2	A3
SAS1	167	0,01120	0,72479	0,78874	0,72371
	100	0,00677	0,49313	0,47445	0,47861
	50	0,00339	0,25087	0,26001	0,24574
SAS2	167	0,01120	0,83666	0,87914	0,96843
	100	0,00677	0,55383	0,59568	0,60241
	50	0,00339	0,30859	0,35179	0,35055
AAS1	167	0,01268	0,91188	0,91773	0,92239
	100	0,00760	0,56696	0,56212	0,57157
	50	0,00380	0,28272	0,29831	0,28718
AAS2	167	0,01302	0,92721	0,92217	0,92143
	100	0,00781	0,61391	0,58854	0,61676
	50	0,00391	0,30097	0,30040	0,30761
NAS1	167	0,01250	0,86731	0,85830	0,86100
	100	0,00750	0,44254	0,42495	0,42440
	50	0,00375	0,27703	0,30326	0,30268
NAS2	167	0,01229	0,82631	0,82434	0,82472
	100	0,00737	0,43601	0,43674	0,43684
	50	0,00368	0,28387	0,28253	0,28730
ČAS1	167	0,01094	0,75114	0,76385	0,75521
	100	0,00656	0,44882	0,44798	0,43018
	50	0,00380	0,28076	0,28066	0,28283
ČAS2	167	0,01086	0,81094	0,81037	0,81420
	100	0,00651	0,44803	0,45537	0,45305
	50	0,00326	0,27517	0,30659	0,29298

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $V_{\text{supernatanta}}$  predstavlja volumen izhodiščnega supernatanta;  $\gamma_{\text{FS}}$  masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A1, A2, A3 absorbance treh ponovitev.

Priloga C4: Masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi in absorbance vzorcev ekstraktov storžkov hmelja kultivarja H. Magnum

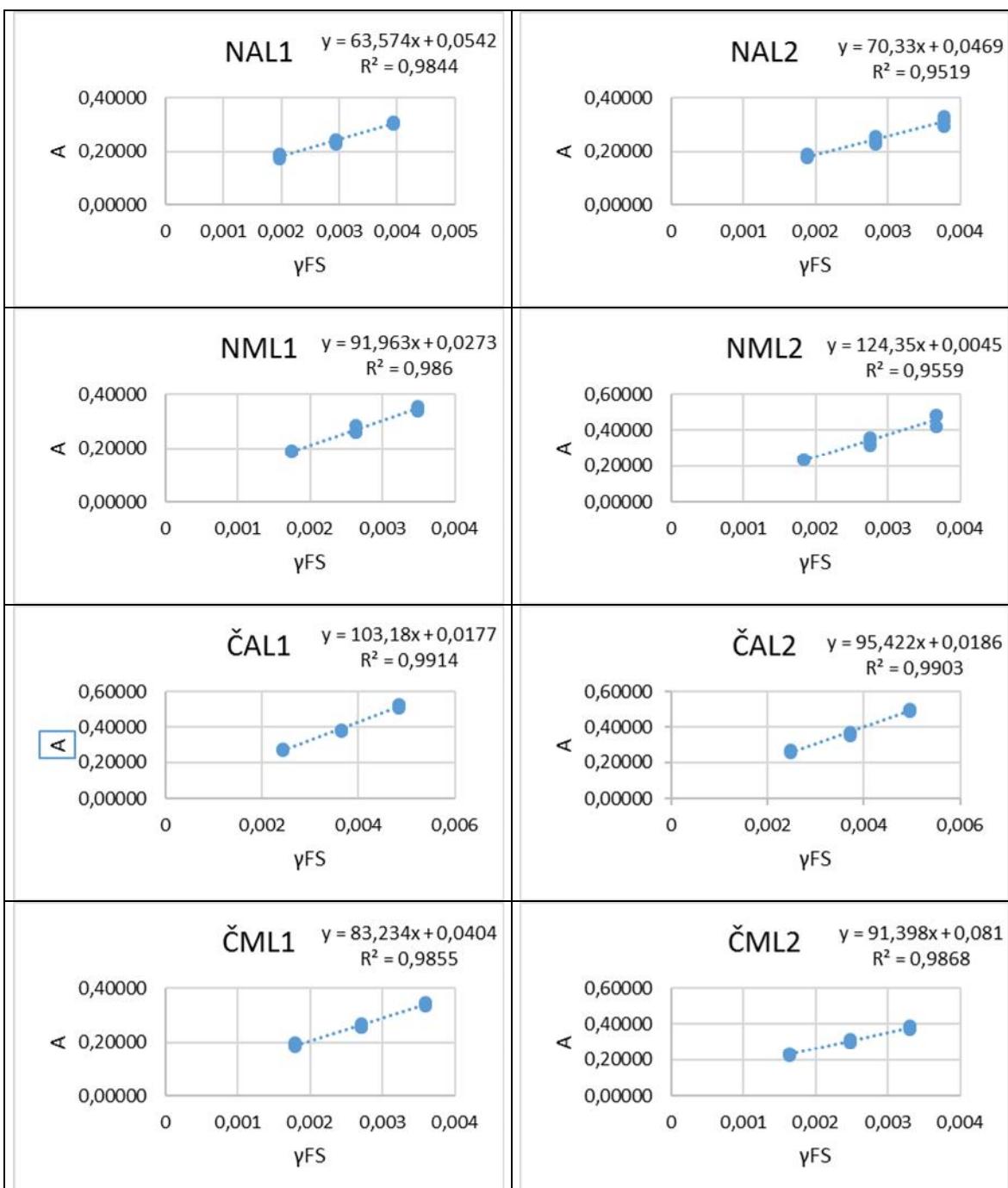
Vzorec	$V_{\text{supernatanta}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$\gamma_{\text{FS}}$ (g/L)	A1	A2	A3
SMS1	167	0,01406	0,58594	0,58076	0,58503
	100	0,00844	0,42514	0,42565	0,42394
	50	0,00422	0,28184	0,28369	0,30422
SMS2	167	0,01372	0,60708	0,61705	0,62326
	100	0,00823	0,40671	0,44102	0,42083
	50	0,00411	0,25550	0,26549	0,26802
AMS1	167	0,01484	0,74251	0,74155	0,74851
	100	0,00891	0,46576	0,48339	0,47246
	50	0,00445	0,27623	0,28103	0,25303
AMS2	167	0,01484	0,76109	0,81519	0,76613
	100	0,00885	0,56289	0,55342	0,55517
	50	0,00443	0,29358	0,31626	0,32703
NMS1	167	0,01336	0,68996	0,70590	0,69070
	100	0,00802	0,44695	0,42261	0,41552
	50	0,00401	0,31548	0,32197	0,31112
NMS2	167	0,01326	0,71888	0,71452	0,68752
	100	0,00794	0,42366	0,42535	0,40906
	50	0,00398	0,29692	0,27822	0,30157
ČMS1	167	0,01242	0,64835	0,65712	0,65054
	100	0,00745	0,43803	0,42532	0,40945
	50	0,00372	0,30837	0,28801	0,32180
ČMS2	167	0,01258	0,58012	0,58085	0,57424
	100	0,00755	0,32220	0,32160	0,31825
	50	0,00378	0,18664	0,18101	0,19015

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]rzava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $V_{\text{supernatanta}}$  predstavlja volumen izhodiščnega supernatanta;  $\gamma_{\text{FS}}$  masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A1, A2, A3 absorbance treh ponovitev.



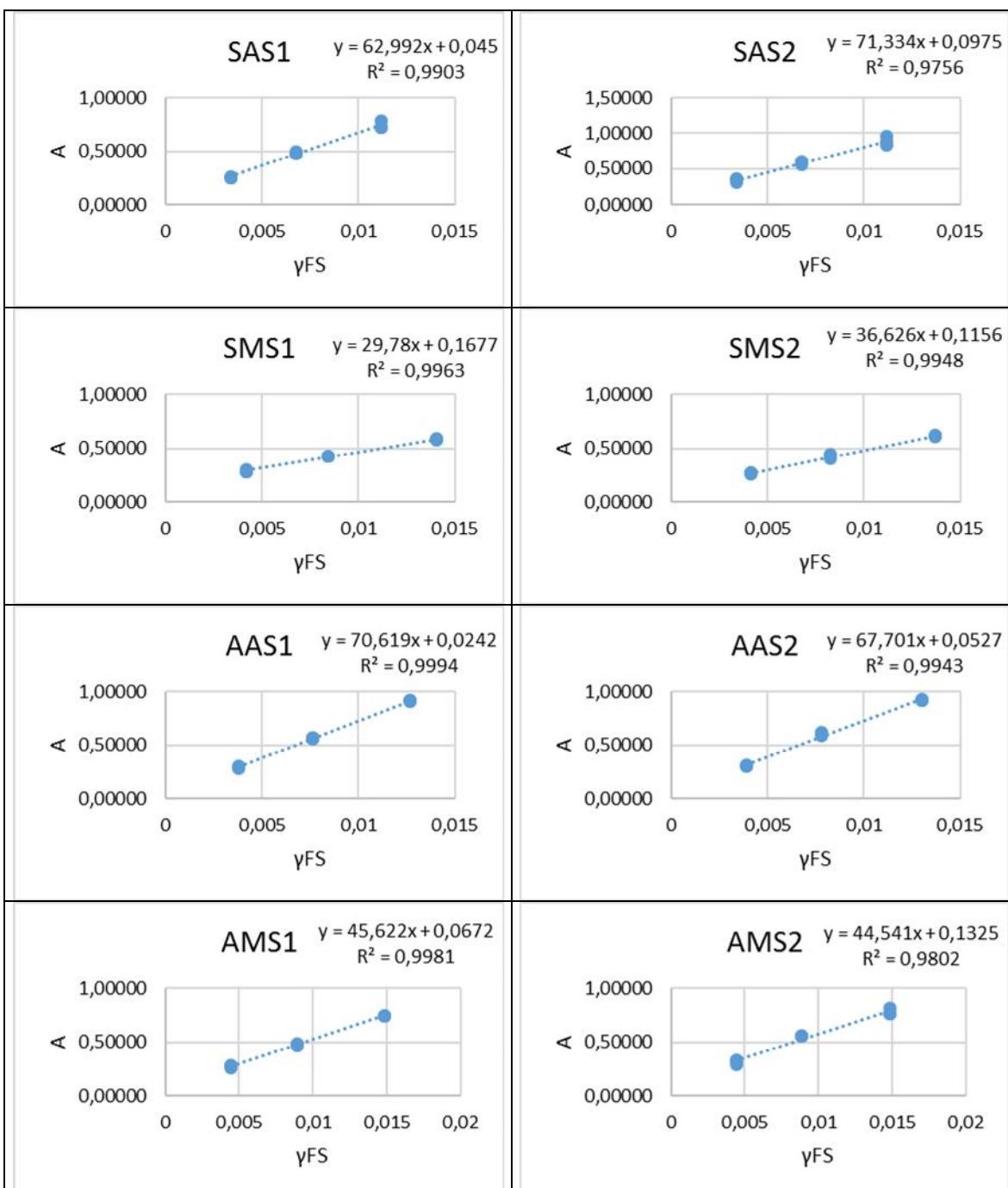
Priloga C5: Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev SAL, SML, AAL, AML

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $\gamma_{FS}$  predstavlja masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A pa izmerjeno absorbanco vzorcev.



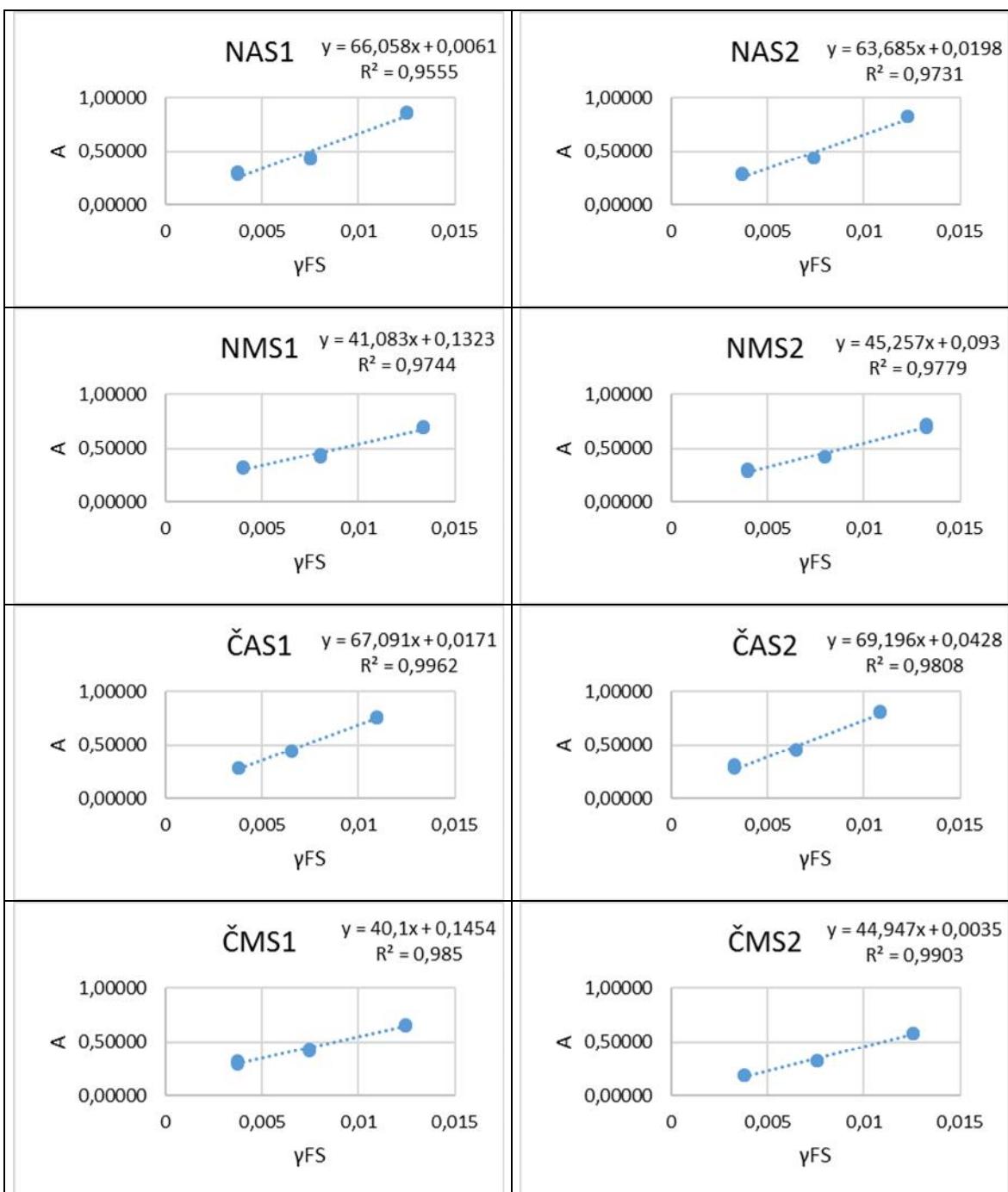
Priloga C6: Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev NAL, NML, ČAL, ČML

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $\gamma_{FS}$  predstavlja masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A pa izmerjeno absorbanco vzorcev.



Priloga C7: Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev SAS, SMS, AAS, AMS

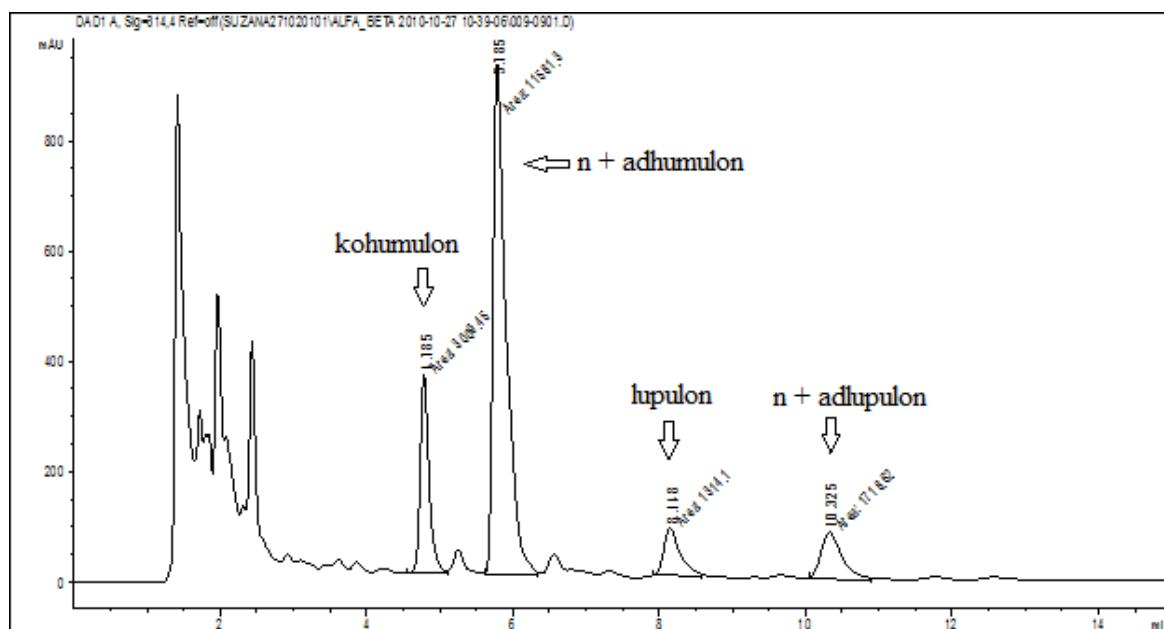
Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $\gamma_{FS}$  predstavlja masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A pa izmerjeno absorbanco vzorcev.



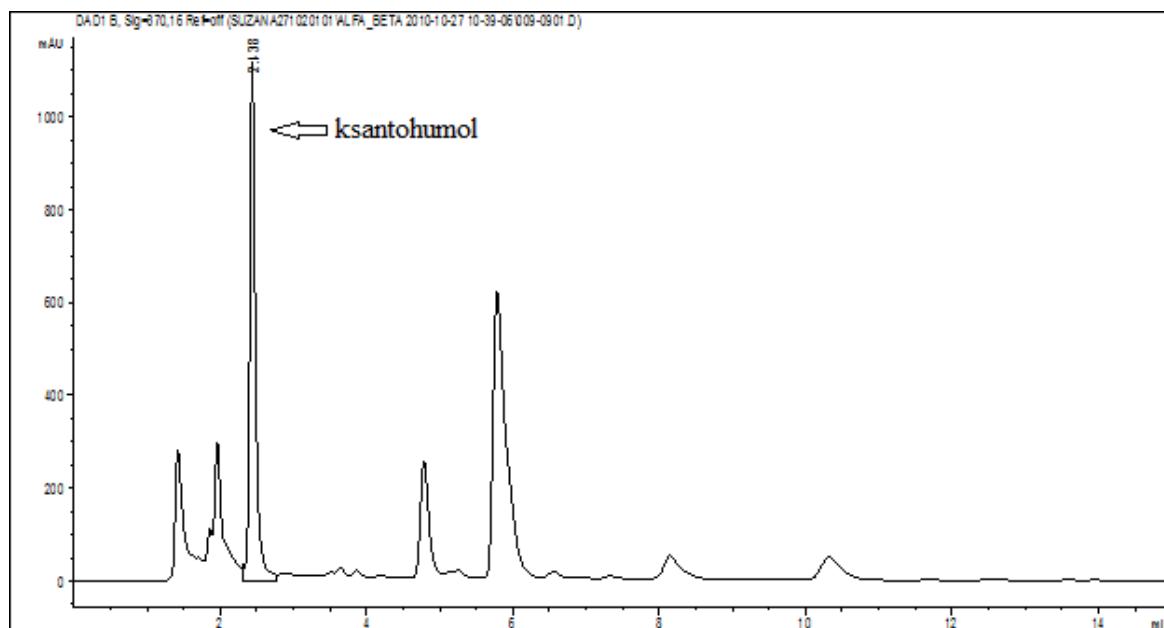
Priloga C8: Grafi odvisnosti absorbance od masne koncentracije fenolnih spojin pri analizi sposobnosti redukcije vzorcev NAS, NMS, ČAS, ČMS

Legenda: Imena vzorcev smo skrajšali in uporabili nomenklaturo: [D]ržava – [K]ultivar – [L]isti/[S]toržki. Dodatno smo pri prikazu paralelk dodali v imenu vzorca številko 1 oziroma 2.  $\gamma_{FS}$  predstavlja masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi; A pa izmerjeno absorbanco vzorcev.

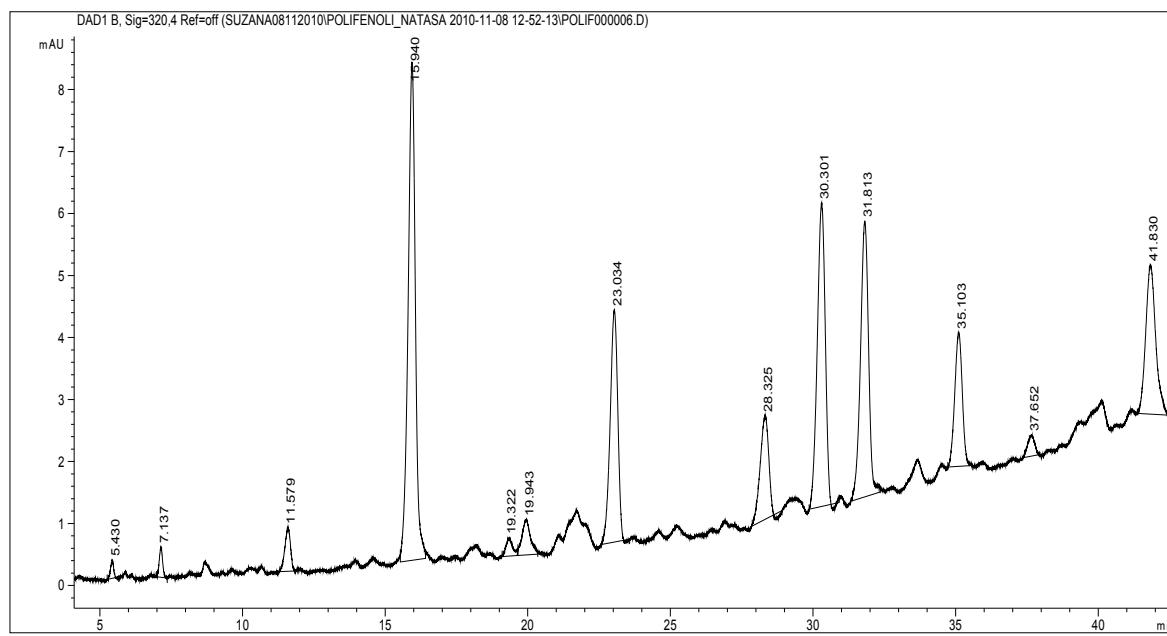
Priloga D: HPLC kromatogrami



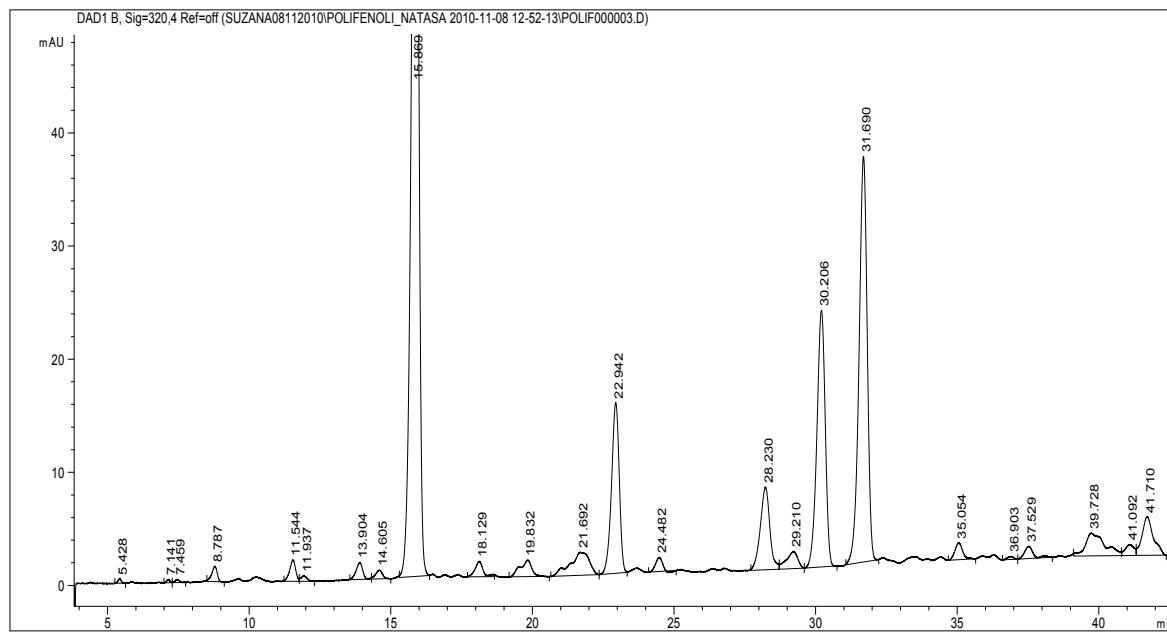
Priloga D1: HPLC kromatogram alfa- in beta-kislin v ekstraktu vzorca SAS pri 314 nm



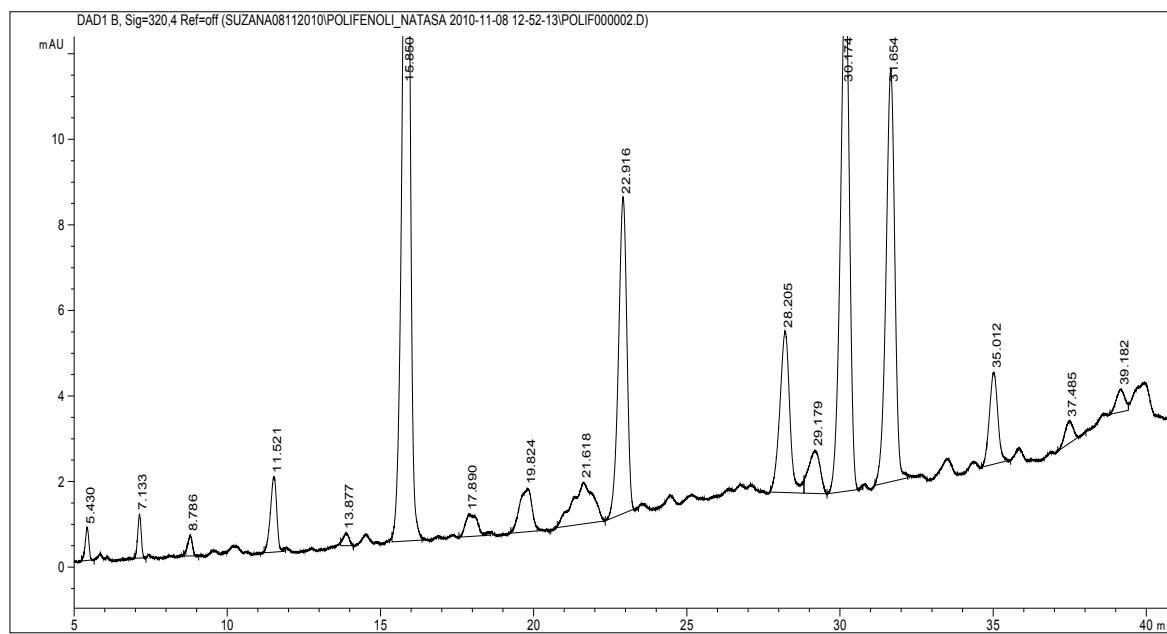
Priloga D2: HPLC kromatogram ksantohumola v ekstraktu vzorca SAS pri 370 nm



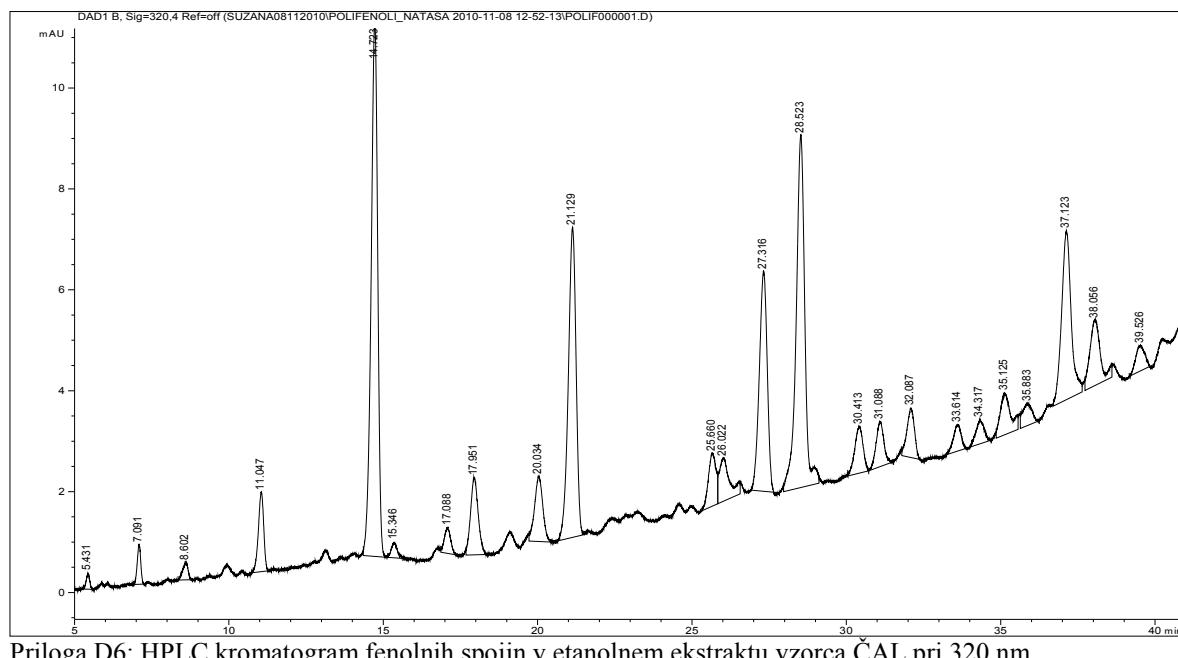
Priloga D3: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SAL pri 320 nm



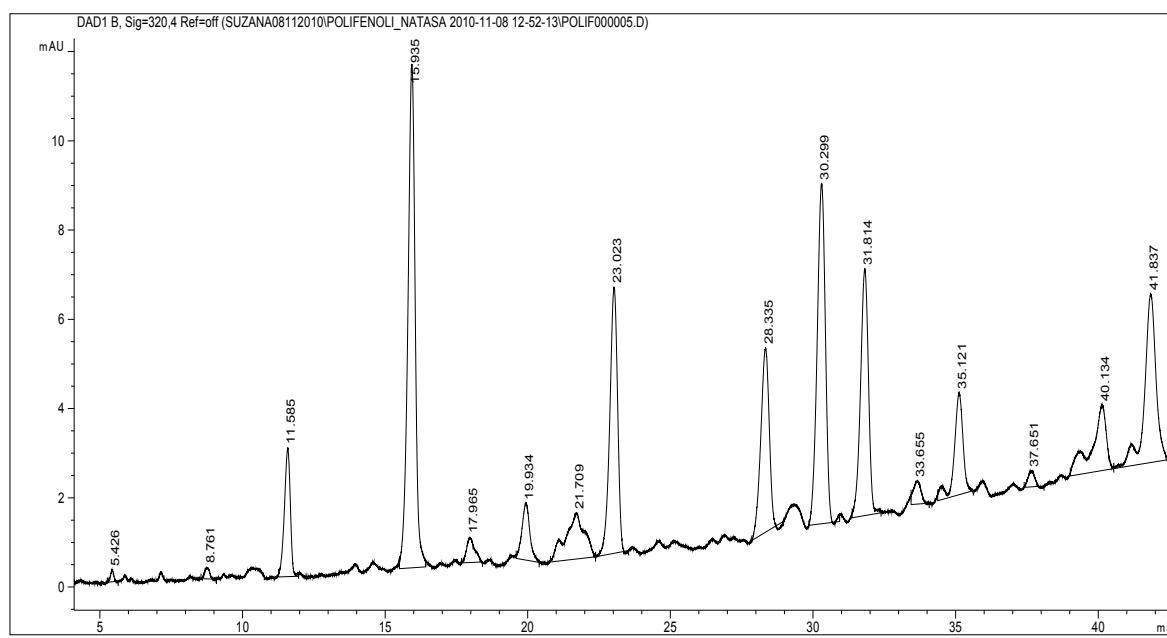
Priloga D4: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AAL pri 320 nm



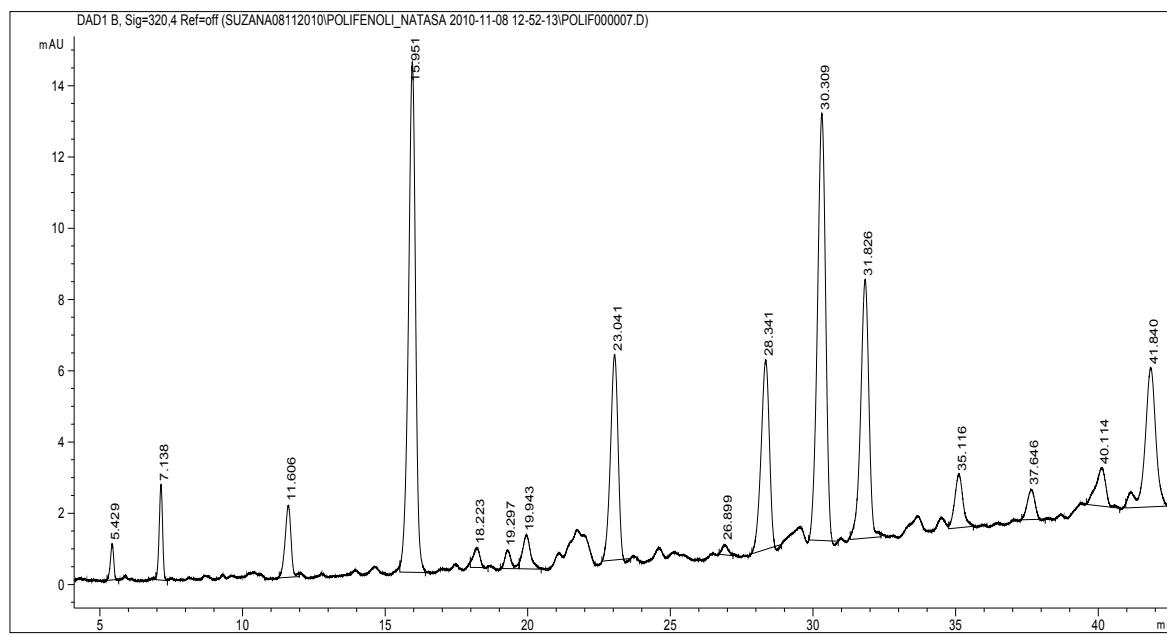
Priloga D5: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NAL pri 320 nm



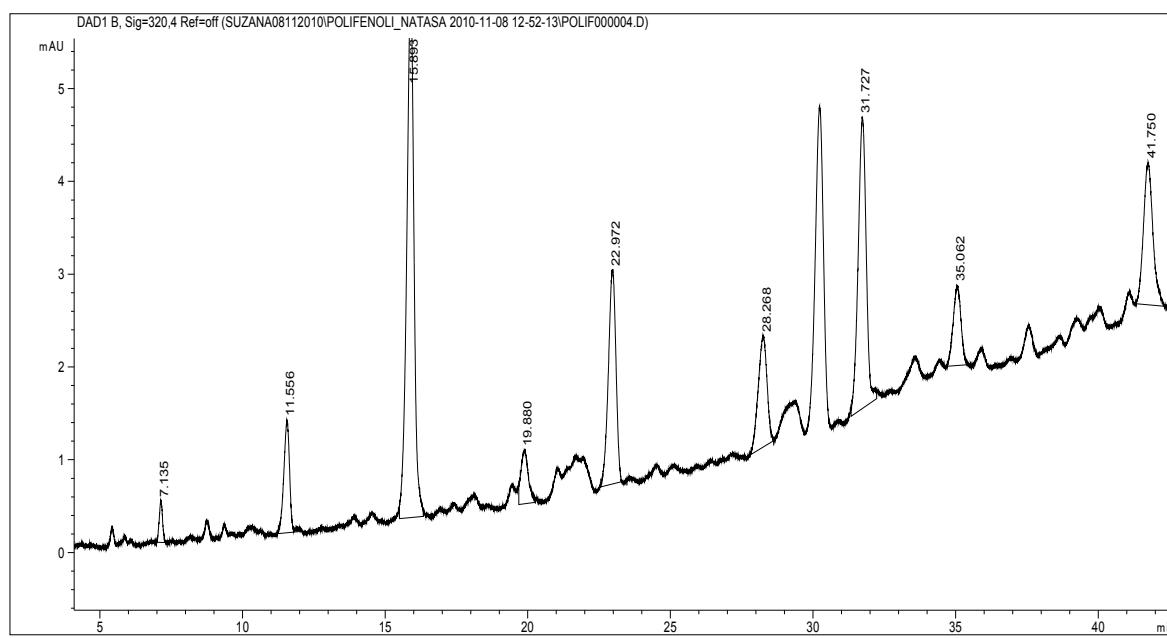
Priloga D6: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČAL pri 320 nm



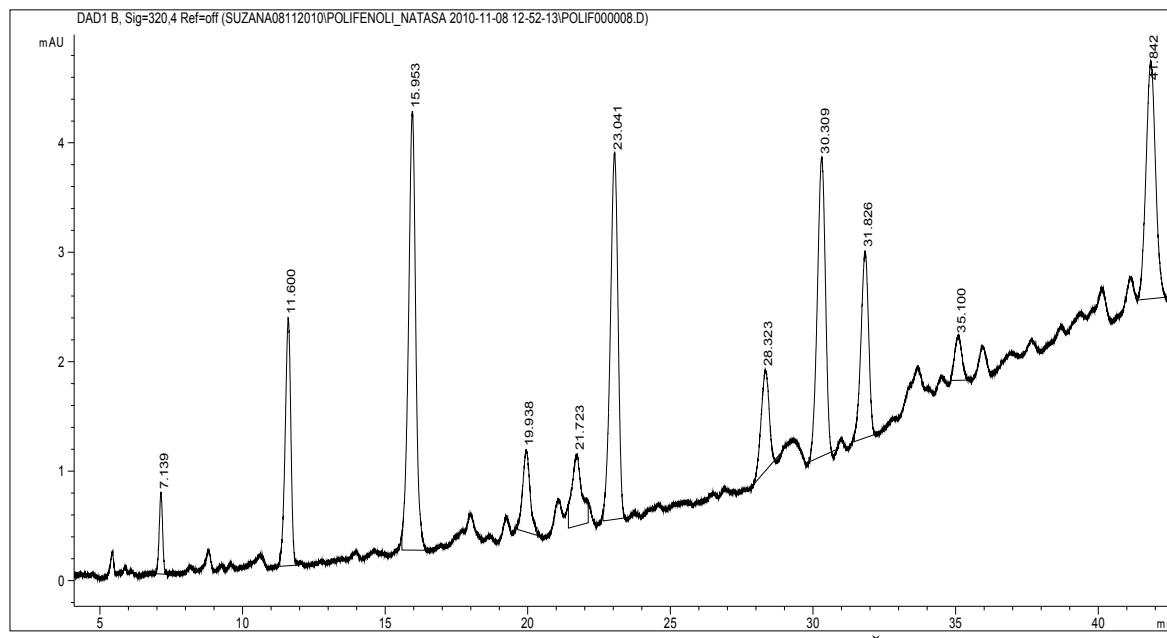
Priloga D7: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SML pri 320 nm



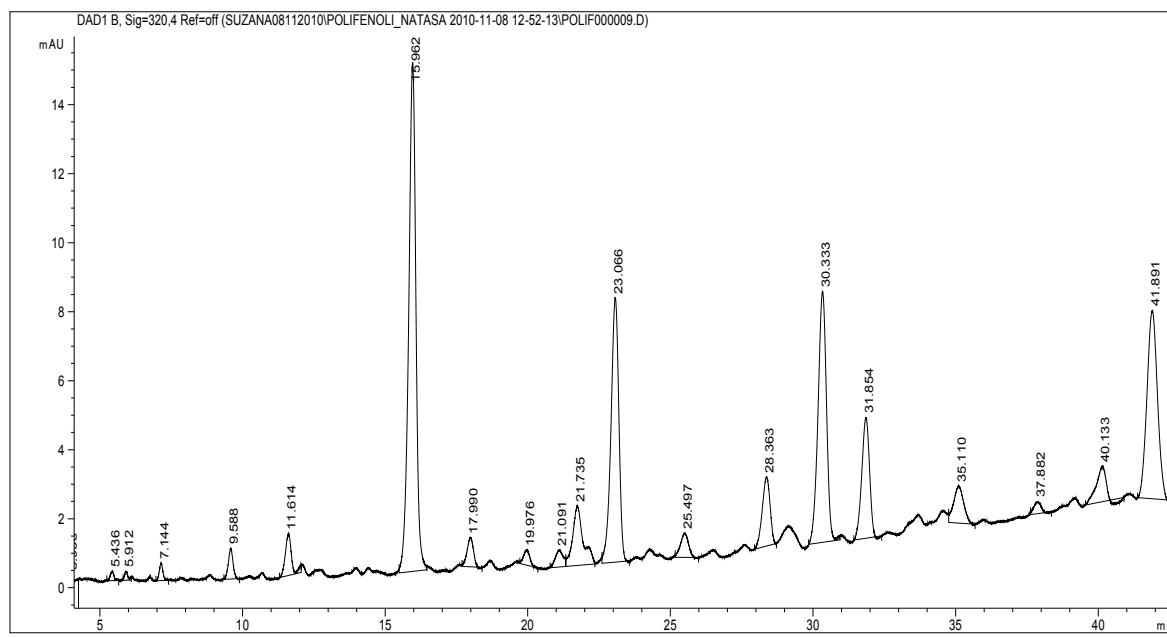
Priloga D8: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AML pri 320 nm



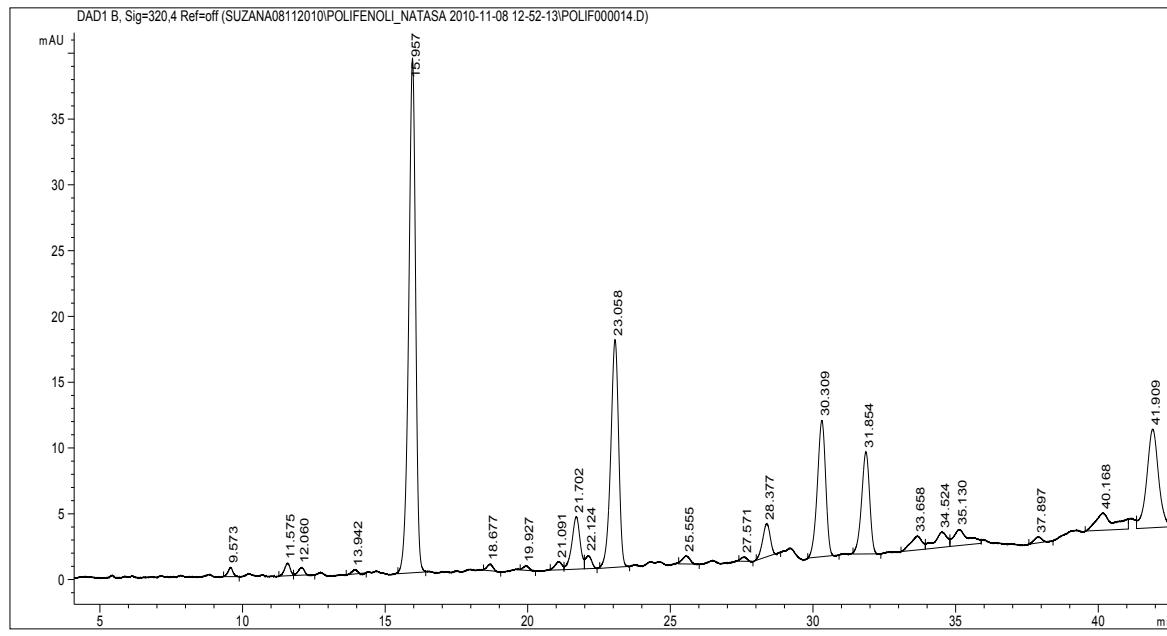
Priloga D9: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NML pri 320 nm



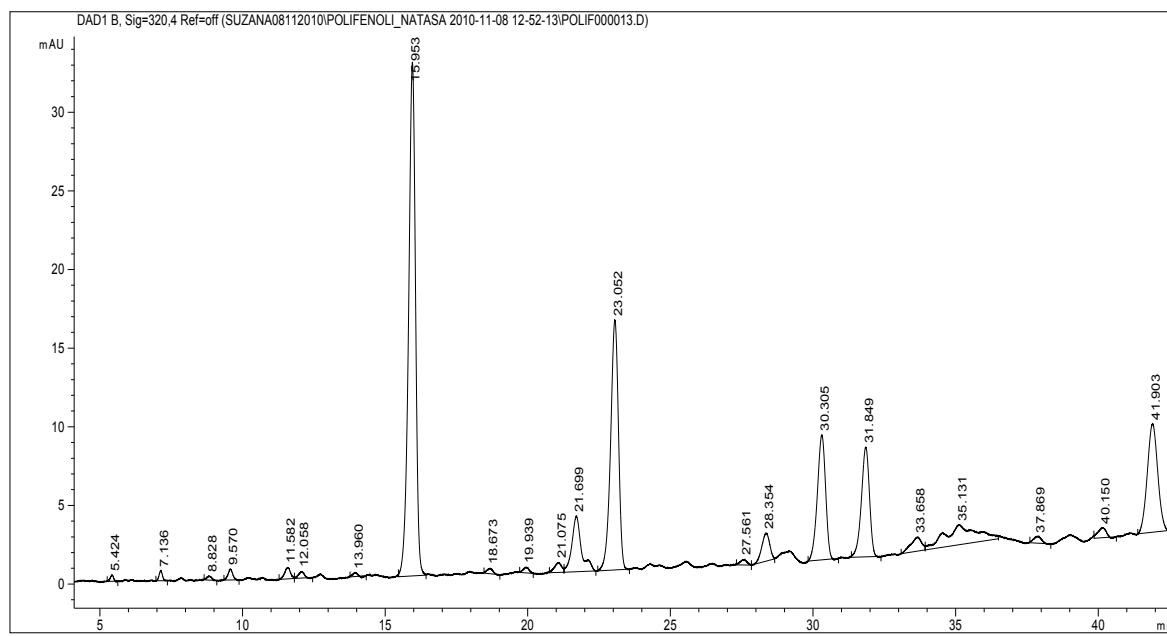
Priloga D10: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČML pri 320 nm



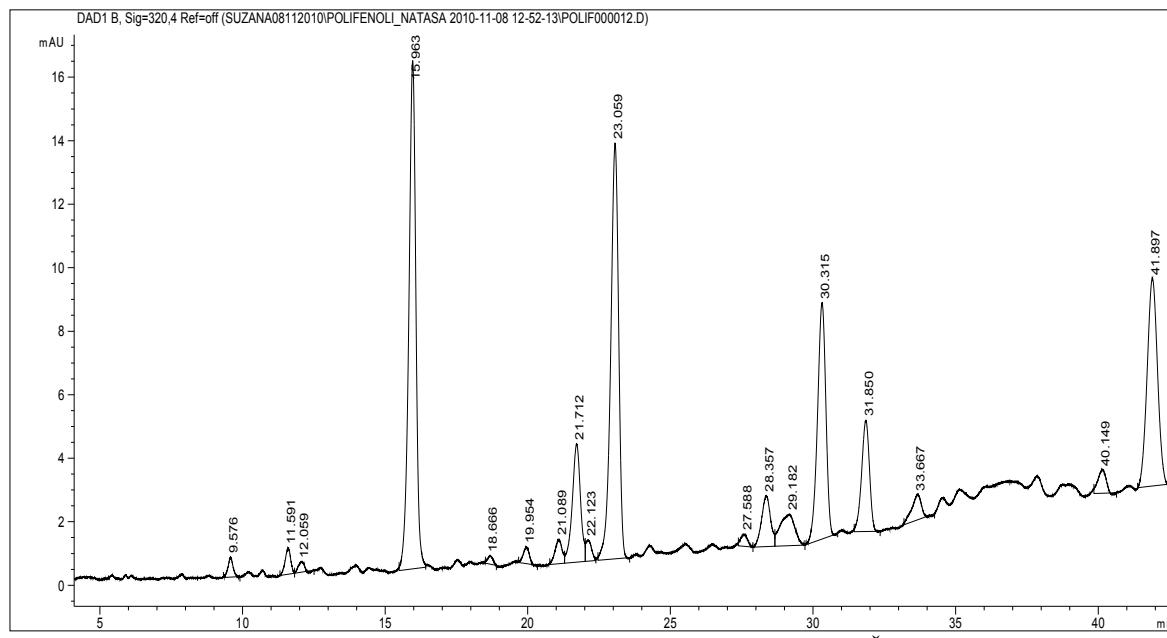
Priloga D11: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SAS pri 320 nm



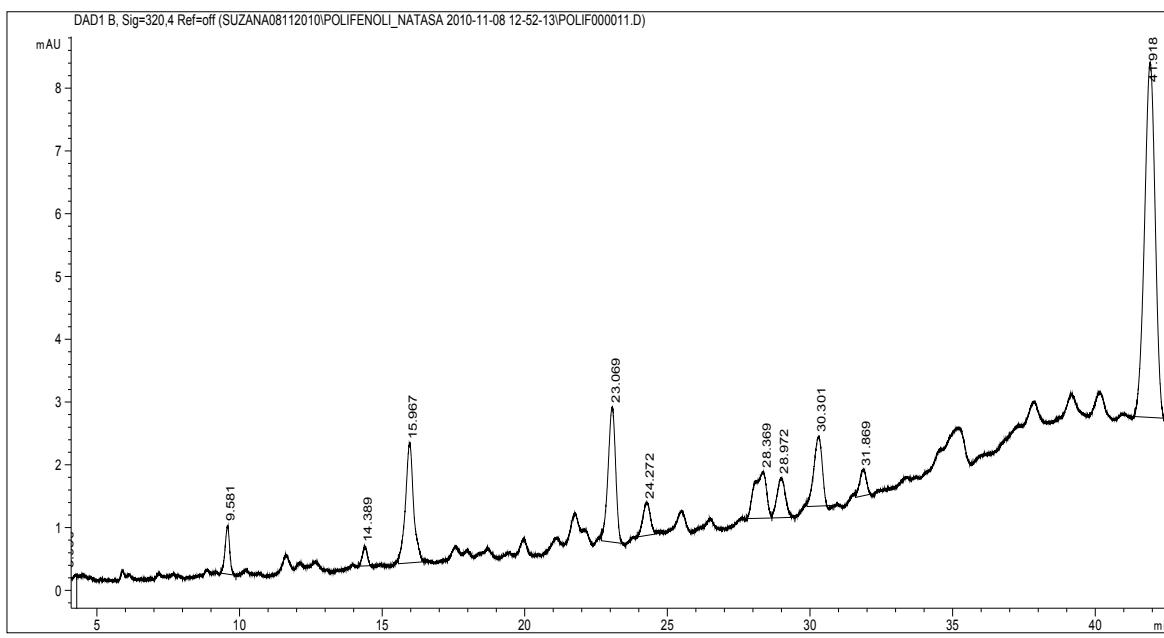
Priloga D12: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AAS pri 320 nm



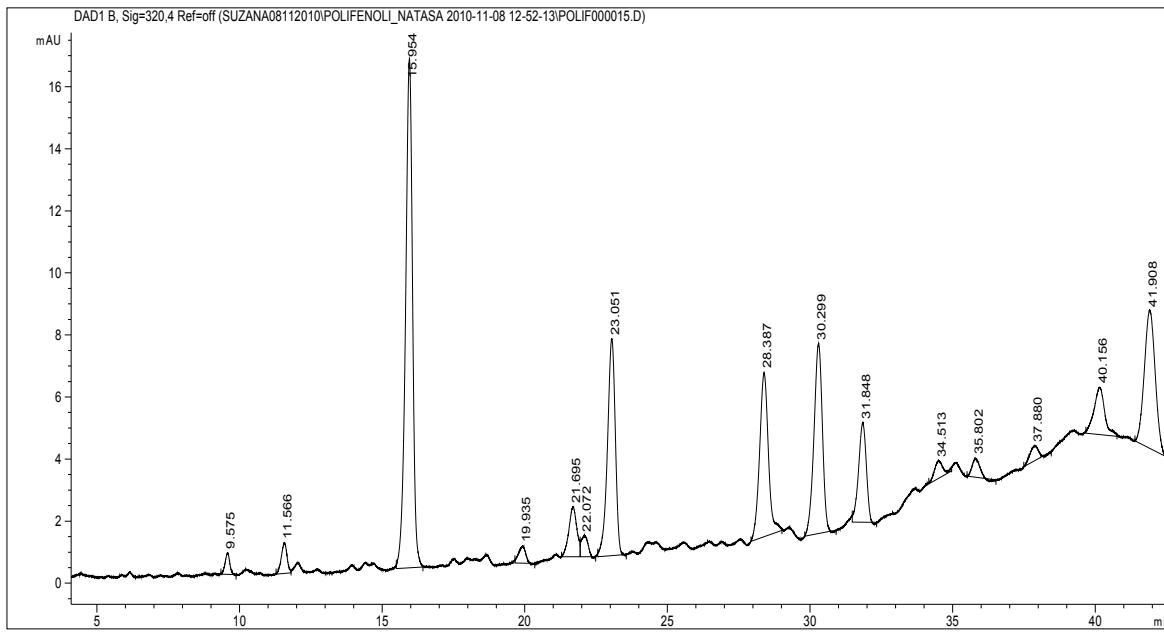
Priloga D13: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NAS pri 320 nm



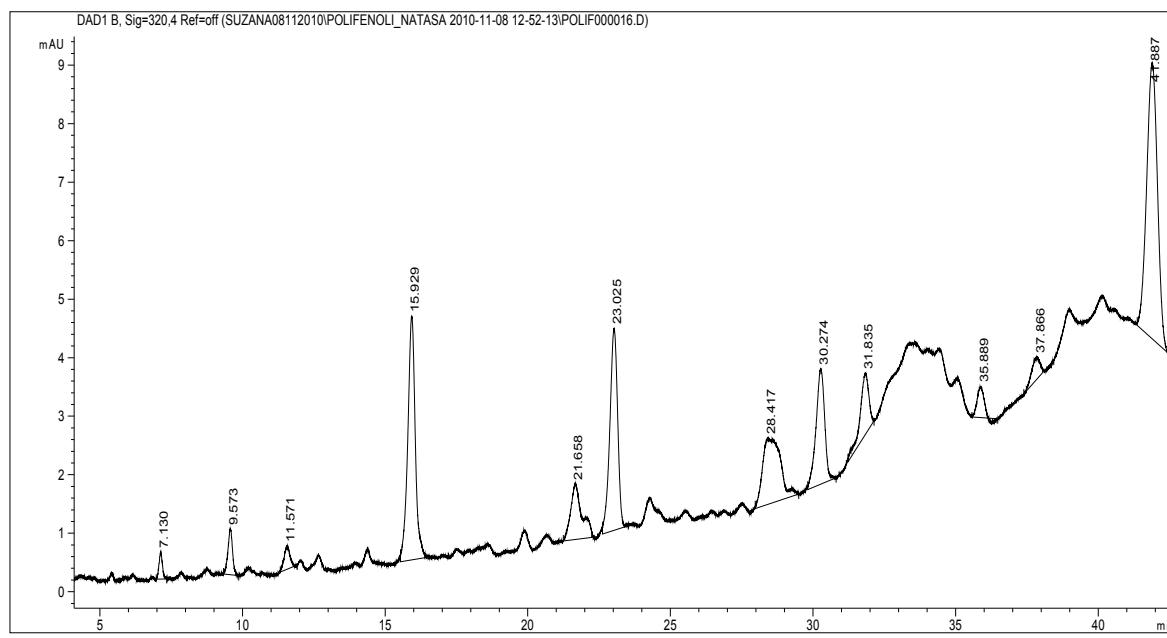
Priloga D14: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČAS pri 320 nm



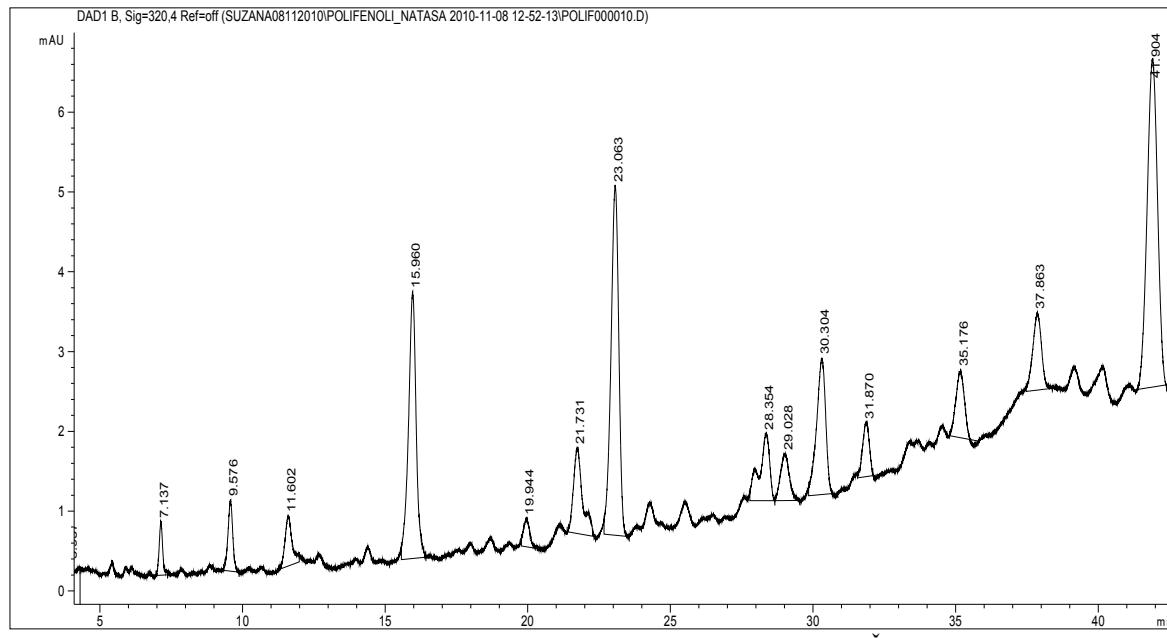
Priloga D15: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca SMS pri 320 nm



Priloga D16: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca AMS pri 320 nm



Priloga D17: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca NMS pri 320 nm



Priloga D18: HPLC kromatogram fenolnih spojin v etanolnem ekstraktu vzorca ČMS pri 320 nm