Određivanja sastava bobičastog voća kromatografskim i spektrofotometrijskim metodama

Pšeničnik, Silvia

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:742381

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SILVIA PŠENIČNIK

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

ODREĐIVANJE SASTAVA BOBIČASTOG VOĆA KROMATOGRAFSKIM I SPEKTORFOTOMETRIJSKIM METODAMA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: Dr. sc. I. Juranović Cindrić, izv. prof.

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	18. svibnja 2017.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	12. srpnja 2017.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	22. rujna 2017.

Mentor rada: Dr. sc. I. Juranović Cindrić, izv. prof. Potpis:

Sadržaj

§Sažetak……...……iv

§ 1. Uvod.....6

§ 2. Prikaz odabrane teme.....6

2.1 Bobičasto voće…….

2.2. Kemijski sastav bobičastog voća..... 10

2.2.1. Polifenolni spojevi..... 11

2.2.2. Analitičke metode za odvajanje i analizu polifenolnih spojeva..... 15

2.2.3.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva 15

2.2.3.2. Spektrofotometrijske metode..... 16

2.2.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 21

§ 3. Literaturna vrela.....25

§ Sažetak

Danas, kada se sve veći broj ljudi okreće zdravoj prehrani i zdravom načinu života, vrlo je važno istražiti što neku namirnicu čini zdravijom od drugih. Bobičasto voće je važna zdrava namirnica jer sadrži veliki broj različitih sastojaka s pozitivnim utjecajem na zdravlje ljudi. Radi toga se bobičasto voće često naziva „supervoćem“. Ovaj rad je pregled najvažnijih svojstava i sastava pet vrste voća: borovnice, aronije, akai i goji bobica te drenjine određenih analitičkim metodama koje se najčešće koriste. Također, u radu je dan pregled najvažnijih svojstava polifenola, jedne od najvažnijih skupina prirodnih spojeva koji pozitivno utječu na naš organizam te pregled najvažnijih metoda za određivanje njihovog antioksidacijskog kapaciteta.

§ 1. Uvod

Pojam „supervoće“ podrazumijeva određene voćne vrste značajne nutritivne vrijednosti i antioksidacijskih svojstava, privlačnog okusa i arome. Neke vrste supervoća su: borovnica, aronija, kupina, malina, brusnica, crni i crveni ribizl, dud, crvena naranča, jagoda, akai bobice te goji bobice. Posebnost supervoća je u bogatstvu različitih kemijskih spojeva poput vitamina, minerala, fenolnih spojeva, antocijanina, vlakna, itd. Zbog velikog udjela polifenolnih spojeva s dobrim antioksidacijskim svojstvima, vitamina te ostalih nutrijenata značajno doprinose zdravlju ljudi. Njihovom se konzumacijom smanjuje rizik od koronarnih i srčanih bolesti. Svježi plodovi bobičastog voća se osim za jelo upotrebljavaju za pripravu raznih prerađevina poput marmelade, džema, pekmeza, slatkog, želea, kompota, čaja, vina i rakije. Sastav i djelovanje bobičastog supervoća se intenzivno proučava u velikom broju znanstvenih istraživanja, ali još uvijek nisu razjašnjeni svi mehanizmi djelovanja na ljudski organizam. Pri istraživanju bobičastog voća koriste se različite analitičke metode, a njihov izbor najčešće ovisi o analitu koji se proučava.

§ 2. Prikaz odabrane teme

U ovom Završnom radu dan je pregled najvažnijih analitičkih metoda za analizu sastava polifenolnih spojeva i određivanje antioksidacijskog kapaciteta „supervoća“. Na temelju dostupnih literaturnih podataka odabrane su vrste voća koje su najvažniji predstavnici „supervoća“: borovnica, aronija, akai bobica, goji bobica te drenjina. Navedene su njihove osnovne karakteristike i po zdravlje najvažnije sastavnice, a kemjski sastav je uspoređen s dostupnim literaturnim podatcima za druge vrste bobičastog voća.

2.1. Bobičasto voće

Konzumacija voća i povrća preporučuje se u gotovo svim prehrambenim smjernicama, a unos voća, važan je u sprečavanju različitih bolesti i zdravstvenih poremećaja.[1]

Borovnica je mali, višegodišnji, listopadni grm. Listovi su zelene boje, a plodovi ljubičasti (Slika 4). Bobice borovnica jedu se svježe ili se suše i kao takve koriste za pripravu čajeva, u medicini i kulinarstvu. Plodovi borovnice sadrže: šećer, tanine, vitamine B i C, karotin, mirtilin (daje ljubičastu boju), albuminoid, pektin, minerale, proteine te organske kiseline kao što su: limunska, jabučna, benzojeva te oksalna kiselina. Medicinska upotreba borovnica je važna pri liječenju bolesti jetre i žuči, dijareje, dizenterije, ateroskleroze, problema s cirkulacijom te dijabetesa.



Slika 1: Borovnica[2]

Aronija je listopadni grm, ponekad oblikovana kao manje drvo s bobicama crvene, crne i tamnoljubičaste boje, karakterističnog trpkog okusa (Slika 5).



Slika 2: Aronija[3]

Bobice aronije su vrlo zdrave i koriste se u kulinarstvu i medicini. Od sušenih bobica aronije pripravlja se čaj, a od svježih bobica džem, vino i sok. U medicini se koriste kao prirodni lijek protiv želučanih i crijevnih tegoba, utječu na sastav i cirkulaciju krvi, snižavaju kolesterol i krvni tlak te djeluju protuupalno.[4,5,6]

Aronija ja bogata i flavonoidima koji su antioksidansi, kao što su primjerice karoten, lutein i zeaksantin. Zeaksitin djelomično spriječava prodiranje UV zrake i na taj način štiti oči od degenerativnih bolesti, posebice u starijoj dobi. Bobice aronije sadrže šećer, jabučnu kiselinu, pektin, tanin, važan su izvor kalija, željeza i mangana, te sadrže i kalcij, magnezij, željezo, jod, bakar, cink, kobalt, krom, aluminij, selen, nikal, stroncij, olovo i bor.Aronija je također dobar izvor mnogih vitamina, poput vitamina C, vitamina A, vitamina E, betakarotena i folne kiseline. Konzumacija 100 g svježih bobica osigurava oko 35% dnevne preporučene doze vitamina C.[7]

Akai je vrsta palme iz porodice *Euterpe*, a uzgaja se zbog jestivih plodova akai bobica. Raste u srednjoj i južnoj Americi u pretežno močvarnim i vodom prekrivenim područjima. Plod joj je mala, okrugla, crno-ljubičasta bobica veličine do 25 milimetara, izgledom slična grožđu (Slika 6).



Slika 3: Akai bobice[8]

Raste u velikim i razgranatim grozdovima na kojima bude i po 900 plodova. Koristi se smrznuta pulpa, sok ili vino. Zbog velikog udjela prehrambenih vlakana, fitosterola, aminokiselina i nezasićenih masnih kiselina, akai pomaže pri očuvanju zdravlja kardiovaskularnog i probavnog sustava. Akai sadrži deset puta više antocijanina (snažni antioksidans) nego crno grožđe. Jača otpornost prema nekim bolestima, te štiti od degenerativnih bolesti i raka.

Goji ili kustovica drvenasta je grmolika biljka s bobičastim plodom čokoladnog okusa (Slika 7). Rabi se kao ukrasna biljka te u kineskoj kuhinji i tradicionalnoj kineskoj medicini. Goji bobice danas su jedna od najpoznatijih vrsta „*supervoća*“ u svijetu. Bogate su

polifenolnim spojevima, aminokiselinama, esencijalnim masnim kiselinama, vitaminom C, željezom te u manjem udjelu mnogim drugim korisnim nutrijentima.



Slika 4: Svježe i sušene goji bobice[9]

Zbog svog kemijskog sastava, goji bobice imaju široki spektar pozitivnog učinka na zdravlje. Primjerice, jačaju imunološki sustav, usporavaju proces starenja organizma, štite od bolesti srca i krvnih žila, štite vid, reguliraju rad mokraćnog sustava, djeluju antibakterijski i antiupalno, poboljšavaju cirkulaciju te štite od dijabetesa.

Plodovi drijenka - drenjine u zrelosti poprime slatkasto - kiseli okus i mogu se jesti svježi kao ukusno voće. Jestivi dio drijenka je usplođe koje okružuje sjemenku, a koriste se za pripravu pekmeza, marmelada, kompota, sirupa, voćnih sokova, voćnih jogurta i drugih poslastica. U Europi, drenjine imaju prehrambenu i kozmetičku primjenu, zamjenjujući sintetske astrigene tvari, a potvrđeno je da imaju zatezajući učinak na ten.[10]



Slika 5: Drenjina - plod drijenka[11]

Drenjine sadrže tanine, šećere, organske kiseline, pektine, fenole, antocijanine i druge antioksidanse.[11,12]

2.2. Kemijski sastav bobićastog voća

Općenito, najvažnije razlike u kemijskom sastavu voća ovise o vrsti, botaničkoj pripadnosti, načinu uzgoja, vrsti tla i klimi. Sastav se mijenja i sa stupnjem zrelosti prije branja, uvjetima dozrijevanja, koje je progresivnije nakon berbe i na koje utječu uvjeti i način skladištenja. Kemijski sastav voća ima utjecaj na prehrambenu i tehnološku vrijednost voća. Prehrambena vrijednost voća je nutritivna vrijednost, a tehnološka vrijednost je važna pri odabiru tehnološkog postupka koji će se primijeniti, načinu prerade i očekivanim karakteristikama konačnog proizvoda. Pod kemijskim sastavom podrazumijeva se udio svih sastojaka u proizvodu uključujući i vodu. Komponente kemijskog sastava količinom i međusobnim odnosima utječu na nutritivna i biološka svojstva proizvoda. Kemijski i mehanički sastav specifičan je za svaku vrstu i sortu. S tehnološkog stajališta kemijski sastav se najjednostavnije određuje kao ukupni udio suhe tvari (ostatak nakon što se ukloni voda). Kvalitetnijima se smatraju one sorte voća koje imaju veći udio suhe tvari. Udio suhe tvari kod bobičastog voća je 10 - 20 %. Voće koje sadrži više suhe tvari je bolja sirovina jer ima veću hranjivu vrijednost i bolja nutritivna svojstva. Veći udio suhe tvari omogućava ekonomičnu, kvalitetniju proizvodnju posebno onih proizvoda za koje su točno propisani udjeli suhe tvari kao što su džem, marmelada, koncentrirani i sušeni proizvodi.[13,14]

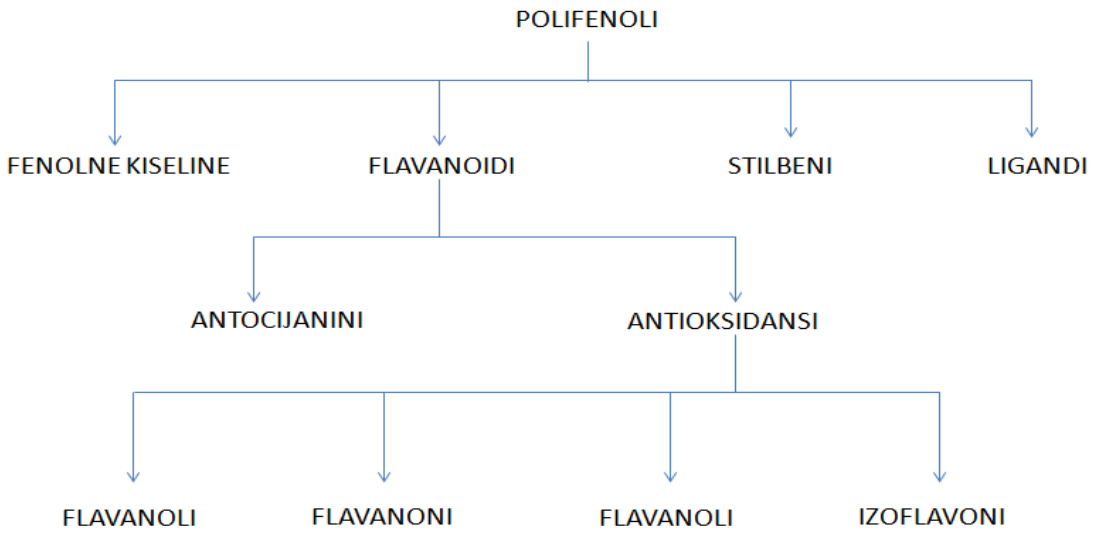
Bobičasto voće se najčešće konzumira svježe ili smrznuto, ali se i obrađuje i konzumira u obliku raznih proizvoda uključujući konzervirano i sušeno voće, pića, jogurte, džemove i želee.[1] U današnje vrijeme, prehrambeni proizvodi prije upotrebe moraju zadovoljiti niz kriterija kvalitete te je potrebno da ti proizvodi budu visokokvalitetni s vrlo jasno definiranim svojstvima. Prema kriterijima kvalitete, autentičnost bobičastog voća i dosljednost prerade njihovih produkata vrlo je bitna za njihovu prodaju.[15]

Bobičasto voće sadrži veliki udio vode (veći od 70 %), malo proteina (manji od 3,5 %) i vrlo malo masti (manji od 0,5 %). Voće je i važan izvor energije jer sadrži veliki udio ugljikohidrata, nakon vode najzastupljenijih spojeva (primjerice udio ukupnog šećera kreće se 4,7 - 9,5 %). Ugljikohidrati su prisutni u obliku probavljivog škroba i šećera i neprobavljive celuloze i vlakana. Osim navedenih spojeva, bobičasto voće je i važan izvor elemenata. Sastav elemenata u bobičastom voću je od velike važnosti jer njihova koncentracija utječe na kvalitetu voća, organoleptičke karakteristike i stabilnost.[16] Udio mikro- i makroelemenata u voću je najčešće u rasponu 0,2 - 0,8 %. U najvećem udjelu prisutni su fosfor, kalij, kalcij, magnezij, željezo, mangan, bakar, natrij i aluminij.[1] Svježi plodovi crnog ribiza, jagode,

maline, kupine i borovnice sadrže veliki udio kalcija (150–350 mg/kg), kalija (0,5–3,2 g/kg) i mangana (12–39 mg/kg).[17,18,19] Bakar, željezo, cink, mangan i selen važni su kofaktori enzima ili sudjeluju u enzimskim reakcijama koje pridonose ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti bobičastog voća (npr. superoksid-dismutaza, SOD; glutation-peroksidaza, GSH-Px). Veliki udio vitamina C imaju svježi plodovi crnog ribiza (0,7–2,8 g/kg) i jagoda (oko 0,6 g/kg).[19]

2.2.1. Polifenolni spojevi

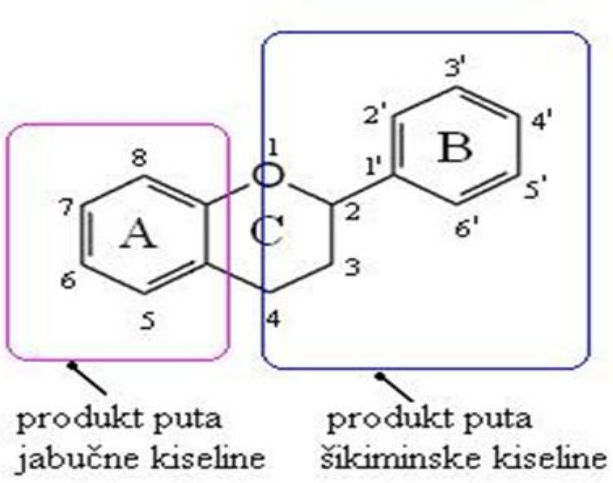
U najvažnije biaktivne tvari sadržane u bobičastom voću pripadaju polifenoli. Polifenolni spojevi su spojevi prisutni u svim višim biljkama od kojih su najbrojniji flavonoidi među kojima je do danas poznato više od 10000 spojeva. Svakodnevno se unose u ljudski organizam hranom (voće i povrće) i pićima biljnog porijekla (kava, čaj, voćni sokovi). Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka i važni su za obranu biljaka od UV zračenja i napada nametnika. Biološki učinci ovih spojeva na ljudsko zdravlje i molekularni mehanizmi tih učinaka predmet su intenzivnih istraživanja u svijetu posljednjih desetljeća. Najvažnije skupine polifenola prisutnih u bobičastom voću su flavonoidi (antocijanini, flavonoli, flavanoli), stilbeni (rezveratrol), tanini (proantocijanidini, elagitanini, galotanini) i pojedine fenolne kiseline (hidroksibenzojeva kiselina i derivati hidroksicinamične kiseline).[20] Polifenolni spojevi klasificiraju se u različite skupine, ovisno o broju fenolnih prstena koje sadrže i ovisno o strukturnim elementima koji međusobno povezuju prstene te se na temelju toga dijele na podskupine (Slika 1).



Slika 6: Podjela polifenola[21]

Tamno obojeno bobičasto i jagodasto voće iz porodica *Ericaceae* (borovnice), *Rosaceae* (kupina, malina, trešnja, višnja, jagoda) te *Caprifoliaceae* (bobice bazge) sadrži veći udio polifenola u usporedbi s drugim različitim vrstama voća.[22,23] Najvažnije skupine polifenola prisutne u ovom voću su flavonoli, flavan-3-oli, antocijanini te proantocijanidini.

Flavonoidi, najbrojnija podskupina polifenolnih spojeva općenito se smatraju najkorisnijim spojevima u voću. Osnovna strukturna formula flavonoida sastoji se od dva fenilna prstena i jednog heterocikličkog prstena, a prikazana je na Slici 2.



Slika 7: Osnovna podjela flavonoida[24]

Razlike između pojedinih flavonoidnih podskupina proizlaze iz razlike u broju i rasporedu hidroksilnih i metoksilnih skupina, te prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikolizacije s monosaharidima ili oligosaharidima. Glikolizacija kod flavonoida događa se najčešće na položaju 3-aromatskog prstena C, a rjeđe na položaju 7-aromatskog prstena A (Slika 2).

Istraživanja su pokazala da su flavonoidi dobri "hvatači" slobodnih radikala, te da imaju protubakterijsko, sedativno, antialergijsko, antimutageno i protuvirusno djelovanje.[25,26,27,28] Zbog navedenih svojstava kao lijekovi imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Farmaceutska industrija proizvodi veliki broj pripravaka koji utječu na poboljšanje i očuvanje ljudskog zdravlja, a koriste se i pri uspješnom liječenju brojnih oboljenja.

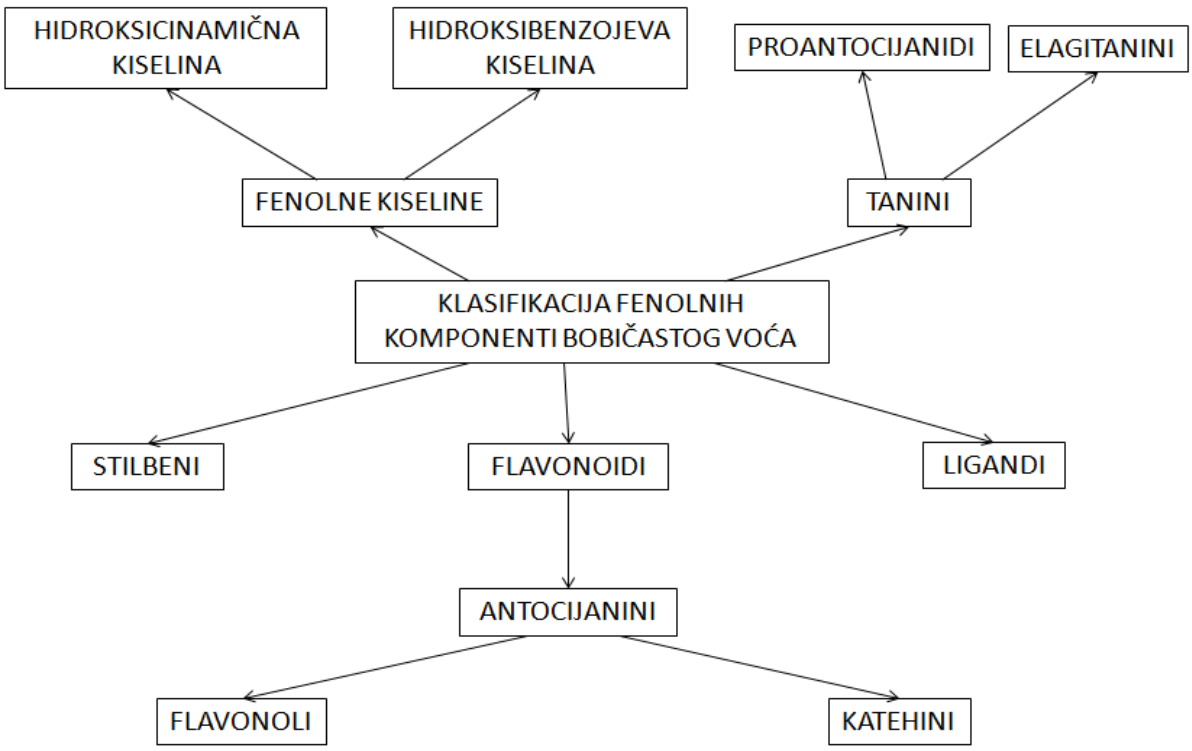
Poznato je da polifenolni spojevi značajno pridonose ukupnom antioksidacijskom kapacitetu voća. Usprkos velikom broju istraživanja, do danas nije potpuno istraženo koliki je doprinos pojedinih skupina polifenolnih spojeva ili pojedinačnih polifenolnih spojeva ukupnom antioksidacijskom kapacitetu voća.[26]

Antioksidansi su kemijske tvari koje imaju svojstvo da doniraju elektron slabim radikalima, oksidiraju se i na taj način neutraliziraju reaktivne tvari bez utjecaja na fiziološke funkcije organizma, a da pri tome i sami ne postaju nestabilni. Najpoznatiji prirodni antioksidansi su: vitamin A, vitamin C, vitamin E, bioflavonoidi, betakaroten i selen. Oštećenja stanica izazvana slobodnih radikalima značajna su za razvoj kardiovaskularnih i malignih oboljenja. Neravnoteža između antioksidansa i reaktivnih kisikovih vrsta rezultira oksidativnim stresom, što dovodi do oštećenja stanica. Oksidativni stres može biti povezan s raznim bolestima i starenjem. Osim antioksidansa, protiv oksidativnog stresa sudjelujui i flavonoidi, od kojih su posebno važni flavanoli i flavoni.

Antocijanini su flavonoidi topljivi u vodi, biljni pigmenti, a boja im značajno ovisi o vrijednosti pH. Iako se nalaze u gotovo svim tkivima viših biljaka, uključujući stabljiku, lišće, korijenje, cvjetove, najviše antocijanina u bobičastom voću ima u kori ploda (osim primjerice jagoda gdje ih ima u cijelom plodu). Poznato je oko 500 različitih antocijanina od kojih su u bobičastom voću najčešći pelargonidin, cianidin, delfinidin, petunidin, peonidin, i malvidin.[27] Antocijanini nastaju iz antocijanidina dodatkom šećera, a dijele se na one koji sadrže šećer (glikozide) i na one koji ga ne sadrže (aglikone). Biljke bogate antocijaninima su mnoge vrste iz roda *Vaccinium* poput borovnica i brusnica te vrste iz roda *Rubus* poput malina i kupina. Udio antocijanina ovisi o zrelosti ploda, a u svježem plodu nalaze se primjerice u crnom

ribizu, crnoj bazgi, kupini i borovnici u udjelima 4–5 g/kg, a u jagodama 0,6–0,8 g. Preporučeni unos antocijanina je 200 mg/dan, a u organizmu se slabo apsorbiraju, ovisno o vrsti voća, s manje od 1 % (10 – 50 nmol/L) od ukupno unesene količine u organizam.[27] Kao prehrambeni aditivi, obilježavaju se E-oznakom E163.

Osim navedenih najvažnijih i najzastupljenijih kemijskih spojeva (flavonoida), bobičasto voće sadrži i druge sastojke važne za očuvanje zdravlja i prevenciju bolesti (Slika 3).



Slika 8: Bioaktivne komponente u bobicama voća[1]

Bobičasto voće osim velikog udjela flavonoida (antocijanini, flavonoli i flavanoli) sadrži i tanine (proantocijanidine), u vodi topljive tanine (elagitanin i galotanin), fenolne kiseline (hidroksibenzojeva, hidroksicinamična kiselina i klorogena kiselina), stilbenoide i lignane.[1,28]

Fenolne kiseline s najvećim udjelom u bobičastom voću su galna kiselina i klorogena kiselina u svježem plodu borovnice (do 2 g/kg) i kupine (oko 0,3 g/kg) te s nešto manjim udjelom u plodu jagode (oko 0,09 g/kg).[29]

Bobičasto voće je važan izvor flavan-3-ola i proantocijanidina, važne podskupine polifenolnih spojeva bez glikozidnih ostataka. Svježi plodovi aronije, borovnice i jagode sadrže flavan-3-ol i proantocijanidine u udjelima od 1.5 - 6.6 g/kg, a kupine i maline oko 0,3 g/kg.[29]

Tanini topljivi u vodi su važna skupina polifenolnih spojeva. Bobičasto voće u velikom udjelu sadrži elagiotanin, a osobito je prisutan u močvarnoj jagodi i crvenoj malini s udjelom od 80 % od ukupnih polifenola (do 2,6 g/kg), te do 6 g/kg u kupini, borovnici i jagodi što iznosi oko 51 % od ukupnih polifenola.[29]

2.2.2. Analitičke metode za odvajanje i analizu polifenolnih spojeva

Za analizu sastava polifenolnih spojeva u realnim uzorcima, koriste se različiti analitički postupci i metode.[27,30]

Metode koje se koriste za analizu sastava polifenolnih spojeva mogu se podijeliti na one koje pomoću kojih se određuju ukupni udio polifenola i u one pomoću kojih određuju pojedini fenoli, specifične grupe ili podskupine fenolnih spojeva.

Za odvajanje polifenola iz uzoraka najčešće se koristi postupak ekstrakcije. Koriste se ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija na čvrstoj fazi.

Za određivanje sastava polifenolnih spojeva koriste se kromatografske metode, metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) i rjeđe, plinska kromatografija sa spektrometrom masa kao detektorom (eng. *Gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS).[31]

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva koriste se spektrofotometrijske metode. U literaturi su najčešće opisani postupci gdje se prije spektrofotometrijskog mjerenja ekstrahira više frakcija s različitim sastavom polifenolnih spojeva ovisno o eksperimentalnim uvjetima ekstrakcije, primjerice jedna frakcija sadrži flavonole i fenolne kiseline, a druga antocijanine. Antioksidacijski kapacitet ovih frakcija polifenola određuje se zatim različitim spektrofotometrijskim metodama, dok se za određivanje sastava polifenola i kvantifikaciju polifenola u pojedinoj frakciji koristi metoda HPLC.[32]

2.1.3.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Ekstrakcija je najčešća metoda za odvajanje polifenolnih spojeva iz voća. Uvjeti ekstrakcije (temperatura, omjer otapala prema količini uzorka, svojstva otapala i koncentracija) moraju se optimizirati. Vrijeme trajanja postupka ekstrakcije je različito, ovisno o uzorku i odabranoj metodi, od 1 minute[33] do 24 sata[34]. Ekstrakcija polifenola provodi se različitim otapalima kao

što su voda, metanol, smjesa metanola i mravlje kiseline, smjesa vode i octene ili mravlje kiseline, itd. Učinkovitost ekstrakcije i antioksidativni kapacitet ekstrakata voća značajno ovise o polarnosti otapala. O sastavu polifenola u uzorku ovisi izbor otapala za ekstrakciju. Topljivost polifenola uglavnom ovisi o hidroksilnim skupina, molekulskoj masi i duljini ugljikovodičnog lanca (tj. broju C-atoma).[35]

Za ekstrakciju u vodi topljivih polifenola koristi se voda ili različiti puferi. Dobra učinkovitost ekstrakcije polifenola iz voća postiže se korištenjem etanola i metanola i njihove smjese s vodom, ali koriste se i druga otapala, kao što je etilacetat ili aceton. Za polifenole iz usplođa voća vrlo često se koristi postupak ekstrakcije samo s acetonom uz potresanje 30 minuta na sobnoj temperaturi.[36,37,38] Voda i etanol često se koriste zbog svoje male toksičnosti i velike učinkovitosti ekstrakcije. Glavni nedostatak ekstrakcije s vodom je nizak prinos antioksidansa s niskom polarnosti ili liposolubilnih antioksidansa kao, na primjer, karotenoida. Antioksidansi koji su netopljivi u vodi ekstrahiraju se s acetonom, kloroformom ili metanolom, a u manjoj mjeri propanolom, dimetilformamidom ili njihovim smjesama.[39,40]

Za ekstrakciju polifenolnih spojeva osobito je važno da se polifenolni spojevi u ekstraktima nalaze u njihovom prirodnom kemijskom obliku primjerice, antocijanini i flavonoli u obliku glikozida, fenolne kiseline u obliku glikozida ili estera. Postupak ekstrakcije ponekad uključuje prethodnu hidrolizu polifenolnih spojeva. Zadržavanje polifenola u njihovom prirodnom obliku u kojem se nalaze u voću je važno zbog određivanja antioksidacijskog kapaciteta. Naime, kemijska struktura polifenola ima veliki utjecaj na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta te ga može povećati ili smanjiti. Primjerice glikozidi flavonola i fenolnih kiselina su slabiji antioksidansi od odgovarajućih aglikona.[41] Radi toga postupak ekstrakcije često uključuje prethodnu hidrolizu polifenolnih spojeva. Osobito je važno prije određivanja antioksidacijskog kapaciteta poznavati sastav prisutnih polifenolnih spojeva u voću jer se njihovom hidrolizom u aglikone, mogu izgubiti važne informacije i utjecati na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta.

2.1.3.2. Spektrofotometrijske metode

Postoji veliki broj spektrofotometrijskih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva u voću, a temelje se na sposobnosti polifenolnih spojeva da djeluju kao reducensi.[42] Zbog kompleksnih oksidacijskih procesa, za određivanje antioksidacijskog kapaciteta voća često se koristi više metoda čime je olakšana interpretacija rezultata i čime su

dobiveni točniji rezultati. Koriste se direktne metode (npr. metoda ORAC, eng. *Oxygen-Radical Absorbance Capacity*) i indirektne metode (DPPH, eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl;* FRAP, eng. *Ferric/Reducing Antioxidant Power*). Navedene metode razlikuju se u mehanizmu reakcija, uvjetima reakcije, ciljanim spojevima ili reducensima (oksidansima) te dobivenim rezultatima.[43] Cilj navedenih metoda je što točnije i selektivnije određivanje antioksidacijskog kapaciteta pojedinih spojeva u realnom uzorku. Općenito, za bobičasto voće i hranu važno je definirati koji su to spojevi prisutni u uzorku u malim količinama, a koji značajno utječu na reaktivnost pojedinih reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih spojeva (RNS).[43,44] Prema navedenim kriterijima u obrani biološkog sustava od oksidacije ne sudjeluju svi prisutni reducensi u uzorku. U literaturi za prikaz rezultata „antioksidacije aktivnosti ili kapaciteta" koriste se različiti nazivi (eng. *efficiency*, *effectiveness*, *action, power*, *parameter*, *potencial*, *potency* i *activity*), ali antioksidacijski kapacitet i aktivnost su najčešći nazivi. Prema mehanizmu reakcije metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta dijele se na dvije skupine: metode koje se temelje na reakcijama u kojima dolazi do prijenosa vodikovog iona (eng. *hydrogen atom transfer*, HAT) i na metode koje se temelje na reakcijama u kojima dolazi do prijenosa elektrona (eng. *electron transfer*, ET).

Neke od najčešće korištenih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva su: metoda ABTS (eng. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), metoda TEAC (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)[45], metoda TRAP (eng. *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), direktna metoda ORAC (eng. *Oxygen-Radical Absorbance Capacity*)[46], metoda DPPH i metoda FRAP[47].

Metoda ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) često se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta. Reakcijska smjesa u eksperimentu ORAC sadrži izvor peroksilnih radikala, fluorescentni reagens (obojeni spoj –„boja") te standard ili uzorak kojemu je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Reakcijom slobodnih radikala i fluorescentnog reagensa, spoj se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik, što se očituje kao pad intenziteta fluorescencije. Međutim, dodatkom antioksidansa u reakcijsku smjesu dolazi do usporavanja reakcije, budući da antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima. Razlika u padu intenziteta fluorescencije između otopine s antioksidansima i bez antioksidansa (slijepa proba) uzima se kao mjera antioksidacijskog kapaciteta.[43]

Antioksidacijski kapacitet polifenola određuje se spektrofotometrijskom metodom s radikal-kationom $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonatni).[48,49] Dodatkom

natrijeva ili kalijeva persulfata reducirana, bezbojna, neutralna otopina radikal-kationa oksidira se u plavo-zelenu otopinu radikal-kationa $ABTS^{\bullet+}$. Nastali radikal-kation $ABTS^{\bullet+}$ reducira se s većinom antioksidansa, uključujući polifenole, tiole i vitamin C. Redukcija u bezbojnu, neutralnu molekulu ABTS-a tj. „gašenje“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (radikal-kationa $ABTS^{\bullet+}$) ovisi o antioksidacijskom kapacitetu ispitivanog antioksidansa i njegovoj koncentraciji u uzorku.[50]

Postoje različiti kemijski ili enzimski postupci oksidacije otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Radikal-kation $ABTS^{\bullet+}$ pripravlja se postupkom s enzimima - upotrebom metmioglobina[51] ili peroksidaze[52]; kemijskim postupkom - s MnO_2[53], kalijevim persulfatom[54], peroksidnim radikalima[55] ili 2, 2'-azo-bis(2-aminopropan) radikalom (ABAP)[52] ili čak elektrokemijski[56]. Dodatkom antioksidansa reducira se radikal $ABTS^{\bullet+}$, a udio radikala ABTS koje „gase“ različiti antioksidansi izražava se kao funkcija koncentracije i vremena, te se mjeri praćenjem smanjenja vrijednosti apsorbancije radikala $ABTS^{\bullet+}$ te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (*Trolox*), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima. U biokemiji se radikal $ABTS^{\bullet+}$ koristi za promatranje kinetike reakcija specifičnih enzima, u imunokemijskim analitičkim metodama s enzimima (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) te za detekciju vezanja jedne molekula na drugu te u prehrambenoj industriji.[44]

DPPH je organski spoj 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil. To je kristalni prah tamne boje koji se sastoji od stabilnih slobodnih radikala. Metoda s DPPH je jedna od najstarijih metoda koja se koristi za indirektno spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenola u ekstraktima realnih uzorka, a smanjenje kapaciteta radikala DPPH određuje se mjerenjem apsorbancije pri 517 nm.[57,58]

Metoda FRAP je brza i jednostavna spektrofotometrijska metoda koja se temelji na redukciji iona Fe^{3+} u ion Fe^{2+} u prisutnosti antioksidansa iz uzorka koji s reagensom TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) u kiselom daju obojeni kompleks s maksimumom apsorpcije pri 593 nm.

Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnog udjela polifenolnih spojeva koristi se Folin-Ciocalteuov reagens (FCR, Folin-fenolni reagens ili Folin-Denisov reagens). To je smjesa fosfomolibdata i fosfovolframata, koja reagira s fenoksidnim ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksidni ion oksidira, a Folin-Ciocalteuov reagens reducira ih do plavo obojenih

volframovog i molibdenovog oksida. Apsorbancija se mjeri u lužnatoj otopini pri 765 nm.[59,60] Kao standard najčešće se koristi galna kiselina (GAE) pa se u literaturi metoda naziva i Metoda ekvivalencije galne kiseline.[61] Folin-Ciocalteuov reagens se koristi za kolorimetrijsko *in vitro* određivanje fenola i polifenola te je dio Lowryevog proteinskog testa, a također reagira s nekim spojevima koji sadrže dušik, kao što su primjerice hidroksilamin i gvanidin.[62,63] Folin-Ciocalteuov reagens reagira sa svim reducensima prisutnim u uzorku pa se ne može koristiti samo za određivanje fenola,[64] već se mjeri ukupni redukcijski kapacitet uzorka. Na temelju izmjerene ukupne sposobnosti redukcije odnosno iz ukupnog udjela polifenola u uzorku određuje se odnos između redukcije reagensa i antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva. Reagens reagira s tiolima, vitaminima, gvaninom (nukleotidna baza) te s pojedinim anorganskim ionima. Na rezultat određivanja osobito je značajan utjecaj koncentracije askorbinske kiseline koja značajno reagira s Folin-Ciocalteuovim reagensom pri čemu se za rezultat ukupnog udjela polifenola u uzorku dobiju veće vrijednosti. Stoga, voće s velikom udjelom askorbinske kiseline ima vrlo veliki ukupni udio polifenola i veći ukupni antioksidacijski kapacitet uzorka.

Huang i suradnici su istraživali vezanje radikala $DPPH^{\bullet+}$ s polifenolima u ekstraktu uzorka voća spektrofotometrijskom metodom.[65] Vrijednosti TEAC za antioksidacijski kapacitet polifenola borovnica, kupina i jagoda iznosile su 14,98, 11,48 i 4,44 mmol Trolox/100 g suhe tvari, a EC_{50} antioksidacijskog kapaciteta s radikalom $DPPH^{\bullet+}$ iznosile su 0,42, 0,44 i 0,81 mg/mL. Također, za ekstrakte s većom masenom koncentracijom polifenola u ekstraktu (više od 0,4 mg/mL) dobivene su veće vrijednosti radi boljeg vezanja s radikalom $DPPH^{\bullet+}$. Osim toga, pomoću Folin-Ciocalteuovog reagensa određena je i ukupna količina fenola, flavonoida i antocijanina. Ukupni udio fenola za borovnicu iznosi 9,44 mg GAE/g suhe tvari. Ukupni udio flavonoida određen je kolorimetrijskom metodom uz dodatak $NaNO_2$, $AlCl_3$ i NaOH. Apsorbancija je izmjerena pri 510 nm, a bobice borovnice sadrže 36,08 mg rutina/g suhe tvari. Ukupni udio antocijanina određen je kolorimetrijskom metodom uz dodatak vanilina i HCl pri 500 nm i iznosi 24,38 mg katehina/g suhe tvari.[65]

Ukupni udio polifenola u aroniji, borovnici i goji bobicama Mikulic-Petkovsek i suradnici odredili su Folin-Ciocalteuovom metodom. Uzorke bobica su uz pomoć tekućeg dušika zgnječili u finu pastu, a zatim ekstrahirali sa smjesom metanola i 3 %-tne mravlje kiseline. Nakon ekstrakcije, voćni ekstrakti su filtrirani i spektrofotmetrijski je određen ukupan sastav fenola. Rezultati izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/kg svježe tvari iznosili su

za borovnicu 1,300 mg GAE/kg, za aroniju 10,132 mg GAE/kg, a za goji bobice 1,319 mg GAE/kg.[66]

Zheng i suradnici[67] su pomoću Folin-Ciocalteuovog reagensa odredili ukupni udio fenola u uzorcima borovnice i aronije. Za pripravu voćnih ekstrakta korištena je smjesa acetona (80%) i mravlje kiseline (0,2%). Kao standard korištena je galna kiselina. U borovnici je udio ukupnih fenola iznosio 4,12 mg GAE/g svježe tvari, a u aroniji 25,56 mg GAE/g svježe tvari.

Određivanjem ukupnog udjela polifenola u uzorcima borovnice, akai i goji bobica bavili su se i Donnelly i suradnici. U uzorcima borovnice, akai i goji bobica određen je udio ukupnih polifenola s Folin-Ciocalteuovim reagensom uz katehin kao standard (mg/Cal). U borovnici je udio ukupnih fenola iznosio 4,72 mg/Cal, u akai bobicama 3,13 mg/Cal, a u goji bobicama 0,81 mg/Cal.[68]

Giovanelli i suradnici su usporedili sastav polifenola i antioksidacijski kapacitet polifenola uzgojenih (*Vaccinium corymbosum*) i divljih borovnica (*Vaccinium miyrtillus*). Odredili su dva do tri puta veći antioksidacijski kapacitet u divljim vrstama bez obzira na korištenu metodu (FRAP ili amperometrijska metoda), a udio ukupnih antocijanina kolorimetrijskim metodama. Na temelju usporedbe sastava pojedinačnih antocijanina određenih metodom HPLC utvrđene su razlike u sastavu aciliranih antocijanina kod divljih i uzgojenih borovnica. Divlje borovnice sadržavale su značajno veći udio polifenolnih spojeva (približno 600 mg/100 g) i veće koncentracije antocijanina (330–340 mg/100 g).[69]

Jakobek i suradnici uspoređivali su sastav polifenola borovnice i jagode te njihov antioksidacijski kapacitet. Nakon provedenih analiza došli su do zaključka da se usporedbom ovih dviju vrste voća može vidjeti da fenoli borovnice imaju znatno veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi s fenolima jagode. Flavonoli i fenolne kiseline iz borovnice (EC_{50} = 357 g voća/g DPPH) pokazali su gotovo 3 puta viši antioksidacijski kapacitet od flavonola i fenolnih kiselina iz jagode (EC_{50} = 936 g voća/g DPPH). Slično tome, antocijanini iz borovnice (EC_{50} = 18 g voća/g DPPH) pokazali su gotovo 3,5 puta veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi s antocijaninima izoliranim iz jagode (EC_{50} = 65 g voća/g DPPH).[58]

Castrejon i suradnici odredili su antioksidacijski kapacitet s Folin-Ciocalteuovim reagensom. Apsorpcija je izmjerena pri 765 nm, a rezultati su prikazani kao mg GAE/g suhe tvari. Potvrđeno je da različite sorte borovnica imaju različiti antioksidacijski kapacitet. Tako borovnice sorte „Puru“ imaju antioksidacijski kapacitet od 17,3 mg GAE/g suhe tvari, a sorta „Reka“ 52,6 mg GAE/g suhe tvari. Također, odredili su

ukupni sastav fenola u zrelim i nezrelim bobicama borovnica. Analiza je pokazala da je antioksidacijski kapacitet u zelenim, nezrelim bobicama 60,76 mg GAE/g suhe tvari, a u plavim, zrelim bobicama 33 mg GAE/g suhe tvari.[70]

Xavier i suradnici su također uz pomoć Folin-Ciocalteuovog reagensa utvrdili antioksidacijski kapacitet fenola, flavonoida te antocijanina u borovnici, a vrijednosti za pojedine spojeve su iznosile 388, 425 i 473 mg GAE/g suhe tvari.[71]

Budući da temperatura i vrijeme skladištenja voća mogu dovesti do nestabilnosti prirodnih ekstrakata, Hosu i suradnici su ispitivali ovisnost antioksidacijskog kapaciteta o vremenu skladištenja ploda drenjine. Eksperimentalni podaci pokazali su da je antioksidacijski kapacitet približno konstantan tijekom skladištenja varirajući između 12,91 i 12,83 μmol Trolox/g suhe tvari. Na kraju skladištenja antioksidacijski kapacitet bio je smanjen samo 0,62%.[72] Ovi rezultati upućuju da se sastav ekstrakta ne mijenja tijekom skladištenja.

2.1.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-performance Liquid Chromatography*, HPLC) se koristi za razdvajanje, identifikaciju, kvantifikaciju i čišćenje pojedinih komponenta u smjesi. Prema obliku kromatografske podloge metoda HPLC spada u kolonsku kromatografiju, a koriste se različite nepokretne faze (obično, hidrofobni zasićeni ugljikovi lanci). Odvajanje komponenata u uzorku temelji se na njihovoj različitoj topljivosti između nepokretne faze i otapala. Otapalo ili smjesa otapala s uzorkom pomoću pumpe pod tlakom prolazi kroz kolonu do detektora. Kao detektori se najčešće koriste UV/Vis ili detektor s nizom dioda (eng. *Diode-Array Detector*, DAD). Detektor s nizom dioda omogućuje snimanje cijelog spektra eluiranog uzorka u UV/Vis: apsorbcija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini. Treba spomenuti i spektrometar mase (MS) koji se koristi kao detektor kod identifikacije organskih spojeva. Metoda HPLC obrnutih faza (eng. *Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) ima nepolarnu nepokretnu fazu (silikagel) i vodenu, umjereno polarnu, pokretnu fazu. Na takvoj nepokretnoj fazi, vrijeme zadržavanja je duže za molekule koje su manje polarne, dok će se polarne molekule brže eluirati s kolone.

Koristeći se metodom RP-HPLC (UV/VIS detektor) Huang i suradnici analizirali su polifenolni sastav borovnice. Odjeljivanje i analiza spojeva ekstrakta borovnice provedena je

smjesom otapala mravlje kiseline i metanola. Iz kromatograma je određeno da borovnice u koncentracijskom rasponu (od najveće koncentracije prema najmanjoj) sadrže: vanilnu kiselinu, *p*-hidroskibenzojevu kiselinu, tanin, rutin, katehin, kavenu kiselinu i dr.[65]

Ochiman i suradnici su za uzorke aronije i borovnice koristili ekstrakciju smjesom metanola i octene kiseline, a sastav polifenolnih spojeva određen je metodom HPLC s detektorom s nizom dioda. Pokretna faza sadržavala je smjesu mravlje kiseline (pH = 2,2) i acetonitrila. Fenolne kiseline određene su pri 320 nm, flavonoli pri 360 nm, a antocijanini pri 520 nm. Udio antocijana u aroniji, borovnici (niskog rasta) te borovnici iznosio je 529,3, 168,2 i 271,6 mg/100 g suhe tvari, flavonola 21,2, 35,2 i 26,6 mg/100 g suhe tvari, flavonoida 556,0, 203,4 i 298,2 mg/100 g suhe tvari, a udio ukupnih fenola 672,4, 259,0 i 374,9 g/100 g suhe tvari.[73]

Zheng i suradnici[72] su nakon prethodne ekstrakcije, metodom HPLC s detektorom s nizom dioda odredili antocijanine i fenolne spojeve u uzorcima borovnice i aronije. Odvajanje antocijanina i fenolnih spojeva je moguće provesti njihovom adsorbcijom na kromatografskoj koloni, dok se u vodi topljivi šećeri, kiseline i drugi spojevi eluiraju s vodenom otopinom mravlje kiseline. Antocijanini i fenolni spojevi eluiraju se sa kolone sa smjesom metanola, acetonitrila i mravlje kiseline. Signali pojedinačnih spojeva uspoređeni su sa signalima na kromatogramu standardnih uzoraka. Plod borovnice sadrži u koncentracijskom rasponu (od najveće koncentracije do najmanje): klorogensku kiselinu, malvidin-3-galaktozid, kvercetin-3-galaktozid, malvidin-3-glukozid, malvidin-3-arabinozid, derivate kvercetina, miricetin-3-arabinozid, cianidin-3-glukozid, kvercetin-3-glukozid, kvercerin-3-arabinozid, kempferol-3-glukozid, derivate kempferola, cianidin-3-galaktozid i dr. U aroniji su određeni fenolni spojevi u koncentracijskom rasponu (od najveće prema najmanjoj koncentraciji): cianidin-3-galaktozid, cianidin-3-arabinozid, kavena kiselina, derivat kavene kiseline, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, cianidin-3-glukozid i dr.[67]

Jakobek i suradnici analizirali su količinu polifenolnih spojeva u ekstraktima borovnice i jagode uz pomoć visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC). UV-Vis spektri snimani su u području valnih duljina 190 – 600 nm. Detekcijska valna duljina bila je 280 nm za sve polifenole iz hidroliziranih prvog dijela ekstrakata 1. Antocijanini (ekstrakti 2) su izmjereni pri 520 nm. Identificirani flavonoli i fenolne kiseline kvantificirani su prema kalibracijskim krivuljama odgovarajućih standarda te izraženi u mg/kg svježeg voća. Antocijanini su kvantificirani prema kalibracijskoj krivulji cijanidin-3-glukozida te izraženi

kao količina ukupnih antocijanina u mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida/kg svježeg voća. U borovnici se nalazi znatno veći udio polifenolnih spojeva u usporedbi s jagodom što je jedan od razloga i većeg antioksidacijskog kapaciteta borovnice. U borovnici se nalazi veće udio derivata kavene kiseline (53 mg/kg) te iznimno veliki udio derivata kvercetina (423 mg/kg). Osim toga borovnice su iznimno bogate antocijaninima (8797 mg/kg). Jagoda se ističe relativno velikim udjelom derivata elaginske kiseline (21 mg/kg). I u borovnici i u jagodi, antocijanini su sadržani u većem udjelu s obzirom na ukupnu količinu polifenola (94% u borovnici, 81 % u jagodi), što je razlog velikog doprinosa antocijanina ukupnom antioksidacijskom kapacitetu borovnice i jagode.[58]

Castrejon je sa suradnicima analizirao sastav fenola u bobicama borovnice različitih sorti i u različitom stupnju zrelosti uz pomoć metode HPLC-DAD. Kao otapalo korišten je metanol. Detekcijska valna duljina za antocijanine je 520 nm, za flavonole 365 nm te za hidroksicinamičnu kiselinu 320 nm. Rezultati su pokazali da je hidroksicinamična kiselina dominantna vrsta u svim stupnjevima zrelosti. Kod svih analiziranih sorti borovnice došlo je do povećanja količine antocijanina sa povećanjem zrelosti borovnice. Također, Castrejon i suradnici povezali su veličinu bobica borovnica sa količinom antocijanina. Manje bobice (kod borovnica niskog rasta) imaju veću količinu antocijanina od većih bobica (kod borovnica visokog rasta).[70]

Bermudez i suradnici proveli su identifikaciju i kvantifikaciju fenola u bobicama aronije. Za određivanje sastava fenolnih spojeva i analizu spojeva korištena je metoda HPLC-DAD-MS. Kromatogrami su snimljeni pri različitim valnim duljinama ovisno o analitu: antocijanini pri 520 nm, flavonoli pri 360 nm, a derivati hidroksicinamične kiseline pri 320 nm. Udio antocijanina je 8,0 g cijanidin-3-rutinozida/L soka, flavonola 2,1 grutina/L soka, a udio derivata hidroksicinamične kiseline iznosi 7,8 g klorogeneske kiseline/L soka. Antioksidacijski kapacitet polifenola aronije određen je metodama s radikalom ABTS (103,2 mg Trolox/mL soka) i DPPH (60,0 mg Trolox/mL soka).[32]

U ovom radu pokazano je da bobičasto voće sadrži značajne udjele polifenolnih spojeva. Antocijanini su osobito važni sastojak voća jer bez obzira na vrstu bobičastog voća zbog velikog udjela u voću značajno doprinose antioksidativnim svojstvima voća. Tamno ljubičastu, gotovo crna boju ploda aronije uzrokuje velika koncentracija polifenola, posebno antocijanina. Sastav antocijanina i flavonoida je pet do deset puta veći nego kod drugih vrsta

bobičastog voća kao što su brusnica, akai, borovnica i crni ribiz. Ukupni udio antocijanina svježeg ploda aronije je do 1,80 mg/100 g, a udio proantocijanidina 664 mg/100 g.[74]

Pantelidis i suradnici su usporedili sastav drijenka s malinama, kupinama, ribizlom i ogrozdom i pokazalo se da drijenjina sadrži najviše vitamina C (do 103,3 mg/100 g) što je i do 7,2 puta više nego kod ostalog voća. Značajna je i količina antocijanina (223 mg/100 g) koja je isto tako najveća u odnosu na spomenuto voće. Veliki udjeli vitamina C i antioksidansa ukazuju na važnost drenjina kao odličnog dodatka hrani.[75]

Zbog velike količine prirodnih polifenolnih spojeva s značajnim antioksidativnim kapacitetom upotreba borovnice, aronije, akai i goji bobica te drenjina u prehrani sve je značajnija za zdravlje ljudi, a uzgoj ovih vrsta supervoća sve je veći i značajniji za gospodarstvo.

§ 3. Literaturna vrela

1. S. H. Nile i S.W. Park, *Nutr.* **30** (2014) 134-144.
2. http://science-all.com/blueberry.html (preuzeto 18. svibnja 2017. god)
3. http://www.organicfacts.net/health-benefits/fruit/chokeberries.html (preuzeto 18. svibnja 2017. god)
4. S. Valcheva-Kuzmanova, K. Kuzmanov, S. Tanvheva i A. Belcheva, *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **29** (2007) 101-105.
5. M. Malik, C. W. Zhao, N. Schoene, M. M. Giusti, M. P. Moyer i B. Amagnuson, *Nutr. Cancer* **46** (2003) 186-196.
6. C. W. Zhao, M. M. Giusti, M. Malik, M. P. Moyer i B. A. Magnuson, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 6122-6128.
7. http://aronija.net/sadrzaj/ucinak-na-zdravlje/kemijski-sastav/ (preuzeto 6. kolovoza 2017. god)
8. http://www.superfoods-for-superhealth.com/acai-berry.html (preuzeto 18. svibnja 2017. god)
9. http://www.popsugar.com/fitness/What-Deal- Goji-Berries- 652789 (preuzeto 18. svibnja 2017. god)
10. N. P. Seeram, R. Schutzki, A. Chandra i M. G. Nair, *J. Agric. Food Chem.***50** (2002) 2519–2523.
11. http://luirig.altervista.org/schedeit/ae/cornus_mas.htm (preuzeto 21. svibnja 2017. god)
12. O. Rop, J. Mlcek, D. Kramarova i T. Jurikova, *Afr. J. Biotechnol* **9 (8)** (2010) 1205-1210.
13. V. Katalinić, *Kemija mediteranskog voća i tehnologija prerade*, Skripta - I dio, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2006
14. G. Niketić-Aleksić, *Tehnologija voća povrća*, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 1982.
15. M. Plessi, D. Bertelli i A. Albasini, *Food Chem.* **100** (2007) 419–427.
16. H. P. Vasantha Rupasinghea i S. Clegg, *J. Food Comp. Anal.* **20** (2007) 133–137.
17. A. Gopalan, S. C. Reuben, S. Ahmed, A. S. Darvesh, J. Hohmann i A. Bishayee, *Food*

Funct. **3**, (2012) 795–809.

18. F. Giampieri, S. Tulipani, J. M. Alvarez-Suarez, J. L. Quiles, B. Mezzetti i M. Battino, *Nutr*. **28** (2012) 9–19.

19. A. V. Rao i D. M. Snyder, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 3871–3883.

20. M. J. Bermudez-Soto i F. A. Tomas-Barberan, *J. Eur. Food Res. Technol.* **219** (2004) 133–141.

21. C. R. S. Câmara, C. A. Urrea i V. Schlegel, *Agriculture* **3** (2013) 90-111.

22. K. R. Määttä-Riihinen, A. Kamal-Eldin i A. R. Törrönen, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 6178-6187.

23. K. R. Määttä-Riihinen, A. Kamal-Eldin, P. H. Mattila, A. M. González-Paramás i A. R. Törrönen, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 4477-4486.

24. B. Pevalek-Kozlina, *Fiziologija bilja*, Profil, Zagreb (2003) 478–485.

25. K. A. Steinmetz i J. D. Potter, *J. Am. Diet. Assoc.* **96** (1996) 1027–1039.

26. W. Zheng i S. Y. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 502-509.

27. C. Del Bo', D. Martini, M. Porrini, D. Klimis-Zacasc i P. Riso, *Food Funct.* **6** (2015) 2890–2917.

28. A. Szajdek i E. J. Borowska, *Plant Foods Hum. Nutr.* **63** (2008) 147–156.

29. I. Zanotti, M. Dall'Asta, P. Mena, L. Mele, R. Bruni, S. Ray i D. Del Rio, *Food Funct.* **6** (2015) 13–31.

30. G. E. Pantelidis, M. Vasilakakis, G. A. Manganaris i G. Diamantidis, *Food Chem.* **102** (2007) 777–783.

31. V. Rastija i M. Medić-Šarić, *Kem. Ind.* **58 (3)** (2009) 121-128.

32. M. J. Bermúdez-Soto i F. A. Tomás-Barberán, *Eur. Food Res. Technol.* **219** (2004) 133-141.

33. A. Karadag, B. Ozcelik i S. Saner, *Food Anal. Methods* **2** (2009) 41–60.

34. M. L. Price i L. G. Butler, *J. Agric. Food Chem.* **25** (1977) 1268–1273.

35. D. Franco, J. Sineiro, M. Rubilar, M. Sanchez, M. Jerez, M. Pinelo, N. Costoya i M. J. Nunez, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem* **7 (8)** (2008) 3210-3216.

36. S. J. Cork i A. K. Krockenberger, *J. Chem. Ecol.* **17** (1991) 123–134.

37. A. Schieber, P. Keller i R. Carle, *J. Chromatogr. A* **910** (2001) 265–273.

38. Y. Lu i L.Y. Foo, *Food Chem.* **59** (1997) 187–194.

39. H. Wang, G. Cao i R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 701–705.

40. M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards i D. Ryan, *Analyst* **125** (2000) 989–1009.

41. P. Kerchev i S. Ivanov, *Biotechnol. & biotechnol. Eq.* **22** (2008) 556–559.

42. M. A. Soobrattee, V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma i T. Bahorun, *Mutat. Res.* **579** (2005) 200-213.

43. A. Karadag, B. Ozcelik i S. Saner, *Food Anal. Methods* **2** (2009) 41–60.

44. D. Huang, B. Ou i R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **53 (6)** (2005) 1841-1856.

45. B. Halliwell, M. A. Murcia, S. Chirico i O. I. Aruoma, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35 (1-2)** (1995) 7-20.

46. N. J. Miller, A. T. Diplock, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan i A. Milner, *Clin. Sci*. **84** (1993) 407-412.

47. G. Cao, H. M. Alessio i R. G. Cutler, *Free Rad. Biol. Med*. **14** (1993) 303-311.

48. I. F. F. Benzie i J. J. Strain, *Anal. Biochem*. **239** (1996) 70-76.

49. R. L. Prior, X. Wu i K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* **53(8)** (2005) 3101–3113.

50. J. Castillo, O. Benavente-García, J. Lorente, M. Alcaraz, A. Redondo; A. Ortuño i J. A. del Rio, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 1738–1745.

51. A. Cano, J. R. Guerrero, M. Acosta i M. B. Arnao, *Vit. Enol. Prof.* **60** (1999) 45.

52. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang i C. Rice- Evans, *Free Radic. Biol Med.* **26** (1999) 1231–1237.

53. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, *Methods Enzymol.* **234** (1994) 279–293.

54. M. B. Arnao, A. Cano, J. Hernández-Ruiz, F. García-Cánovas i M. Acosta, *Anal. Biochem.* **236** (1996) 255–261.

55. O. Benavente-García, J. Castillo, J. Lorente i A. Ortuño, *Food Chem.* **68** (2000) 457–462.

56. R. van den Berg, G. R. M. M. Haenen, H. van den Berg i A. Bast, *Food Chem.* **66** (1999) 511–517.

57. O. P. Sharma i T. K. Bhat, *Food Chem.* **113 (4)** (2009) 1202–1205.

58. L. Jakobek, M. Šeruga, I. Novak, M. Medvidović-Kosanović i I. Lukačević, *Pomologia Croatica* **14 (1)** (2008) 13-26.

59. A. M. Campos, J. Escobar i E. A. Lissi, *J. Braz. Chem. Soc.* **7** (1996) 43–9.

60. A. M. Alonso, C. Domínguez, D. A. Guillén i C. G. Barroso, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 3112–3115.

61. D. Marinova, F. Ribarova i M. Atanassova, *J. Chem. Technol. Metall.* **40** (2005) 255–260.

62. C. A. Rice-Evans i N. J. Miller, *New York* (1998) 199-219.

63. M. P. Kähkönen, A. I. Hopia i M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 4076-4082.

64. S. Y. Wang i H. Lin, *J. Argic.Food Chem.* **48** (2000) 140-146.

65. W. Huang, H. Zhang, W. Liu i C. Li, *J Zhejiang Univ-Sci B(Biomed & Biotechnol)* **13(2)** (2012) 94-102.

66. M. Mikulic-Petkovsek, V. Schmitzer, A. Slatnar, F. Stampar i R. Veberic, *J. Food Sci.* **77 (10)** (2012) 1064-1070.

67. W. Zheng i S. Y. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 502-209.

68. P. E. Donnelly, T. M. Churilla, M. G. Coco Jr. i J. A. Vinson, *Nutr.* **2** (2010) 1290-1296.

69. G. Rusak, D. Komes, S. Likić, D. Horzić i M. Kovač, *Food Chem.* **110** (2008) 852–858.

70. A. D. R. Castrejón, I. Eichholz, S. Rohn, L. W. Kroh i S. Huyskens-Keil, *Food Chem.* **109** (2008) 564-572.

71. X. L. Louis, S. J. Thandapilly, W. Kalt, M. Vinqvist-Tymchuk, B. M. Aloud, P. Raj, L. Yu, H. Le i T. Netticadan, *Food Funct.* **5** (2014) 1785-1794.

72. A. Hosu, C. Cimpoin, L. David i B. Moldovan, *J. Anal. Methods Chem.* **2016** (2016) Article ID 2345375.

73. I. Ochiman, J. Oszmianski i K. Skupren, *J. Appl. Bot. Food Qual.* **83** (2009) 64-69.

74. X. L. Wu, L. W. Gu, R. L. Prior i S. McKay, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 7846-7856.

75. K. U. Yilmaz, S. Ercisli, Y. Zengin, M. Sengul i E. Y. Kafkas, *Food Chem.* **114** (2009) 408–412.