Određivanje i usporedba antioksidativne aktivnosti i sadržaja željeza u soku i pekmezu ploda jabuke samoniklice

Amidžić, Mirjana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:701648

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Mirjana Amidžić

Određivanje i usporedba antioksidativne aktivnosti i sadržaja željeza u soku i pekmezu ploda jabuke samoniklice

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija II i izrađen na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić.

Iskreno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić na ukazanoj prilici za rad u laboratoriju, stručnoj pomoći, savjetima a prije svega na strpljenju i dobroj volji tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala dr. sc. Jasni Jablan i stručnom timu Zavoda za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" na pruženoj pomoći prilikom određivanja teških metala.

Mojim roditeljima, sestri i Ibriću najveće hvala na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i vjeri u moj uspjeh.

1. UVOD 1
1.1. Botanički podaci 2
1.1.1. Malus domestica Borkh., Rosaceae (Jabuka) 2
1.2. Uporaba jabuke samoniklice u kulinarstvu 3
1.3. Oksidativni stres 4
1.4. Fenolni antioksidansi 5
1.4.1. Antioksidansi u hrani 5
1.4.2. Polifenoli 5
1.4.3. Flavonoidi 6
1.4.4. Fenolne kiseline 7
1.5. Sideropenična anemija 8
1.5.1. Preparati željeza u terapiji sideropenične anemije 9
1.6. Analitičke metode 10
1.6.1. UV-Vis spektroskopija 10
1.6.2. Atomska apsorpcijska spektroskopija 11
2. OBRAZLOŽENJE TEME 12
3. MATERIJALI I METODE 14
3.1.1. Biljni materijal 15
3.1.2. Kemikalije 15
3.1.3. Uređaji 15
3.2. METODE ISPITIVANJA 16
3.2.1. Priprema soka 16
3.2.2. Određivanje suhe tvari u uzorcima 16
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola 16
3.2.4. Određivanje flavonoida 16
3.2.5. Određivanje fenolnih kiselina 17
3.2.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti 17
3.2.7. Određivanje kelirajuće aktivnosti 18
3.2.8. Određivanje ukupnih šećera 19
3.2.9. Određivanje koncentracije Fe^{2+} iona 19

3.2.10. Određivanje teških metala..... 19
3.2.10. Statistička obrada podataka..... 20
4. REZULTATI I RASPRAVA..... 21
4.1. Određivanje suhe tvari u uzorcima..... 22
4.2. Određivanje ukupnih polifenola..... 22
4.3. Određivanje flavonoida..... 23
4.4. Određivanje fenolnih kiselina..... 24
4.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti..... 25
4.6. Određivanje kelirajuće aktivnosti..... 26
4.7. Određivanje ukupnih šećera..... 27
4.8. Određivanje koncentracije Fe^{2+} iona..... 28
4.9. Određivanje teških metala..... 28
5. ZAKLJUČAK..... 31
6. LITERATURA..... 33
7. SAŽETAK / SUMMARY..... 38

1. UVOD

1.1. Botanički podaci

1.1.1. *Malus domestica* Borkh., Rosaceae (Jabuka)

Stablo jabuke je dosta razvijeno, veoma bujno, razgranato, dugovječno i široke piramidalne krošnje. Karakteristika ove sorte je da list opadne prije plodova. Samoniklica predstavlja autohtonu bosanskohercegovačku sortu jabuke. To je vrsta jabuke koju karakteriziraju srednje krupni listovi, elipsasti, zelene boje s žućkastom nijansom lica i naličja. Bočne žile zatvaraju kut od 55° u odnosu na središnju žilu. Listovi su blago dlakavi s donje strane, naspramno raspoređeni s izraženim oštrijim vrhom i nazubljenom rubom, prikazani na Slici 1 (Kanlić, 2010). Cvjetovi se javljaju u proljeće. U početku cvatnje su blijedo ružičaste boje koja se vremenom blijedi, s pet kruničnih i pet čašičnih listića. Plod je srednje veličine, okruglasti. Epiderma je tanka voštano sjajna. Usplođe je bijelo, hrskavo, srednje sočno, dosta slatko i prilično tvrdo. Plodovi su aromatični, a aroma je specifična, karakteristična samo za ovu sortu, prikazani na Slici 2. Plodovi izdrže i nekoliko jesenskih mrazeva bez oštećenja. Autohtone sorte jabuka imaju dubok korijen koji im daje veću otpornost na sušu, tako stvara veću mogućnost upijanja vode i minerala neophodnih za rast i razvoj stabla i plodova. Upravo su to neki razlozi zbog kojih su se autohtone sorte jabuke očuvale zadržale na ovim prostorima (Beširević, 2009).

Samoniklica je vjerovatno nastala na prostorima sjeveroistočne Bosne i Hercegovine, gdje je sama nikla i pokazala dosta dobra svojstva bez kalemljenja, te po tome dobila naziv. Kasnije se kalemljenjem širila i postala vrlo prihvaćena sorta. Postoje dvije vrste ove sorte: bijela (svijetlo crvena) i crna (tamnocrvena) (Beširević, 2009).



Slika 1. Jabuka samoniklica (*Malus domestica* Borkh., Rosaceae).



Slika 2. Plod jabuke samoniklice.

1.2. Uporaba jabuke samoniklice u kulinarstvu

Svježe jabuke se koriste za pripremu karakterističnih tradicionalnih jela poput lijene pite, zalivene jabukovače i tufahija. Sok od ovih jabuka, šira, se koristi u svježem obliku ali postoji mogućnost i konzerviranja. Ipak, najvažniji proizvod koji se dobiva je pekmez. Pekmez jabuke samoniklice se tradicionalno izrađuje postupkom koncentriranja mutnog soka domaćih jabuka. Nakon berbe i pranja plodova vrši se usitnjavanje, mljevenje ili tučenje jabuka na način koji je specifičan i jedinstven za područje Bosne i Hercegovine. Koristi se drvena

sprava koja se zove stupa. Sastoji se od tri dijela i to: duge elastične motke koja se zove žida, malja koji se pravi od tvrdog drveta i drvenog korita. Određena količina jabuka sa ubaci u drveno korito i pomoću malja koji je spojen na elastičnu motku vrši se usitnjavanje. Nakon usitnjavanja vrši se odvajanje čvrste i tekuće faze u drvenoj presi. Usitnjena jabuka se iz drvenog korita prebacuje u dio žećke koji služi da odvajanje rijetkog soka od koma. Dobiveni sirovi sok se skladišti vrlo kratko ili čak nikako zbog velike podložnosti mikrobiološkom kvarenju. Sirovi sok se ukuhava na vatri u posudi od bakra koja se zove tavulja. Kada počne proces ukuhavanja i odeđena količina soka se upari, vrši se dolijevanje soka u tavulju. Cijeli proces ukuhavanja traje 6-8 sati zavisno od broja dolivanja rijetkog soka. Gotov proizvod, pekmez, mora imati udio suhe tvari od 68 %-72 %, tamno smeđu boju i karakterističam slatkast miris. Od 2 kg jabuka se dobije 1 l soka od kojeg se proizvede 100 g pekmeza. Pekmez je dugotrajan proizvod koji se pakira i skladišti bez konzervansa i dodatka bilo kakvih aditiva. U narodnoj medicni u BiH, od davnina se smatra da je pekmez od jabuka koristan lijek za malokrvnost, kašalj, za jačanje organizma i imuniteta. Pekmez od jabuka može poslužiti i kao visokoenergetska hrana zbog velikog sadržaja šećera (Jašić i sur. 2012).

1.3. Oksidativni stres

Povećano stvaranje slobodnih radikala i/ili nedovoljna antioksidativna zaštita dovodi do oksidativnog stresa u stanici. Nastank jednog slobodnog radikala može dovesti do lančane reakcije u proizvodnji drugih slobodnih radikala. Enzimi poput NADPH oksidaze, ksanitin oksidaze, ciklooksigenaze te enzimi koji sudjeluju u oksidativnoj fosforilaciji i stvaranju energije mogu dovesti nastanka jednog ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci i stvaranja kemijski reaktvnih spojeva (Johansen i sur., 2005).

Produženi i/ili snažan oksidativni učinak nadmašuje stanični antioksidativni obrambeni kapacitet, dolazi do oštećenja makromolekula, gubi se stanična funkcija, oštećuju se membrane, što sve zajedno dovodi do smrti stanice. Stanja organizma kao što su povećana fizička aktivnost, izloženost zagađenom okolišu, ksenobioticima, pušenje i slično rezultiraju oksidativnim stresom. Oksidativni stres je, kao patofiziološki mehanizam, u podlozi brojnih patoloških i toksikoloških procesa kao i starenja. Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi,

endogenog ili egzogenog porijekla, mogu lako napasti sve vrste biomolekula (proteni, DNA, nezasićene masne kiseline). Narušen oksido-redukcijski status, koji uzrokuje proces lipidne peroksidacije, promjenu aktivnosti direktnih ili indirektnih antioksidativnih enzima, kao i smanjenje sadržaja neenzimskih antioksidanasa, može biti prepoznat u presimptomatskoj fazi brojnih bolesti. U tom smislu može biti pokazatelj izmijenjenih metaboličkih i funkcionalnih procesa (Đukić i sur., 2008).

1.4. Fenolni antioksidansi

1.4.1. Antioksidansi u hrani

Reaktivni kisikovi spojevi mogu su ukloniti nizom enzimskih i neenzimskih antioksidativnih mehanizama. Primjerice, enzim superoksid dismutaza pretvara kisikov superoksid u vodikov peroksid koji se dalje razgrađuje do vode i molekularnog kisika djelovanjem glutation peroksidaze ili katalaze u mitohondrijima ili lizosomima. Neenzimskim antioksidansima pripadaju vitamini (A, C, E), glutation, α-lipoična kiselina, karotenoidi, koenzim Q10, elementi u tragovima (bakar, zink i selen) (Johansen i sur., 2005). Razne studije su pokazale da konzumiranje hrane bogate tzv. prirodnim antioksidansima doprinosi jačanju obrambenog sustava ljudskog organizma. Zato je pozornost usmjerena na razvoj i izolaciju prirodnih antioksidansa iz biljnih izvora. Osim vitamina, prirodni antioksidansi mogu biti i fenolni spojevi (flavonoidi, fenolne kiseline i tanini) (Amarowicz i sur., 2004).

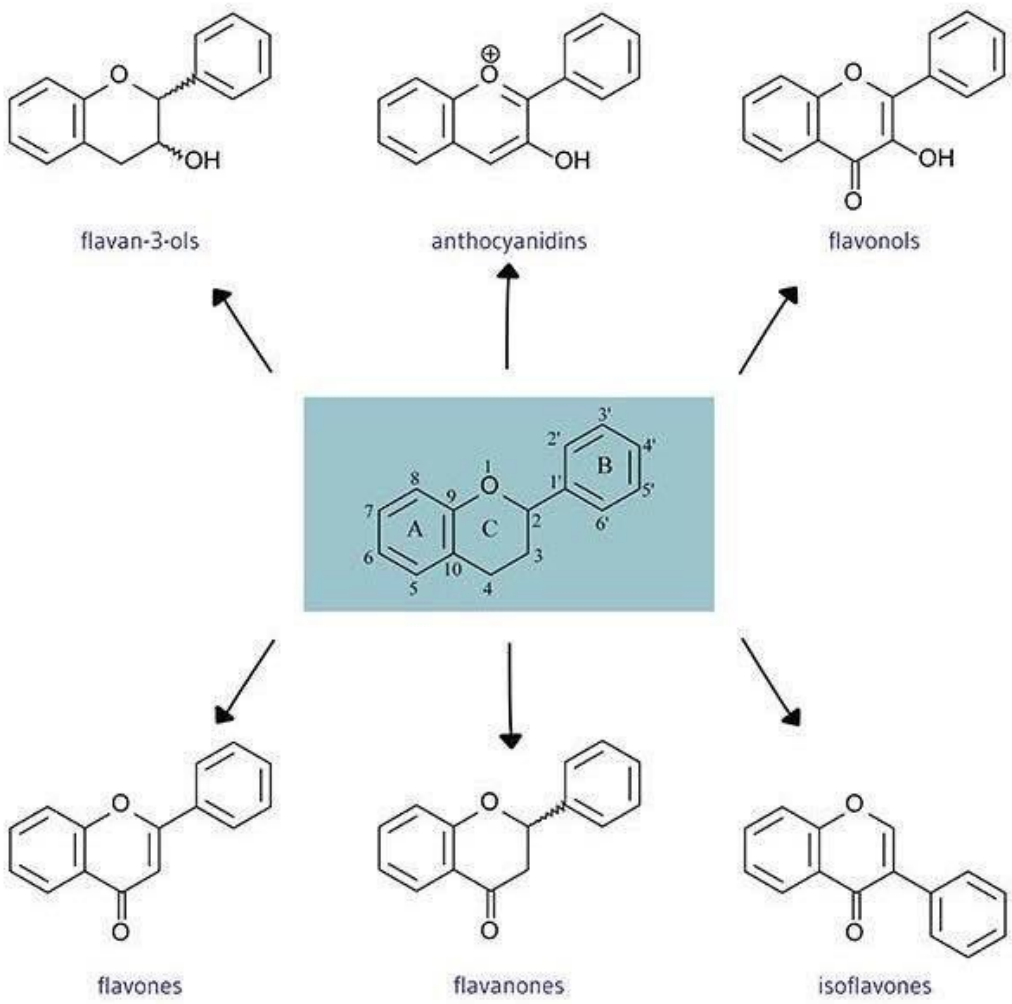
1.4.2. Polifenoli

Polifenoli su bioaktivni biljni produkti, raznolika skupina sekundarnih metabolita, koji su uključeni u brojne metaboličke procese. Najčešće su prisutni u listovima, cvjetovima i drvenastim dijelovima biljaka. Odgovorni su za organoleptička svojstva te nutritivnu kvalitetu voća i povrća. Fenolni spojevi su vrlo dobri antioksidansi i kelatori metala (Tapas i sur., 2008). Za visoku antioksidativnu aktivnost zaslužan je njihov redoks potencijal, pri čemu djeluju kao donori vodikovog atoma (Amarowicz i sur, 2004). Zastupljenost i razolikost fenolnih spojeva

u biljnom svijetu je velika. S obzirom na strukturne karakteristike polifenola, razlikujemo fenolkarboksilne kiseline i derivate, flavonoide, kumarine, lignane, trjeslovine i antranoide (Hänsel i Sticher, 2004).

1.4.3. Flavonoidi

Flavonoidi su niskomolekularni bioaktivni polifenoli. Široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu. Nalaze se u voću, povrću, orašastim plodovima, sjemenkama, čaju i vinu te imaju važnu ulogu u fotosintezi stanica (Sandhar i sur., 2011). U prirodi se nalaze najčešće u tri oblika, kao aglikoni, glikozidi te metilirani derivati. Aglikoni flavonoida se dijele, s obzirom na strukturu, na šest osnovnih skupina: flavanoni, flavoni, flavonoli, izoflavonoidi, antocijani i flavani. Njihove strukture su prikazane na Slici 3. Međusobno se razlikuju po strukturi laktonskog prstena (Tapas i sur., 2008)**.** Osnovnu jezgru aglikona flavonoida čini petnaest ugljikovih atoma, 2-fenil-benzo-γ-piranska jezgra, koja sadrži dva benzenska prstena povezana s heterocikličkim piranskim prstenom. Strukturne i funkcionalne razlike se temelje na hidroksilaciji, metoksiliranju i glikozilacija na različitim položajima. Antioksidativnu aktivnost određuje raspored i vrsta supstituenata, planarnost molekule te broj i vrsta vezanih šećera. Supstituenti, poput hidroksil, metil i acetil skupina se najčešće nalaze na položajima 5, 7, 3', 4' i 5'. *O* i *C*-glikozidi nastaju vezanjem šećera, uglavnom ramnoze, glukoze, glukuramnoze, galaktoze i arabinoze, na položajima 3 i 7 -OH aglikona za *O*-glikozide te 6,8 -*C* aglikona za *C*-glikozide (Sandhar i sur., 2011). Flavonoidi mogu spriječiti oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima na različite načine. Antioksidativna aktivnost se bazira na primanju nesparenih elektrona slobodnih radikala, doniranju vodikova atoma, keliranju iona prijelaznih metala, aktiviranju antioksidacijskih enzima, inhibiranju oksidaze i sinergističkom djelovanju s fiziološkim antioksidansima (Kazazić, 2004). Flavonoidi takodjer posjeduju antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antitrombotsko, antiviralno i antikancerogeno djelovanje (Nijveldt i sur., 2001).



Slika 3. Osnovna i glavne skupine flavonoida.

1.4.4. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline prisutne u biljnim drogama dijele se na derivate hidroksibenzojeve i derivate hidroksicimetne kiseline. U biljnom materijalu mogu biti u slobodnom obliku, u obliku estera ili glikozida. Osnovnu strukturu hidroksibenzojevih kiselina predstavlja C6-C1 jedinica, a hidroksicimetnih kiselina C6-C3, međusobne razlike proizlaze iz hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Saxena i sur., 2012). U biljnim drogama zastupljenije su hidroksicimetne kisline. Među njima su najučestalije kavena i kumarinska kiselina. Uglavnom se nalaze u obliku estera (npr. klorogenska i ružmarinska kiselina), a rjeđe u slobodnom

obliku (www.pharma.hr). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina povezana je s kiselom sredinom te brojem i položajem hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu. Hidroksicimetna kiselina je učinkovitiji antioksidans od hidroksibenzojeve zbog povećane mogućnosti delokalizacije elektrona fenoksi radikala (De Beer i sur., 2002).

1.5. Sideropenična anemija

Anemija se definira kao pad koncentracije hemoglobina ili/i hematokrita uz moguće smanjenje broja eritrocita i normalan ukupni volumen krvi (Kujundžić, 2003). Anemija zbog nedostatka željeza, sideropenična anemija, se smatra najčešćom od svih vrsta anemija. Željezo je mineral koji je prirodno prisutan u mnogim namirnicima biljnog i životinjskog porijekla, dostupan je i kao dodatak prehrani. Bitna je komponenta velikog broja proteina, uključujući enzime i hemoglobin, protein eritrocita koji prenosi kisik iz pluća do tkiva (Wessling-Resnick, 2014). Sastavni je dio i mioglobina, proteina koji dostavlja kisik mišićima (Aggett, 2012).

Željezo je potrebno za rast, razvoj, normalno stanično funkcioniranje, te sintezu određenih hormona i vezivnog tkiva (Murray-Kolbe i Beard, 2010). Većina elementarnog željeza od ukupne količine u organizmu, 3-4 grama, je pohranjeno u obliku hemoglobina. Preostalo željezo je u obliku feritina i njegovog razgradnog produkta (Wessling-Resnick, 2014; Institute of Medicine, 2001). Sadržaj željeza u organizmu je prilično stalan. Dnevno se gube male količine željeza putem mokraće, izmeta, probavnog trakta i kože. Za održavanje ravnoteže željeza u tijelu, odrasla osoba treba apsorbirati oko 1 mg/dan, dok za žene u zadnjem stadiju trudnoće ta vrijednost raste na 4,5 mg/dan (Institute of Medicine, 2001). Smatra se da 10-20% odraslih imaju negativnu bilancu željeza Prevalencija je veća kod mladih ljudi i trudnica.

Sideropenična anemija se razvija postepeno. U početku se manjak željeza nadoknađuje iz rezervi u organizmu, kada imamo fazu latentne sideropenije sa normalnim vrijednostima željeza u serumu, povećanim vrijednostima transferina i sniženim vrijednostima feritina u serumu. Dalje nastaje manifestna sideropenija sa iscrpljenim rezervama željeza i sniženim vrijednostima željeza u serumu. Normalne vrijednosti koncentracije hemoglobina su zbog anaboličkog učinka androgena manje u odraslih žena, nego u muškaraca, a u trudnica su, zbog

povećanog volumena plazme, još dodatno smanjene. Normalne vrijednosti koncentracije hemoglobina su za muškarce 135-155 g/l, a za žene 120-140 g/l. Značajniji hemodinamski poremećaji se ne javljaju dok koncentracija hemoglobina ne padne ispod 100-110 g/l. Ovakva anemija može biti opasna za osobe s dodatnim poremećajima koji smanjuju oksigenaciju tkiva i organa, kao što su koronarna ili cerebrovaskularna bolest, odnosno kronična opstruktivna plućna bolest. Kada koncentracija hemoglobina padne ispod 70-80 g/l značajni hemodinamski poremećaji se javljaju u većine bolesnika. Manjak željeza nastaje uslijed nedovoljnog unosa u organizam ili prekomjernog gubitka iz organizma. Uzroci nedovoljnog unosa željeza su neodgovarajuća prehrana ili malapsorpcija, a uzroci prekomjernog gubitka kronično krvarenje, trudnoća, dojenje, intravaskularna hemoliza i infestacija parazitima (Labar i sur., 1998). Simptomi i znakovi svake anemije, pa tako i sideropenične, mogu se podijeliti u tri skupine. Prvu čine simptomi i znakovi smanjene oksigenacije tkiva i organa. To su umor, slabost, zaduha, nepodnošenje napora, bljedoća. Drugu skupinu čine simptomi i znakovi reakcije organizma na nastali poremećaj, kao što su palpitacije, tahikardija, ubrzano disanje, funkcionalni šum nad aortom. U treću skupinu spadaju simptomi i znakovi uzrokovani poremećajem koji je do anemije doveo, u ovom slučaju manjkom željeza. To su glavobolja, parestezije i žarenje u jeziku. Jačina simptoma slabo korelira s težinom anemije (Killip i sur., 2007).

1.5.1. Preparati željeza u terapiji sideropenične anemije

Sideropeničnu anemiju treba liječiti medicinskim pripravcima željeza. Peroralna terapija je najjednostavniji, najjeftiniji i najbezopasniji način nadoknade željeza. Pripravci za peroralnu primjenu se mogu podijeliti na one s ionskim željezom i organske komplekse željeza (Alleyne i sur., 2008). Budući se kationi željeza apsorbiraju u gornjem dijelu probavnog trakta i to bolje ako su u dvovalentnom (fero) obliku, treba izbjegavati retard pripravke i one s trovalentnim (feri) željezom. Apsorpcija dvovalentnog željeza je jednaka bez obzira radi li se o sulfatu, fumaratu ili kojoj drugoj soli pa liječenje načelno treba provoditi najjednostavnijim i najjeftinijim pripravkom. Koliko će primijenjenog željeza bolesnik apsorbirati ovisi o težini sideropenije. Anemični bolesnici apsorbiraju obično 10% željeza, oni

s teškom sideropeničnom anemijom i do 20%, a bolesnici s latentnom sideropenijom tek 5% ili manje (Cook, 1994). Apsorpcija dvovalentnog željeza je pod malim utjecajem prehrambenih čimbenika. Apsorpcija trovalentnog željeza ovisi o njegovoj topljivosti u kiselom mediju želuca (Raja i sur., 1987; Wollenberg i Rummel 1987), prisustvu fero-reduktaze u mukoznim stanicama na površini duodenuma. Prehrana bogata askorbinskom kiselinom povećava apsorpciju trovalentnog željeza, stvarajući kelate željeza manje molekulske mase (Han i sur., 1995). Bolju apsorpciju i manje nuspojava imaju pripravci s organskim kompleksima željeza. Oni se apsorbiraju posebnim transportnim mehanizmima, neovisnima o prijenosniku ionskog željeza. Njihova apsorpcija prelazi 10% pa je potrebna dnevna doza elementarnog željeza manja. Budući da malo željeza ostaje u crijevu, a i ono je čvrsto vezano u kompleks, gastrointestinalne nuspojave su rjeđe (Landucci i Frontespezi, 1987). Željezo je dostupno u mnogim dodacima prehrani, u obliku multivitaminskih ili multimineralnih dodataka. Takvi preparati, posebno oni namijenjeni ženama, sadrže 15 mg željeza, što čini 100% preporučene dnevne doze. Preparati koji sadrže samo soli željeza sadržavaju i do 360% preporučene dnevne doze. Najčešće su u obliku Fe (III) sulfata, glukuronata, fumarata i citrata (Murray-Kolbe i Beard, 2010; Manoguerra, 2005). U Hrvatskoj je primjerice kao lijek registriran željezov (III) kompleks s polimaltozom za oralnu te s izomaltozidom za intravensku primjenu (http://www.halmed.hr/). Visoke doze željeza u obliku dodataka prehrani mogu uzrokovati gastrointestinalne probleme poput mučnine i opstipacije (Institute of Medicine, 2001).

1.6. Analitičke metode

1.6.1. UV-Vis spektroskopija

Spektrofotometrija u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra (UV-Vis) primjenjuje se u identifikaciji, ispitivanju čistoće i određivanju sadržaja aktivnih i pomoćnih ljekovitih tvari. Načelo UV-Vis metode je molekulska apsorpcijska spektrofotometrija. Temelji se na mjerenju količine apsorbiranje svjetlosti u ultraljubičastom (190-380 nm) i vidljivom području (380-800 nm). Apsorpcijom svjetlosti određene valne duljine dolazi do prijelaza

elektrona iz osnovnog u jednu od vibracijskih i rotacijskih razina pobuđenog elektronskog energijskog stanja. Primjena UV-Vis spektrofotometrije u kvalitativnoj analizi lijekova temelji se na činjenici da energija osnovnog i pobuđenog stanja elektrona ovisi o strukturi molekule. Valna duljina pri kojoj molekula apsorbira ovisi o jakosti kojom su vezani njezini elektroni u nezasićenim funkcionalnim skupinama koje apsorbiraju u ultraljubičastom i vidljivom području. Spektar se dobiva kontinuiranim mijenjanjem valne duljine u području od 200 nm do 400 nm za ultraljubičasto, odnosno od 400 nm do 800 nm za vidljivo područje, te usporednim bilježenjem intenziteta izlazne zrake. Takav će spektar imati jedan ili više apsorpcijskih maksimuma koji odgovaraju pojedinim prijelazima elektrona u pobuđeno stanje (Nigović i sur., 2014).

1.6.2. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska spektroskopija (AAS) koristi se u analizi metala i metaloida. Temelj atomske apsorpcijske spektroskopije je pobuda elektrona u vanjskoj ljusci metalnog atoma tj. prijelaz slobodnog atoma u više energetsko stanje, na primjer apsorpcijom toplinske energije ili energije zračenja. Energetske razlike ovih prijelaza su određene atomskom strukturom elementa budući da je energija emitiranog ili apsorbiranog fotona karakteristična za element. Kako svaka vrsta atoma može postojati samo u stanjima definirane energije atomi mogu apsorbirati fotone definirane energije odnosno valne duljine. To znači da apsorbirani mogu biti samo fotoni onih valnih duljina koje odgovaraju linijama atomskog apsorpcijskog spektra elementa. U plamenoj AAS plamen je apsorbirajući medij, jer sadrži neutralne atome u osnovnom energetskom stanju. Koncentracija elemenata u ispitivanoj tvari odredi se mjerenjem intenziteta apsorpcije zračenja pri određenoj valnoj duljini koja je karakteristična za ispitivani element. Količina apsorbiranog zračenja je proporcionalna broju slobodnih atoma u plamenu (Watson, 1999).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U liječenju i preventivi sideropenične anemije koriste se soli željeza u koncentraciji koja nekoliko puta premašuje preporučenu dnevnu dozu. Ovisno o obliku soli, te pri koncentracijama većim od preporučene dnevne doze, željezo može izazvati mučnine i opstipacije. Pri tako visokim koncentracijama željeza dolazi do proizvodnje slobodnih radikala te nastanka oksidativnog stresa i njegovog štetnog učinka. Otkad je čovječanstva, biljne droge i njihove iscrpine, primjenjuju se u terapiji različitih vrsta bolesti. Pekmez od autohtone sorte jabuke samoniklice tradicionalno se, na bosansko-hercegovačkim prostorima, koristi kao dodatak prehrani u liječenju sideropenične anemije. Cilj ovog rada je ispitati opravdanost dugogodišnje tradicije primjene pekmeza u zdravstvene svrhe. Ovim radom ispitana su dva uzorka, pekmez i sok, od iste sorte jabuke, samoniklice da bi se usporedio njihov sastav i utvrdila potencijalna primjena u terapiji nedostatka željeza. Atomskom apsorpcijskom spektroskopijom određena je količina željeza dok je ukupna količina šećera određena spektrofotometrijski. Kako visoke koncentracije željeza i šećera koji se nalazi u pripravcima mogu uzrokovati stanje oksidativnog stresa, utvrđena je koncentracija fenolnih antioksidansa u njima. Ispitana je ovisnost između količine tih spojeva i antioksidativnog djelovanja. Antioksidativna aktivnost je ispitivana pomoću dvije različite metode: reakcijom s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnim radikalom i ispitivanjem kelacijske aktivnosti, te uspoređena s aktivnostima butiliranog hidroksianisola (BHA), kvercetina i etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA). Veliki problem prilikom uzgoja voća i povrća u okolici industrijskih gradova je prisutnost teških metala u tlu koji mogu preći u hranu. Stoga je u uzorcima određena količina teških i ostalih metala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJAL ZA ISPITIVANJE

3.1.1. Biljni materijal

Materijal za ispitivanje se sastojao od svježih plodova jabuke samoniklice Malus domestica, Borkh. Rosaceae ubranih na području Tuzle (BiH) i pekmeza dobivenim ukuhavanjem soka. Kako bi se olakšalo izvođenje kemijskih pokusa pekmez je razrijeđen deset puta.

3.1.2. Kemikalije

Za ispitivanja su korištene sljedeće kemikalije: destilirana voda, kloroform, metanol; natrijev karbonat, Folin-Ciocalteauov reagens, sulfatna kiselina aluminijev klorid heksahidrat, natrijev hidroksid, ferozin, fenol kvercetin dihidrat, *tert*-butil-4-hidroksianisol (BHA), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), nitrit-molibdat, kloridna kiselina, željezov (II) sulfat heptahidrat, galna kiselina monohidrat, kalij bromat, kalij bromid, kloridna kiselina, natrij borhidrid, natrij hidroksid, Sve kemikalije su bile p.a. čistoće. Standardna otopina žive bila je koncentracije oko 1000 mg/L s iskazanom mjeriteljskom sljedivošću do SI jedinica i mjernom nesigurnošću za čistoću u 0.5 mol/L HNO_3.

3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: precizna vaga (Sartorius GM 312, Njemačka), spektrofotometar (Perkin-Elmer, SAD), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital 10P, Bandelin eletronic, Njemačka), vodena kupelj (INKO, Hrvatska), rotavapor (Büchi, Njemačka), UV/VIS Perkin Elmer Lambda 25 Spektrofotometar, The ELAN® DRC-e Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Atomic Absorption Spectrometer FIMS 400s Flow Injection Mercury System, Thermo Scientific Solaar iCE™ 3500 Atomic Absorption Spectrometer.

3.2. METODE ISPITIVANJA

3.2.1. Priprema soka

Jabuke su, neoguljene, oprane i samljevene u multipraktiku te ručno ocijeđene. Dobiveni sok je filtriran preko vate i takav korišten u ispitivanju.

3.2.2. Određivanje suhe tvari u uzorcima

Količina suhe tvari određena je prema Općem propisu Farmakopeje (Eur. Ph. V). Na vodenoj kupelji je 1,7 ml ekstrakta uparen do suha, a ostatak osušen u sušioniku na 100-105 °C 3 sata. Suhi ostaci su ohlađeni u eksikatoru 2 sata i odvagnuti. Rezultat je izražen kao maseni udio.

3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola

Određivanje polifenolnih spojeva u ekstraktima rađeno je prema modificiranom propisu po Singletonu (Singleton i sur., 1999). Sok i otpina pekmeza su otpipetirani u epruvetu te je dodana voda do volumena od 1 ml. Zatim je u epruvetu dodano 1 ml Folin-Ciocaltau reagensa (prethodno razrijeđenog s vodom u omjeru 1:3) te 1 ml 10 %-tne otopine natrijevog karbonata. Nakon jednosatne inkubacije na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 760 nm uz slijepu probu koja je umjesto uzorka sadržavala vodu. Količina ukupnih polifenola određena je pomoću baždarnog pravca galne kiseline.

3.2.4. Određivanje flavonoida

Sadržaj flavonoida je određen prema modificiranom literaturnom propisu Kumazava i suradnika (Kumazava i sur., 2004; Woisky i Salatinno 1998). Sok i otopina pekmeza su otpipetirani u epruvetu te je dodan metanol do volumena od 2,4 ml. Na kraju je dodano 1,2 ml

0,2 % otopine $AlCl_3$ u metanolu. Uzorci su stajali na tamnom mjestu 1 sat, a potom im je izmjerena apsorbancija na 420 nm. Za svaki uzorak pripremljena je i slijepa proba koja umjesto uzorka sadržavala metanol. Sadržaj flavonoida određen je pomoću baždarnog pravca kvercetina dihidrata.

3.2.5. Određivanje fenolnih kiselina

Sadržaj fenolnih kiselina određen je prema općem propisu Farmakopeje (Eur. Ph. V). Sok i otpina pekmeza su otpipetirani u epruvetu te dodana voda do volumena od 1 ml. Zatim su redom dodani reagensi: 0,5 ml 0.5 M kloridne kiseline, 0,5 ml nitrit-molbidatnog reagensa (2,5 g natrijevog nitrita i 2,5 g natrijevog molbidata otopljeno je u 25 ml vode) te 0,5 ml 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida. Slijepa proba za svaki uzorak napravljena je tako da je 1 ml uzorka razrijeđeno destiliranom vodom do 2,5 ml. Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je odmah na 505 nm. Maseni udio derivata hidroksicimetne kiseline izražen kao ružmarinska kiselina izračunat je prema izrazu:

$$W\ (\text{mg/g}) = A \times 25 / m$$

gdje je:

-*A* apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm

-*m* masa droge (g)

3.2.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu (Yen i Chen, 1995). Priređene su metanolna otopina BHA koncentracije 0,2 mg/ml i svježa metanolna otopina DPPH koncentracije 0,2 mg/ml. Sok i otpina pekmeza su otpipetirani u epruvetu te je dodan metanol do volumena od 2,6 ml. Dodano je 1,4 ml otopine DPPH, te je nakon trideset minuta čuvanja na tamnom mjestu izmjerena apsorbancija na 545 nm. Kao negativna kontrola korištena je smjesa metanola i DPPH, a pozitivna kontrola su bili BHA i askorbinska kiselina. Slijepa proba je bio metanol. Moć hvatanja slobodnih radikala (Radical scavenging activity,

RSA) izračunata je kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka otopine uzoraka i apsorbancije otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka, prema formuli:

$$RSA = (1 - A_U/A_D) \times 100$$

gdje je:

- A_U apsorbancija otopine DPPH nakon dodatka otopine uzorka
- A_D opsorbancija otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka (kontrola)

3.2.7. Određivanje kelirajuće aktivnosti

Određivanje je izvršeno prema modificiranom literaturnom propisu (Decker i Welch, 1990). Sok i otpina pekmeza su otpipetirani u epruvetu te dodan metanol do volumena od 1,3 ml. Dodano je 1,5 ml metanolne otopine $FeSO_4$ koncentracije 0,25 mmol/l. Sve je dobro promiješano. Nakon pet minuta inkubacije reakcija je pokrenuta dodatkom 500 µl vodene otopine ferozina koncentracije 1 mmol/l. Otopine su snažno promiješane. Nakon deset minuta stajanja na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 562 nm. Negativna kontrola sadržavala je sve osim otopine uzorka. Umjesto njega dodan je metanol do ukupnog volumena 3,3 ml. Kao pozitivna kontrola korištene su je otopine EDTA i kvercetina. Kelirajuća aktivnost (KA) izražena je u postotcima inhibicije:

$$KA = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje je:

- A_0 apsorbancija negativne kontrole
- A_1 apsorbancija u prisutnosti uzorka

3.2.8. Određivanje ukupnih šećera

Ukupni šećeri su određeni prema modificiranom literaturnom propisu (Dubois i sur., 1956). Priređene su otopine oba uzorka u koncentraciji 0,1 mg/ml. U 2 mL tako pripremljenih otopina dodano je 1 ml 5%-tnog fenola i 5 ml koncentrirane sulfatne kiseline. Uzorci su prvo stavljeni 10 minuta na sobnu temperaturu, a zatim 15 minuta na vodenu kupelj temperature 30°C, te se količina ukupnih šećera odredila spektroskopski, mjerenjem apsorbancije na 485 nm. Sadržaj ukupnih šećera je određen pomoću baždarnog pravca otopine glukoze 50 μg/ml.

3.2.9. Određivanje koncentracije Fe^{2+} iona

Određivanje je izvršeno prema modificiranom literaturnom propisu (Decker i Welch, 1990). Sok i otpina pekmeza (3 ml) otpipetirani su u epruvetu te dodano 500 μl vodene otopine ferozina koncentracije 1 mmol/l. Otopine su snažno promiješane. Nakon deset minuta stajanja na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 562 nm u odnosu na slijepu probu koja nije sadržavala ferozin. Koncentracija Fe^{2+} iona je određena iz baždarnog pravca za $FeSO_4$.

3.2.10. Određivanje teških metala

Određena je količina esencijalnih teških metala: bakar, krom i željezo, te količina neesencijalnih: živa, arsen, kadmij u uzorku soka, u koncentraciji 0,961 g u 50 ml, i uzorku pekmeza koncntracije 0,904 g u 50 ml. Olovo, kadmij, arsen, krom i aluminij određeni su ICP-MS (induktivno spregnuta plazma s masenim detektorom) tehnikom, živa je određena hidridnom tehnikom (tehnika hladnih para), bakar, cink i željezo plamenom tehnikom. Uzorci su oslobođeni od matriksa mikrovalnom digestijom uzorka u zatvorenom sustavu pri visokom tlaku. Koncentracije metala određene su iz baždarnih pravaca pomoću otopina metala poznate koncentracije.

Tehnika hladnih para se primjenjuje za određivanje žive u različitim uzorcima. Volumen žive uzet za analizu je 500 μl. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini 253,7 nm.

Atomska apsorpcijaska plamena tehnika za određivanje željeza, bakra i cinka uz primjenu odgovorajuće lampe za svaki metal. Mjeri se apsorbancija na 248,3 nm. Volumeni uzoraka se kontinuirano aspiriraju.

Induktivno spregnuta plazma s masenim detektorom se primjenjuje za kvalitativno i kvantitativno određivanje tragova elemenata u različitim plinovitim i tekućim uzorcima. Prije pristupanja mjernju radi se dnevna provjera rada instrumenta. U dnevnoj provjeri parametara s otopinom u kojoj se nalazi 10 μgl^{-1} Mg, In i U moraju se postići preporučene vrijednosti od strane proizvođača. Linearnost metode na ICP-MS-u ispitana je mjerenjem koncentracije kalibracijskih otopina pet koncentracijskih nivoa. Iz dobivenih rezultata se odredi jednadžba pravca i koficijent korelacije.

3.2.10. Statistička obrada podataka

Sva određivanja su rađena u triplikatu, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Sadržaj aktivnih tvari i antioksidativna aktivnost izražen je prema količini suhe tvari u uzorku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje suhe tvari u uzorcima

Količina suhe tvari u ispitivanim uzorcima prikazana je u Tablici 1. Iz dobivenih rezultata može se uočiti da je količina suhe tvari u pekmezu znatno veća što je s obzirom na način pripreme uzoraka i očekivano. Pekmez je dobiven višestrukim ukoncentriravanjem soka.

Tablica 1. Količina suhe tvari u uzorcima soka i pekmeza.

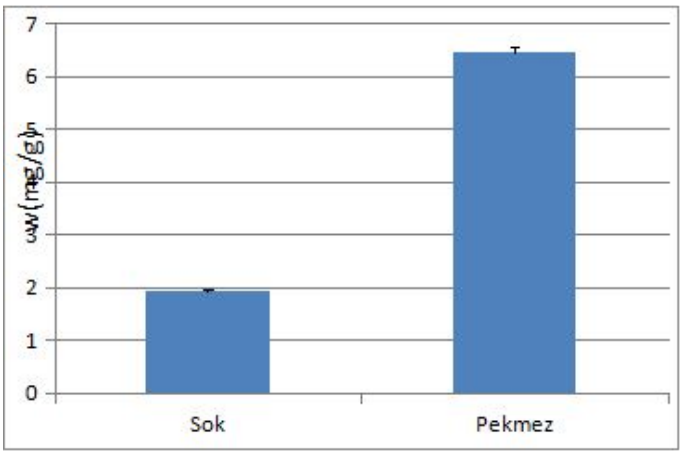
Suha tvar (g/mL)	
Sok	Pekmez
0.167	0.676

4.2. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli u ekstraktima određeni su pomoću Folin-Ciocalteu reagensa koji s reducirajućim fenolnim spojevima stvara kromogene spojeve čiji se intenzitet obojenja može mjeriti spektrofotometrijski. Iako kemijska struktura Folin-Ciocalteu reagensa nije potpuno razjašnjena, pretpostavlja se da se sastoji od fosfomolibdenskih i fosfovolframskih heteropoli kiselina koje su žute boje. Prisustvom fenola u bazičnom reakcijskom mediju dolazi do redukcije molibdena te nastaje Mo-W kompleks koji oboji reakcijsku smjesu u plavo.

$$\text{Mo (VI) (žuta boja)} + e^- \rightarrow \text{Mo (V) (plava boja)}$$

Intezitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini 720 nm (Huang i sur., 2005). Količina ukupnih fenola prisutnih u ekstraktima je prikazana na Grafu 1.

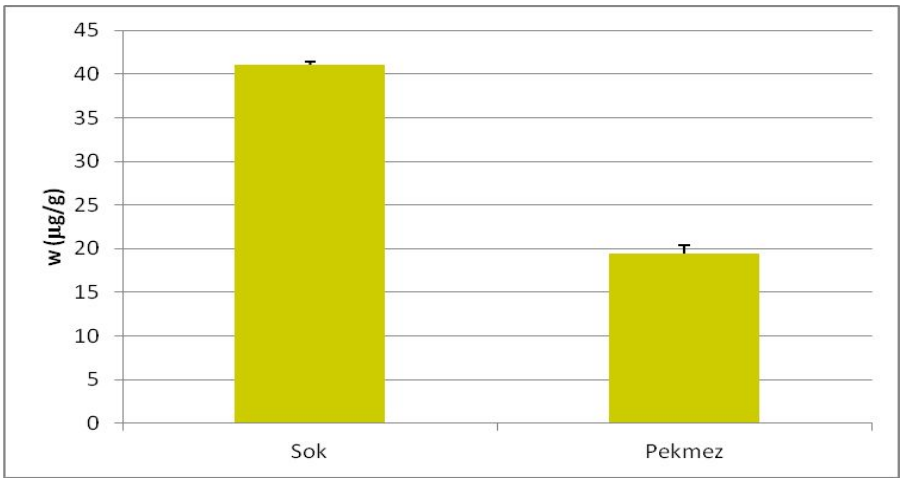


Graf 1. Količina ukupnih polifenola u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD).

Iz Grafa 1 može se uočiti da oba uzorka, i sok i pekmez, sadrže relativno male količine polifenola, te da ih u pekmezu ima u trostruko većoj koncentraciji. To vodi do zaključka da se dio glikozidnih veza hidrolizira prilikom zagrijavanja pri čemu se oslobađaju i fenolne skupine čime postaju dostupne za reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom.

4.3. Određivanje flavonoida

Određivanje se temelji na reakciji flavona i flavonola s aluminijevim ionima iz reakcijske smjese pri čemu dolazi do formiranja kelata i obojenja reakcijske smjese u žuto što se može pratit mjerenjem apsorbancije na 420 nm. Ukupna količina flavonoida je prikazana na Grafu 2.

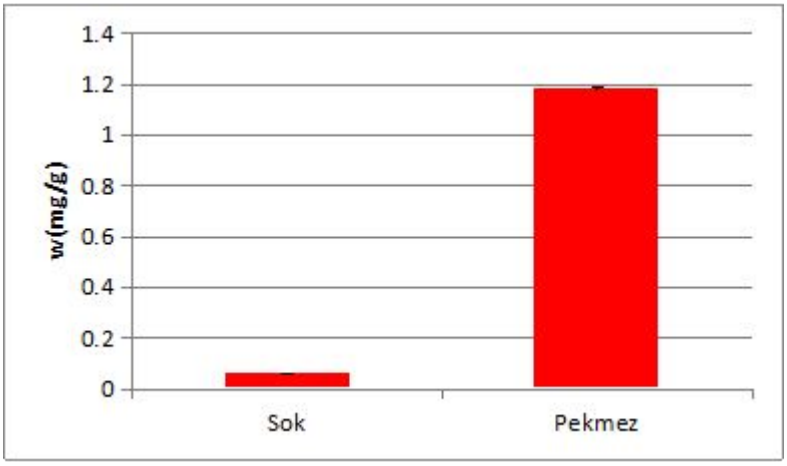


Graf 2. Količina ukupnih flavonoida u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD).

Iz Grafa 2 je vidljivo da uzorak soka sadrži više flavonoida nego uzorak pekmeza što nije u skladu s količinom ukupnih polifenola. Razlog tome je bi mogla biti oksidativna razgradnja reaktivnih flavonoida pri povišenoj temperaturi. Uzorak pekmeza ima malu količinu flavonoida iako su imali veću količinu ukupnih polifenola. Očito se u ovom uzorku radi o drugačijoj vrsti polifenolnih spojeva.

4.4. Određivanje fenolnih kiselina

U biljnim drogama su od fenolnih kiselina najzastupljenije hidroksicimetne kisline (C6-C3) koje se međusobno razlikuju prema hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena. Određivanje ovih spojeva se temelji na prisutnosti *o*-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidoksicimetnih derivata koji s nitrit-molibdat reagensom daju žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine s NaOH, žuta boja prelazi u narančastocrvenu i tad se apsorbancija mjeri na 505 nm. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, izražen kao ružmarinska kiselina, izračuna se pomoću specifične apsorbancije koja za ružmarinsku kiselinu iznosi 400 (www.pharma.hr).

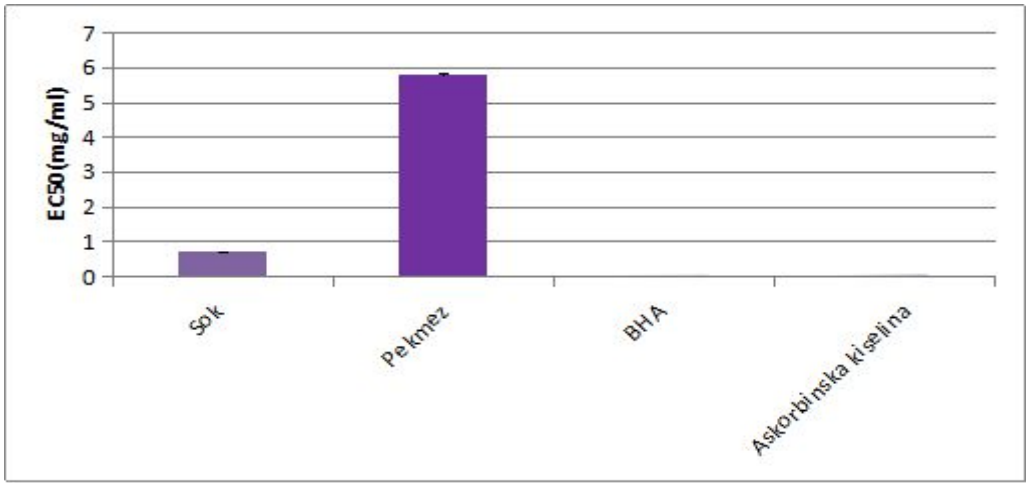


Graf 3. Količina fenolnih kiselina u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD).

Iz Grafa 3 je vidljivo da veću količinu ekstrahiranih fenolnih kiselina ima pekmez što je s obzirom na rezulatate ukupnih polifenola i očekivano, budući pekmez ima veću količinu ukupnih polifenola. Takav rezultat ukazuje i na to da većinu polifenola u uzorcima samoniklice čine derivati fenolnih kiselina.

4.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti

U određivanju je korišten slobodni radikal DPPH koji je vrlo pogodan za *in vitro* ispitivanja antiradikalne aktivnosti. Metoda se temelji na redukciji stabilnog DPPH radikala u prisustvu antioksidansa. Za razliku od hidroksilnog radikala i superoksid aniona, na njega ne utječu sporedne reakcije, poput kelacije metalnih iona i enzimske inhibicije. Svježe pripremljena otopina DPPH ima intenzivnu ljubičastu boju s apsorpcijskim maksimumom na 517 nm. Antioksidansi koji ulaze u reakciju s DPPH doniraju vodik ili elektron i pri tome ga prevode u bezbojni produkt 2,2-difenil-1-hidrazin ili slične supstituirane hidrazine. Pri tome isčezava intenzivna ljubičasta boja, što dovodi do pada apsorbancije na 517 nm. Veći pad apsorbancije odgovara većoj antiradikalnoj aktivnosti (Amarowicz i sur., 2004). Rezultati ovog određivanja u Grafu 4 prikazani su kao EC_{50}, a to je vrijednost koja označava količinu ekstrakta koja hvata 50 % slobodnih DPPH radikala prisutnih u otopini. Dakle, antiradikalno djelovanje ekstrakta je bolje što je EC_{50} vrijednost manja.

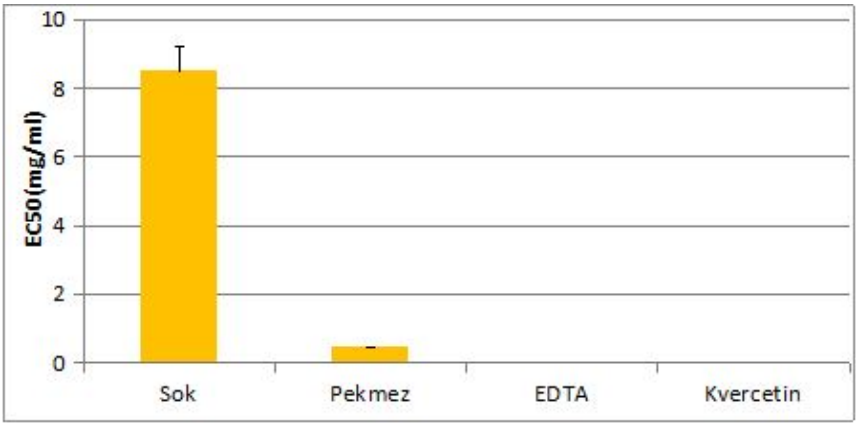


Graf 4. Antiradikalna aktivnost uzoraka u usporedbi s BHA kao standardom (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD).

Prema rezulataima prikazanim u Grafu 4 uzorak jabukovog soka je pokazao je veću antiradikalnu aktivnost u usporedbi s pekmezom. Takav rezultat bi mogao ukazivati na to da se antiradikalna aktivnost temelji na prisustvu flavonoida, budući da uzorak soka imao veću količinu flavonoida nego polifenola. Ipak i pekemz i sok bili su znatno slabije djelotvorni od standardnih antioksidansa, BHA i askorbinske kiseline.

4.6. Određivanje kelirajuće aktivnosti

Kod ispitivanja kelirajuće aktivnosti ekstrakata dolazi do keliranja iona Fe^{2+} iz kompleksa s ferozinom u otopini u kompleks s biljnim kelatorom koji ne apsorbira na 562 nm. Sposobnost kelacije izražava se u postocima smanjenja apsorbancije u odnosu na negativnu kontrolu koja sadrži sve osim ekstrakta i stoga ima maksimalnu apsorbanciju jer je sav Fe^{2+} ušao u kompleks s ferozinom. Kao pozitivna kontrola korištena je EDTA koji je jak kelator Fe^{2+} i kvercetin, koji je malo slabiji kelator. Rezultati određivanja kelirajuće aktivnosti prikazani su na Grafu 5. kao EC_{50} vrijednost, a to je koncentracija koja izaziva uklanjanje 50 % Fe^{2+} iona iz kompleksa s ferozinom, odnosno uzrokuje smanjenje apsorbancije otopine za pola. Stoga, što je EC_{50} manja ekstrakt je bolji kelator Fe^{2+} iona .

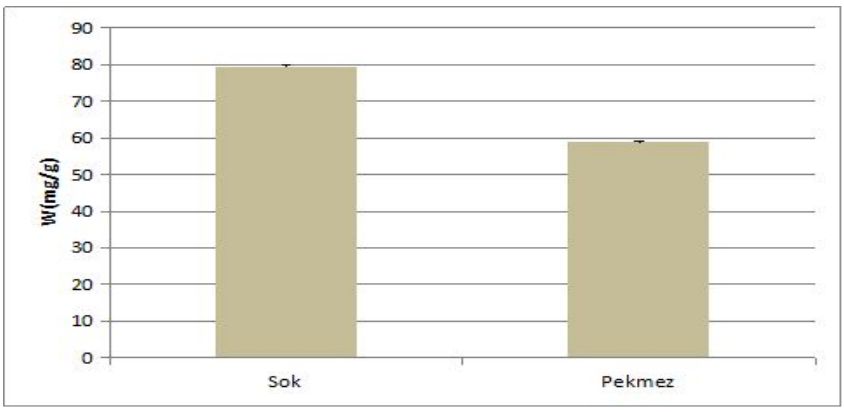


Graf 5. Kelirajuća aktivnost ekstrakata u usporedbi s EDTA i kvercetinom kao standardima (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD).

Iz Grafa 5 vidljivo je da oba uzorka pokazuju znatno manju sposobnost keliranja, naročito uzorak soka, u usporedbi sa standardima korištenim u ovom radu, kvercetinom i EDTA. Ova reakcija je osjetljiva na prisutnost iona željeza u uzorku na način da se aktivnost uzorka prividno smanjuje povećanjem količine fero iona u njemu.

4.7. Određivanje ukupnih šećera

Određivanje se temelji na reakciji slobodne reducirajuće skupine šećera s fenolom i sulfatnom kiselinom te obojenju reakcijske smjese u žuto-narančasto što se može pratiti mjerenjem apsorbancije na 485 nm. Reakcija je osjetljiva a boja je stabilna.

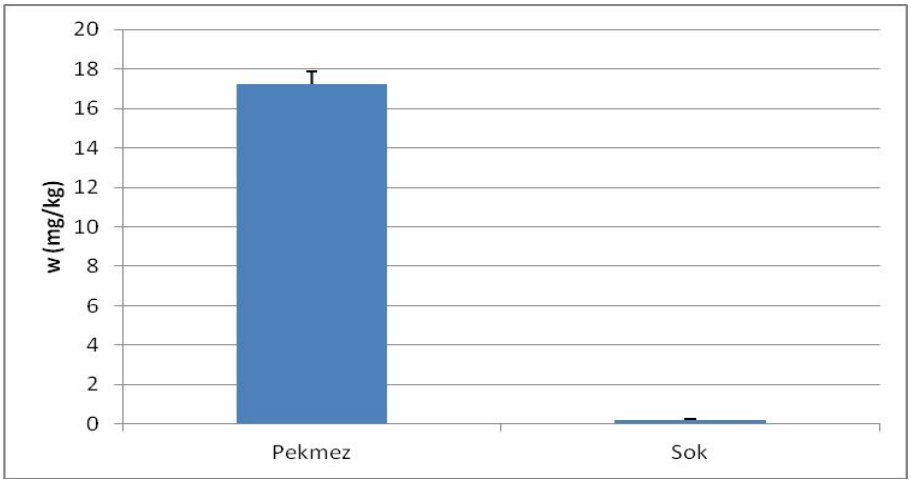


Graf 6. Količina šećera u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD).

Iz Grafa 6 se može uočiti da je količina šećera nešto veća u uzorku soka u usporedbi sa uzorkom pekmeza. To dovodi do zaključka da je prilikom ukuhavanja pekmeza u bakrenoj posudi došlo do oksidacije i razgradnje glukoze pri povišenoj temperaturi.

4.8. Određivanje koncentracije Fe^{2+} iona

Određivanje se temelji na keliranju dvovalentnog željeza pri čemu nastaje kompleks s ferozinom. Rezultati su prikazani na Grafu 7. U ovoj reakciji može reagirati samo željezo koje se ne nalazi u kompleksima koji ga vežu jače od ferozina.



Graf 7. Količina iona dvovalentnog željeza u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD).

Iz grafa 7 je razvidno da je količina slobodnog dvovalentnog željeza u suhoj tvari pekmeza znatno veća nego u soku. Moguće je da neki od snažnih kelatora željeza u soku prilikom ukuhavanja gube kelirajuća svojstva pri čemu ono postaje dostupno za reakciju s ferozinom.

4.9. Određivanje teških metala

Tehnika hladnih para zasniva se na osobini žive da ima jako visok napon pare na sobnoj temperaturi te da je stabilna. Jednovalentna i organska živa se oksidiraju u dvovalnetnu živu s $KBrO_3$ i KBr. Pomoću natrij-borhidirida u kiseloj sredini se reducira u elementarni oblik. Određivanje koncentracije bakra, cinka i željeza u uzorcima pekmeza i soka temelje se na mjerenju intenziteta apsorpcije zračenja pri valnoj duljini koja je karakteristična za ispitivani

element. Količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je broju slobodnih atoma u plamenu. ICP-MS kombinira izvor visoke temperature s masenim spektrometrom. Dolazi do ionizacije atoma ispitivanih elemenata koji se dalje razdvajaju i detektiraju masenim spektrofotometrom na osnovu masa njihovih iona.

Tablica 2. Količina željeza i ostalih teških metala dobivena atomskom apsorpcijskom spektroskopijom u uzorku soka i pekmeza i najviša dopuštena količinom teških metala u voćnim sokovima.

Metali	Količina (mg kg^{-1})		Najviša dopuštena količina teških metala u voćnim sokovima (mg kg^{-1}) *
	sok	pekmez	
Fe	9,42	7,30	15,0
Cd	<0,01	<0,01	0,03
As	<0,03	<0,03	0,20
Hg	<0,01	<0,01	0,02
Cr	<0,1	<0,1	n.p.
Al	11,6	14,4	n.p.
Cu	<0,1	<0,1	5,0
Pb	0,08	0,10	0,05

*Prema (Narodne Novine, 2005); n.p. – nije propisano

U Tablici 2 uspoređena je količina željeza i ostalih teških metala dobivena atomskom apsorcijskom spektroskopijom u uzorku soka i pekmeza s najviše dopuštenom količinom teških metala u voćnim sokovima (Narodne Novine, 2005). Dobiveni rezultati analize sadržaja teških metala u oba uzorka ukazuju na činjenicu da količine olova znatno premašuju dozvoljenu količinu. Moguće objašnjenje ovako visokim količinama ovog teškog metala u plodu jabuke je industrijsko zagađenje vode, tla i zraka. Budući su teški metali veoma postojani, cjelokupan iznos njihovih emisija iz prirode i tehnoloških aktivnosti čovjeka dospijeva u tlo i vodu. Olovo u tim količinama dovodi do negativnog učinka na krvožilni, imunološki sustav te bubrege. Posebice se akumulira u kostima. Prilikom trudnoće i dojenja povećava se mobilnost iz kostiju, koje onda kroz placentu i majčino mlijeko prelazi na nerođeno dijete odnosno dojenče. Uzrokuje oštećenja nervnog sustava, posebice kod fetusa i

male djece (Vasić-Rački, 2010). Tradicionalno se dnevno uzima jedna jušna žlica, 15 ml, pekmeza na tašte, čime se unosi 0,11 mg željeza. To je znatno manje od preporučene dnevne doze od 18 mg/dan, te u toj količini unos pekmeza ne zadovoljava dnevne potrebe za željezom, naročito u liječenju sideropenične anemije. Uzorak soka sadrži nešto veću količinu željeza, ali također, znatno manju od preporučene dnevne doze.

Novija istraživanja predviđaju dnevni unos kroma u količini 0,025-0,2 mg/dan. Zajednički FAO/WHO ekspertni odbor za aditive u hrani (JEC-FA) utvrdio je vrijednost provizornog toleriranog tjednog unosa (PTWI) od 1 mg/kg tjelesne mase, koja predstavlja ukupni unos aluminija (Galić, 2010). Iz dobivenih vrijednosti za količinu aluminija i kroma te u usporedbi s ovim vrijednostima, možemo zaključiti da su količine ovih teških metala u ispitivanim uzorcima, te preračunato na količinu dnevnog unosa, ispod toleriranih vrijednosti te ne predstavljaju opasnost za zdravlje.

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da ispitivani uzorci pekmeza i soka sadrže vrlo male količine ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina zaduženih za antioksidativno i kelirajuće djelovanje. Količina polifenola u pekmezu je trostruko veća, dok je količina flavonoida veća u uzorku soka što ukazuje na negativan utjecaj temperature i moguću oksidativnu razgradnju flavonoida. U skladu s dobivenim vrijednostima dokazana je i slaba antioksidativna aktivnost pri čemu je aktivnost soka bila nešto veća od one pekmeza. Količina željeza u uzorku pekmeza, preračunata s obzirom na dnevni unos, je znatno manja od preporučene dnevne doze od 18 mg/dan, te u toj količini ne zadovoljava dnevne potrebe za željezom, naročito, u liječenju sideropenične anemije. Količina olova u uzorcima premašuje zakonom propisanu količinu. Količine ostalih ispitivanih teških metala u granicama propisanima zakonom. Rezultati dobiveni u okviru ovog rada ukazuju na to da tradicija primjene pekmeza od jabuka samoniklica u prevenciji i terapiji anemije, nije opravdana, a s obzirom na količinu olova u uzorcima mogla bi imati i štetne posljedice.

6. LITERATURA

Alleyne M, Horne MK, Miller JL. Individualized treatment for iron deficiency anemia in adults. *Am J Med,* 2008, 121, 943-948.

Aggett PJ. Iron. U: Present Knowledge in Nutrition. Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH. Washington DC, Wiley-Blackwell, 2012, str. 506-20.

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem,* 2004, 84, 551-562.

Beširević V. Autohtone jabuke i kruške sa prostora Bosne i Hercegovine. Tuzla, Harfo-graf, 2009, str. 73.

Cook JD. Iron deficiency anemia. *Baillieres Clin Haematol*, 1994, 7, 787-804.

De Beer D, Joubert E, Gelderblom W.C.A, Manley M. Phenolic Compounds: A Review of Their Possible Roles as In Vivo Antioxidants of Wine. *S Afr J Enol Vitic*, 2002, 23, 48-61.

Decker EA, Welch B. Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*, 1990, 38, 674–677.

Dubois M, Gilles KA,Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem,* 1956, 28, 350-354.

Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative Stress - Clinical Diagnostic Significance. *Journal of Medical Biochemistry*, 2008, 27, 409-425.

European Pharmacopoeia, Fifth Edition (Eur.Ph. 5,0), Vol.1, Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2004, str. 222.

Galić K. Metali i slitine. U: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Katalenić M, Dimitrov N, Klapec T. Osijek, Hrvatska agencija za hranu, 2010, str. 151-153.

Han O, Failla ML, Hill AD, Morris ER, Smith JC. Reduction of Fe(III) is required for uptake of nonheme iron. *J Nutr*, 1995, 125, 1291–1299.

Hänsel R, Sticher O. Pharmakognosie Phytopharmazie. Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 2004, str. 664-8, 736-737.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem,* 2005, 53, 1841-1856.

Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode, 2015, http://www.halmed.hr/, pristupljeno 14.06.2016.

Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc: a Report of the Panel on Micronutrients. Washington DC, National Academy Press, 2001, str. 290-393

Jašić M, Spahić E, Sarvan E. Stanje i perspektive razvoja tipičnih proizvoda sjeveroistočne Bosne i Hercegovine. Gradačac-Modriča, Nezavisni biro za razvoj, 2012, 36-37.

Johansen SJ, Harris KA, Rychly JD, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *BioMed Central*, 2005, 2-4.

Kanlić K, Kanlić Dž, Bečić J, Obuća S, Hubanić M, Zupčić M. Autohtone sorte voćaka istočne Bosne. Fojnica, Štamparija Fojnica, 2010, str. 113.

Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol,* 2004, 55, 279-290.

Killip S, Bennett JM, Chambers MD. Iron deficiency anemia. *Am Fam Physician,* 2007, 75, 671-678.

Kujundžić M. Klinička patofiziologija za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003, str. 17-27.

Kumazawa S, Hasamaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*, 2004, 84, 329-339.

Labar B, Hauptmann E. Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 118-122.

Landucci G, Frontespezi S. Treatment of iron deficiency conditions in blood donors: controlled study of iron sulphate versus iron protein succinylate. *J Int Med Res,* 1987, 15, 379-382

Manoguerra AS, Erdman AR, Booze LL, Christianson G, Wax PM, Scharman EJ. Iron ingestion: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila)* 2005, 43, 553-570.

Murray-Kolbe LE, Beard J. Iron. U: Encyclopedia of Dietary Supplements. Coates PM, Betz JM, Blackman MR. London-New York, Informa Healthcare, 2010, str. 432-438.

Nigović B, Grubešić JR, Rodriguez VJ, Turk MA, Sertić M. Analitika lijekova-praktikum. Zagreb, Faramaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 36-40.

Nijveldt RJ, Nood van E, Hoorn van ECD, Boelens PG, Norren van K, Leeuwen van PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications 1' 2' 3. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 418-423.

Pravilnik o toksinima, metalima, metaloidima te drugim stetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani, 2005, Zagreb, Narodne novine, broj 16 (NN/16/05).

Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ. Comparison of Fe3+ uptake in vitro and in vivo by mouse duodenum. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 901, 52–60.

Sandhar KH, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Sciencia,* 2011, 1, 25-26.

Saxena M, Saxena J, Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 2012, 16, 130-134.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and antioxidans by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 1999, 299, 152-178.

Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res,* 2008, 7, 1090-1091.

Vasić-Rački Đ. Industrijske onečišćujuće tvari. U: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Katalenić M, Dimitrov N, Klapec T. Osijek, Hrvatska agencija za hranu, 2010, str. 61.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz farmakognozije I, 2008, http://www.pharma.hr, pristupljeno 26. 04. 2016.

Watson DG. Atomic spectrophotometry. U: Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 126.

Wessling-Resnick M. Iron. U: Modern Nutrition in Health and Disease. Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler RG. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2014, str. 176-188.

Wollenberg P, Rummel W. Dependence of intestinal iron absorption on the valency state of iron. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1987, 336, 578–582.

Woisky RG, Salatinno A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res*, 1998, 37, 99-105.

Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agr Food Chem*, 1995, 43, 27-37.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Pekmez od autohtone sorte jabuke samoniklice tradiocionalno se na bosansko-hercegovačkim prostorima koristi za jačanje organizma, podizanje imuniteta te kao prirodno sredstvo u liječenju sideropenične anemije, naročito u trudnoći. Iako su sok i pekmez potencijalno bogati željezom i fenolnim antioksidansima, visoka količina željeza i šećera u njima može biti povezana s oksidativnim stresom a plod jabuke može biti onečišćen teškim metalima iz okoliša. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati opravdanost primjene soka i pekmeza jabuke samoniklice u prevenciji i terapiji sideropenične anemije te procijeniti korist i rizike koje takva primjena može donijeti. Za tu svrhu spektrofotometrijski je određen sastav fenolnih antioksidansa, antiradikalna i kelirajuća aktivnost uzoraka te količina šećera, dok je atomskom apsorpcijskom spektroskopijom određena količina željeza i teških metala. Utvrđeno je da ispitivani uzorci pekmeza i soka sadrže relativno male količine fenolnih antioksidansa, te relativno slabu antiradikalnu i kelirajuću aktivnost. Količina željeza u 15 ml pekmeza, koliko se tradicionalno uzima, je znatno manja od preporučene dnevne doze od 18 mg/dan. Nadalje, pronađeno je da količina olova odstupa od zakonom propisanih vrijednosti što može imati negativne učinke na organizam, naročito u trudnoći i dojenju. Rezultati rada upućuju na to da uporaba pekmeza od samoniklice u prevenciji i terapiji sideropanične anemije nije opravdana.

Jam of indigenous varieties of *samoniklica* apple is traditionally used in Bosnia and Herzegovina for strengthening the body, improving immunity and as a natural remedy for the treatment of iron deficiency, especially in pregnancy. Although juice and jam are potentially rich in iron and phenolic antioxidants, a high amount of iron and sugar in them may be associated with oxidative stress. Furthermore, apples could be contaminated with heavy metals from the environment. Therefore, the aim of this study was to examine the justifiability of juice and apple jam use in the prevention and treatment of iron deficiency anemia, and assess the benefits and risks of such an application. For this purpose, the composition of phenolic antioxidants, antiradical and chelating activity of the samples as well as the amount of sugar, were determined spectrophotometrically, while the atomic absorption spectroscopy was used to assess the quantity of iron and heavy metals. It was found that the tested samples contain relatively small amounts of phenolic antioxidants, and show relatively weak antiradical and chelating activity. The amount of iron in 15 ml of jam, which is traditionally taken for iron deficiency, contains much lower dose of iron than the recommended daily dose of 18 mg/day. Furthermore it was found that the lead content deviates from the value prescribed by law, which can have negative effects on the organism, especially in pregnancy and lactation. The results demonstrate that the use of *samoniklica* jam in the prevention and treatment of iron deficiency anemia is not justified.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za Farmakognoziju
Marulićev trg 20/2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ODREĐIVANJE I USPOREDBA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI I SADRŽAJA ŽELJEZA U SOKU I PEKMEZU PLODA JABUKE SAMONIKLICE

Mirjana Amidžić

SAŽETAK

Samoniklica predstavlja autohtonu bosanskohercegovačku sortu jabuke. Pekmez od jabuke samoniklice, tradicionalno se na bosansko-hercegovačkim prostorima, koristi kao dodatak prehrani za jačanje organizma i imuniteta te u liječenju sideropenične anemije. Iako su sok i pekmez potencijalno bogati željezom i fenolnim antioksidansima, visoka količina željeza i šećera u njima može biti povezana s oksidativnim stresom a plod jabuke može biti onečišćen teškim metalima iz okoliša. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati opravdanost primjene soka i pekmeza jabuke samoniklice u prevenciji i terapiji sideropenične anemije te procijeniti korist i rizike koje takva primjena može donijeti. Za tu svrhu spektrofotometrijski je određen sastav fenolnih antioksidansa, antiradikalna i kelirajuća aktivnost uzoraka te količina šećera. Antioksidativna aktivnost je ispitivana pomoću dvije različite metode: reakcijom s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnim radikalom, i ispitivanjem kelacijske aktivnosti, te uspoređena s aktivnostima butiliranog hidroksianisola (BHA), kvercetina i etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA). Atomskom apsorpcijskom spektroskopijom određena je količina željeza i teških metala. Utvrđeno je da ispitivani uzorci pekmeza i soka sadrže relativno male količine fenolnih antioksidansa, te relativno slabu antiradikalnu i kelirajuću aktivnost. Količina željeza u 15 ml pekmeza, koliko se tradicionalno uzima, je znatno manja od preporučene dnevne doze od 18 mg/dan. Nadalje, pronađeno je da količina olova odstupa od zakonom propisanih vrijednosti što može imati negativne učinke na organizam, naročito u trudnoći i dojenju. Rezultati rada upućuju na to da uporaba pekmeza od samoniklice u prevenciji i terapiji sideropanične anemije nije opravdana.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 40 stranica, 7 grafičkih prikaza, 2 tablica i 42 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Malus domestica*, autohtone sorte, antioksidativna aaktivnost, želejzo, anemija, teški metali

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić** *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Mario Jug, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana-Marija Domijan, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DETERMINATION AND COMPARSION ANTIOXIDANT ACTIVITY AND IRON CONTENT IN THE JUICE AND JAM OF SAMONIKLICA APPLE FRUIT

Mirjana Amidžić

SUMMARY

Samoniklica represnts an indigenous bosnian-herzegovinian variety of apple. Jam of indigenous varieties of *samoniklica* apple is traditionally used in Bosnia and Herzegovina for strengthening the body, improving immunity and as a natural remedy for the treatment of iron deficiency, especially in pregnancy. Although juice and jam are potentially rich in iron and phenolic antioxidants, a high amount of iron and sugar in them may be associated with oxidative stress. Furthermore, apples could be contaminated with heavy metals from the environment. Therefore, the aim of this study was to examine the justifiability of juice and apple jam use in the prevention and treatment of iron deficiency anemia, and assess the benefits and risks of such an application. For this purpose, the composition of phenolic antioxidants, antiradical and chelating activity of the samples as well as the amount of sugar, were determined spectrophotometrically.The antioxidant activity was assayed using two different methods: by reaction with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical chelating activity and examination, and compared with the activities of butylated hydroxyanisole (BHA), quercetin, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The atomic absorption spectroscopy was used to assess the quantity of iron and heavy metals. It was found that the tested samples contain relatively small amounts of phenolic antioxidants, and show relatively weak antiradical and chelating activity. The amount of iron in 15 ml of jam, which is traditionally taken for iron deficiency, contains much lower dose of iron than the recommended daily dose of 18 mg/day. Furthermore it was found that the lead content deviates from the value prescribed by law, which can have negative effects on the organism, especially in pregnancy and lactation. The results demonstrate that the use of *samoniklica* jam in the prevention and treatment of iron deficiency anemia is not justified.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 40 pages, 7 figures, 2 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Malus domestica,* indigenous variety, antioxidant activity, iron, anemia, heavy metals

Mentor: **Marijana Zovko Končić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić**, **Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Jug, **Ph.D.** *Associate Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana-Marija Domijan, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2016.