

Određivanje udjela ukupnih fenola u uzorcima planinske jarebike (*Sorbus aucuparia* L.) s različitih lokaliteta

Jerak, Božica

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:997680>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij nutricionizam

Božica Jerak

7606/N

**ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLA U UZORCIMA
PLANINSKE JAREBIKE (*Sorbus aucuparia* L.) S
RAZLIČITIH LOKALITETA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i biokemija hrane

Mentor: doc. dr. sc Ivana Rumora Samarin

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA STRANICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Određivanje udjela ukupnih fenola u uzorcima planinske jarebике (*Sorbus aucuparia* L.) s različitih lokaliteta

Božica Jerak, 0058212972

Sažetak: Istraživanje je provedeno na 50 uzoraka (zamrznutih plodova planinske jarebике) izuzetih s različitih lokaliteta dviju makrolokacija u RH– Velebita i Gorskog kotara. Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski primjenom Folin-Cicalteu metode, a dobivene prosječne vrijednosti kreću se od 9651,411 do 15463,18 mg GAE kg⁻¹ jestivog dijela uzorka. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da plodovi planinske jarebике imaju visoku antioksidacijsku aktivnost što im daje anti-kancerogeno, anti-upalno, anti-dijabetičko i kardioprotektivno djelovanje na ljudski organizam.

Ključne riječi: planinska jarebika, antioksidativna aktivnost, fenoli

Rad sadrži: 26 stranica, 11 slika, 4 tablice, 26 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Rumora Samarin

Pomoć pri izradi: Valentina Hohnjec

Datum obrane: 16. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study
Nutrition Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Determination of the total phenols content in rowanberry samples (*Sorbus aucuparia* L.) from different localities

Božica Jerak, 0058212972

Abstract: Experiment was conducted on 50 samples (frozen rowanberry fruit) harvested on different localities in two macrolocations in the Republic of Croatia - Velebit and Gorski kotar. Total phenols were determined by spectrophotometric application of the Folin-Ciocalteu method, and the obtained average values ranged from 9651,411 to 15463,18 mg of GAE kg⁻¹ of the edible part of the sample. Based on the obtained results, it can be concluded that mountain rowanberry fruits have a high antioxidant activity, which gives them anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-diabetic and cardioprotective effects on the human body.

Keywords: rowan, antioxidative activity, phenolics

Thesis contains: 26 pages, 11 figures, 4 tables, 26 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Rumora Samarin Ivana, PhD

Technical support and assistance: Valentina Hohnjec

Defence date: September 16th 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Jarebika (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	2
2.1.1 Opće karakteristike biljke i botanička obilježja	2
2.1.2 Kemijski sastav	4
2.2 Fenolni spojevi	5
2.2.1 Flavonoidi	6
2.2.2 Fenolne kiseline	7
2.2.3 Fenolni spojevi jarebice	8
2.2.4 Metode ekstrakcije fenolnih spojeva	8
2.3 Antioksidacijski kapacitet	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1 Materijali	11
3.1.1 Uzorci	11
3.4. Metode rada	14
3.4.1 Postupak ekstrakcije	14
3.4.2. Određivanje ukupnih fenola	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
5. ZAKLJUČCI	23
6. POPIS LITERATURE	24

1. UVOD

Jarebika (*Sorbus aucuparia* L.) listopadno je stablo iz porodice *Rosaceae*, u engleskom jeziku poznato kao mountain ash ili rowanberry, čiji se plodovi tradicionalno koriste za proizvodnju pekmeza i džemova (Drvodelić i sur., 2019). Rasprostranjena je u Europi, Aziji i sjevernoj Africi i to najčešće u pretplaninskim i planinskim područjima.

Osim što je lijepog i dekorativnog izgleda, plodovi jarebice su jestivi te se najčešće koriste prerađeni u marmelade i sokove. Zbog visokog sadržaja vitamina, minerala, karotenoida i fenolnih spojeva plodovi jarebice pokazuju pozitivan učinak na ljudski organizam, odnosno anti-dijabetičko, anti-kancerogeno, anti-inflamatorno, antioksidativno i kardioprotektivno djelovanje, no usprkos bogatom kemijskom sastavu nedovoljno je iskorištena kao prehrambeni proizvod u usporedbi s drugim vrstama bobičastog voća (aronija, borovnica, kupina) (Zymone i sur., 2018; Bobinate i sur., 2020).

Uloga fenolnih spojeva kao antioksidansa je uklanjanje reaktivnih vrsta kisika i kelatnih metala čime sprječavaju pojavu i razvoj raka (Bobinate i sur., 2020). Glavni polifenolni spojevi plodova jarebice odgovorni za izražena antioksidativna svojstva su fenolne kiseline, flavonoli, antocijani i proantocijanidini (Baby i sur., 2018). Koncentracija i sastav fenolnih spojeve ovise o više čimbenika kao što su izbor ekstrakcijskog otapala, omjer volumena otapala i uzorka te uvjeti u kojima je provedena ekstrakcija (Beglez-Mojzer i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je utvrditi količinu ukupnih fenola u zamrznutim plodovima (uzorcima) planinske jarebice s različitih lokaliteta Velebita i Gorskog kotara, koji su brani tijekom kolovoza i rujna 2020. godine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Jarebika (*Sorbus aucuparia* L.)

2.1.1 Opće karakteristike biljke i botanička obilježja

Sorbus aucuparia L. znanstveni je naziv za jarebiku, listopadnu biljku koja botanički pripada porodici ruža , *Rosaceae* te potporodici *Pomideae*. Vrste roda *Sorbus* rasprostranjene su od nizinskih do planinskih ekosustava, a na područje Europe i Sjeverne Amerike proširile su se iz jugoistočne Azije. U Hrvatskoj je zabilježeno 13 vrsta iz roda *Sorbus* L., dok rod broji s ukupno 250 vrsta (Drvodelić i sur., 2019; Sarv i sur., 2020).

Na mjestima povoljnim za uzgoj stablo jarebike doseže 15-20 m visine, a na nepovoljnim mjestima ostaje grm. U početku ima brzu stopu rasta koja se usporava s godinama. Najstarije stablo staro je 103 godine, ali vrlo rijetko se nalaze stabla starija od 80 godina (Räty i sur., 2016; Drvodelić i sur., 2019).



Slika 1. Stablo jarebike (Räty i sur., 2016)

Kora je u mladosti sjajna, glatka i svjetlosiva, a starija stabla imaju mjestimične raspukline. Korijenov sustav je dobro razgranat. U dobokom tlu korijenje raste u dubinu i širinu, a u plitkom ono ostaje plitko (Drvodelić i sur., 2019).

Listovi su neparno perasti i sastavljeni od 9-15 ušiljenih i na vrhu napiljenih listića duljine 2-5 cm, a tek donja trećina listića cijelog je ruba. Listići su bez sjaja, odozgo tamnozeleni, a odozdo pustenasti. Cvjetovi tvore bijele guste i vunaste cvatove promjera 10-15 cm, tučak ima 3-5 vratova, a duljina prašnika je otprilike jednaka duljini latica (Drvodelić i sur., 2019). Cvjetovi se oprašuju insektima i počinju stvarati sjeme u dobi od 15 godina (Räty i sur., 2016).

Plodovi su okruglasti i sitni, promjera 7-9 mm, narančasto-crvene boje, a rastu u grozdovima od oko 40 bobica te dozrijevaju u kolovožu i rujnu. Svaki plod sadrži 2-5 smeđih, glatkih i duguljastih sjemenki. (Drvodelić i sur., 2019). Za vrijeme dobrog uroda stablo može dati do 20 kg plodova (Poyrazoglu, 2004).



Slika 2. Zreli sjajnocrveni plodovi jarebike (Drvodelić i sur., 2019)

Zbog sadržaja jabučne kiseline plodovi jarebike privlače ptice čime se povećava ornitološka raznolikost, a osim ptica njima se hrane i srne, jeleni, jazavci, lisice i kune (Drvodelić i sur., 2019). Bobice se tradicionalno koriste za proizvodnju želea i džemova, ali njihova šira upotreba kao sastojaka hrane manje je popularna zbog njihovog gorkastog okusa te sadržaja parasorbinske kiseline i vodikova cijanida koji sirove bobice čine blago otrovnim (Hukkanen i sur., 2006, Mlcek i sur., 2014). U narodnoj medicini bobice se koriste kao laksativ, protiv reumatizma i bolesti bubrega, a davane su i stoci radi sprječavanja bakterijskih infekcija. U

tradicionalnoj austrijskoj medicini čaj, sirup, žele i alkoholna tinktura plodova jarebike koriste se za liječenje vrućice, infekcija, prehlade, reumatizma i gihta (Sarv i sur., 2020). U Grčkoj su plodovi korišteni kao antidijabetičko sredstvo (Šavikin i sur., 2017).

Jarebika dobro podnosi gradska onečišćenja pa se iz tog razloga sadi kao ukrasno stablo u parkovima i drvoredima. Njezino cvijeće specifičnog mirisa ne zaobilaze ni pčele, a plodovi koji dugo ostaju na stablu najviše pridonose njezinoj ukrasnoj vrijednosti (Drvodelić i sur., 2019). Vjerovalo se da ima čarobne moći poput imele pa se grana mogla koristiti kao štap za proricanje nalazišta blaga, dok su je stari Kelti nazvali „čarobnjakovo drvo“ (Räty i sur., 2016).

2.1.2 Kemijski sastav

Složeni kemijski sastav plodova jarebike značajno se mijenja tijekom njihovog dozrijevanja.

Tablica 1. Najzastupljenije sastavnice zrelih plodova jarebike (Drvodelić i sur., 2019)

Komponenta kemijskog sastava	Udio u plodu (%)
Voda	72 %
Šećer	6 %
Organske kiseline	2,8 %
Dušične tvari	1 %

Plodovi jarebike bogati su organskim kiselinama, karotenoidima, mikroelementima, askorbinskom kiselinom i fenolnim spojevima (Raudonis i sur., 2014). Dobar su izvor vitamina, osobito vitamina A (56 mg na 100 g bobica), C (40-111,9 mg na 100 g) i E, a sadrže i sorbitol, šećerni alkohol, u količini 28-114 gL⁻¹ soka. Sorbitol se sporo metabolizira u ljudskom tijelu i stoga je pogodan kao zaslađivač za osobe koje boluju od šećerne bolesti. Polifenoli čiji je udio utvrđen u plodovima jesu fenolne kiseline (transklorognična kiselina, kafeinska kiselina, q-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina), antocijani (cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3,5-diglukozid) i flavonoidi (kvercetin, izokvercetin i rutin) (Räty i sur., 2016; Drvodelić i sur., 2019; Sarv i sur., 2020). U plodovima su također pronađene i jantarna kiselina i metoksimilna kiselina (Raspe i sur., 2000).

Usplođe obiluje mineralima (10,3 % pepela), od koji je najviše kalija, i šećerima (17,7 %). Osim kalija usplođe sadrži još i kalcij, fosfor i magnezij. Najveći postotak vlakana, 20,7 %, zabilježen je u pokožici plodova koja također sadrži više proteina i masti te kalija nego usplođe.

Glavninu suhe tvari sjemenki čine proteini (25,5 %), zatim masti (16,5 %) i vlakna (13,3 %), a velik je i udio šećera (5,5 %). Od prisutnih mineralnih tvari u sjemenkama najviše je kalija ($9,1 \text{ mgg}^{-1}$) i fosfora ($5,7 \text{ mgg}^{-1}$), a od masnih kiselina najzastupljenije su linoleinska, oleinska i u nešto manjoj mjeri palmitinska, dok je alfa-linolenska kiselina potpuno odsutna (Johansson i sur., 1997; Raspe i sur., 2000).

Premda se zna da su neki polifenoli gorki, gorčina plodova u ovom slučaju nije posljedica polifenola koje sadrže, već prekursora parasorbinske kiseline. Parasorbinska kiselina nalazi se u količini 40-250 mg na 100 g svježe tvari te je u većim količinama toksična, međutim može se ukloniti zagrijavanjem, sušenjem ili namakanjem u kiseloj otopini (Raspe i sur., 2000).

2.2 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su jedna od najčešće zastupljenih skupina fitokemikalija. Nastaju putem sekundarnog metabolizma biljaka kroz dva osnovna metabolička puta: šikimatski i acetatni put (Santhakumar i sur., 2018). Sintetiziraju se u biljkama djelomično kao odgovor na napade patogena i insekata, ranjavanje, UV zračenje, reaktivne vrste kisika i dušika te nude zaštitu od istih, a doprinose i organoleptičkim svojstvima biljaka (Khhodami i sur., 2012).

U skupinu fenola ubraja se više od 8000 spojeva različite kemijske strukture. Osnovna strukturna formula fenola je konjugirani oblik benzenskog ili aromatskog prstena na koji je direktno vezana hidroksilna skupina. U prirodi se polifenoli kreću od jednostavnih molekula, poput fenolnih kiselina pa do visoko konjugiranih fenolnih spojeva, poput tanina. Prvenstveno se javljaju u konjugiranom obliku, s jednim ili više ostataka šećera povezanih s hidroksilnim skupinama, iako postoje i izravne veze jedinica šećera s aromatskim atomom ugljika. Povezani šećeri mogu biti monosaharidi, disaharidi ili čak oligosaharidi, dok je glukoza je najčešće povezana šećerna jedinica. Često stvaraju veze i s drugim spojevima, poput karboksilnih i organskih kiselina, amina i lipida te veze s drugim fenolima (Bravo, 1998.).

Najjednostavnija podjela polifenola je na flavonoide i neflavonoide, međutim mogu se podijeliti u brojne podrazrede ovisno o broju fenolnih jedinica u molekularnoj strukturi, grupama supstituenata i vrsti veza između fenolnih jedinica (Singla i sur., 2019). Prema Beglez-Mojzer i sur. (2016) glavni razredi polifenola su flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni, lignani i tanini.

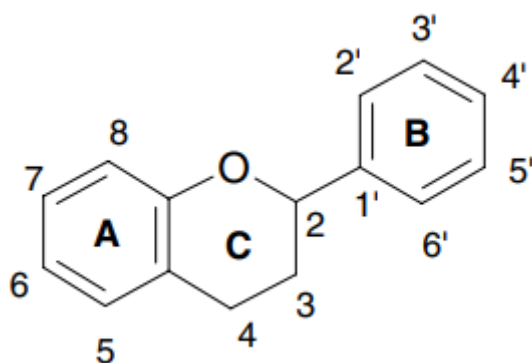
Važnost fenolnih spojeva u ljudskoj prehrani pripisuje se njihovim antialergijskim, protuupalnim, antimikrobnim, antioksidativnim, kardiotrombotičkim, kardioprotektivnim i vazodilacijskim učincima. Antioksidativno djelovanje fenolnih spojeva, odnosno sposobnost

„hvatanja“ slobodnih radikala, ovisi o njihovoj strukturi, posebno o broju i položaju hidroksilnih skupina i prirodni supstitucija na aromatskim prstenovima (Balasundram i sur., 2006).

2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najrasprostranjeniju skupinu biljnih fenola, a nalaze se u sjemenkama, kori, lišću i cvjetovima biljaka (Heim i sur., 2002). Često su uz karotenoide i klorofile odgovorni za plavu, ljubičastu, žutu, narančastu i crvenu boju (Khhodami i sur., 2012).

Molekule flavonoida imaju ugljičnu okosnicu C₆-C₃-C₆, koja se sastoji od benzo- γ -pironske strukture i fenilnog prstena. Prsten benzena i fenila označeni su kao A prsten, odnosno B prsten, dok se prsten γ -pirona koji sadrži kisik naziva C prstenom (slika 3). Flavonoidi se mogu podijeliti u različite podskupine na temelju položaja na kojem je B prsten pričvršćen za C prsten, te oksidacijskog statusa i stupnja zasićenja heterocikličkog prstena. Jedna prepoznatljiva podskupina flavonoida je izoflavon, na kojem je B prsten pričvršćen na položaju 3 C prstena dok ostale podskupine, uključujući flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, antocijanidin i flavanol, imaju B prsten pričvršćen na položaj 2 C prstena (Ku i sur., 2020).



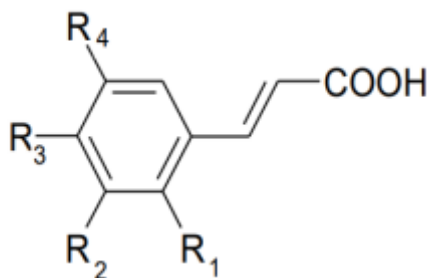
Slika 3. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Balasundram i sur., 2006)

Većina blagotvornih učinaka flavonoida na zdravlje pripisuje se njihovim antioksidativnim i kelirajućim sposobnostima. Zbog svoje sposobnosti da inhibiraju oksidaciju lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*, LDL), flavonoidi su pokazali jedinstvene kardioprotektivne učinke (Heim i sur., 2002).

2.2.2 Fenolne kiseline

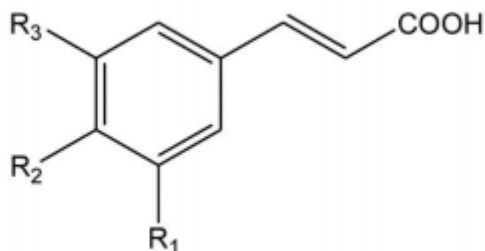
Fenolne ili fenolkarboksilne kiseline nalaze se u mnogim namirnicama biljnog porijekla, a sjemenke i kora voća te lišće povrća sadrže ih u najvišim koncentracijama. Uglavnom su prisutne vezane u obliku amida, estera ili glikozida, a rijetko u slobodnom obliku. Prema osnovnoj strukturi dijele se na dvije podskupine: hidroksibenzojevu i hidroksicimetnu kiselinu (Kumar i Goel, 2019).

Četiri najčešće hidroksicimetne kiseline su ferulinska, kafeinska, p-kumarinska i sinapinska kiselina. Hidroksicimetne kiseline, dobivene iz cimetne kiseline, prisutne su u hrani često kao jednostavni esteri s kininskom kiselinom ili glukozom (Kumar i Goel, 2019).



Slika 4. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Robards i sur., 1999)

Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su galna, elaginska, protokatehinska, vanilinska, siringinska i salicilna kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline imaju zajedničku strukturu C6-C1 i potječu od benzojeve kiseline (Kumar i Goel, 2019).



Slika 5. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

2.2.3 Fenolni spojevi jarebike

Najzastupljenije fenolne kiseline zabilježene u biljkama iz roda *Sorbus* jesu klorogenske (3-O-kafeoilkinovska kiselina, 3-CQA) i neoklorogenske kiseline (5-O-kafeoilkinovska kiselina, 5-CQA). Glavninu, točnije 56–80 % ukupnih fenola u plodovima jarebike čine kafeoilkininske kiseline, a njihov sadržaj kod uzgajanih bobica niži je nego kod divljih. Sadržaj klorogenske kiseline u plodovima *S. aucuparia* iznosi do 10,01 mgg⁻¹ suhe mase, a u ekstraktima vode i metanola, kao i u pekmezu iznosi 5,69, 5,80 i 2,60 mgg⁻¹ suhe tvari. Neke druge dobro poznate fenolne kiseline i njihovi derivati poput cimeta, vanilije, p-kumarne i benzojeve kiseline pronađene su u tragovima u plodovima *S. aucuparia*, dok je prisutnost kofeinske kiseline i njenih derivata također zabilježena (Sarv i sur., 2020).

Od prisutnih flavonoida u plodovima *S. aucuparia* sadržaj kvercetina iznosi 0,51 mgg⁻¹ suhe mase, sadržaj rutina u vodenom i metanolnom ekstraktu je sličan, 82,3, odnosno 80,4 μgg⁻¹ suhe mase, dok je ukupan sadržaj proantocijanidina u vodenom ekstraktu komine 10,4 i 3,8 puta veći od onog zabilježenog u ekstraktu acetona i etanola. Sadržaj antocijana čini manje od 1 % ukupnih fenola u plodovima *S. aucuparia*, a prisutnost epikatehina također zabilježena (Sarv i sur., 2020).

2.2.4 Metode ekstrakcije fenolnih spojeva

Na odabir metode ekstrakcije utječe više čimbenika, među kojima kemijska priroda tvari, veličina čestica uzorka te prisutnosti ometajućih tvari, dok su vrijeme ekstrakcije, temperatura, broj ponavljanja, izbor otapala za ekstrakciju kao i omjer otapala i otopljene tvari ključni parametri koji utječu na prinos ekstrakcije (Beglez-Mojzer i sur., 2016).

Metode ekstrakcije dijele se na konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (nove, suvremene) (Azmir i sur., 2013).

Već dugi niz godina konvencionalne tehnike široko su prihvaćene, uglavnom zbog jednostavnosti uporabe i široke primjene. Takvi postupci uključuju uporabu konvencionalnih otapala poput alkohola (metanol, etanol), acetona, dietil etera i etil acetata, često pomiješanih u različitim omjerima s vodom. Učinkovitost ekstrakcije bilo koje konvencionalne metode uglavnom ovisi o izboru otapala, a polarost ciljanog spoja najvažniji je čimbenik pri njegovom odabiru. Korištenje konvencionalnih otapala ima nekoliko nedostataka, osim mogućeg opasnog učinka na zdravlje ljudi, ostaci otapala također mogu ostati u konačnim proizvodima što zahtijeva dodatne korake pročišćavanja koji oduzimaju puno vremena i utječu na ukupne

troškove procesa. S druge strane, nekonvencionalne metode, razvijene tijekom posljednjih 50 godina, ekološki su prihvatljivije zbog smanjene uporabe sintetičkih i organskih kemikalija te boljeg prinosa i kvalitete ekstrakta (Azmir i sur., 2013; Beglez-Mojzer i sur, 2016).

Osnovni cilj ekstrakcije je izolacija što veće količine željene tvari, a da pritom izolirana tvar ima što veću kvalitetu. Prinos i brzina ekstrakcije polifenola povezani su s karakteristikama otapala. Utvrđeno je da je metanol učinkovitiji u ekstrakciji polifenola niže molekularne mase, dok se flavanoli veće molekulske mase bolje ekstrahiraju vodenom otopinom acetona (Dai i sur., 2010). Kod ekstrakcije također je važno uzeti u obzir temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije koji značajno utječu na ekstrakcijski kapacitet fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Iako povećanje temperature pogoduje procesu ekstrakcije, jer dolazi do povećanja topljivosti spoja u otapalu te povećanja koeficijenta difuzije, fenolni spojevi podložni su hidrolizi i oksidaciji pri temperaturama višim od 60°C. Stoga, predugo vrijeme trajanja ekstrakcije i visoka temperatura pospješuju razgradnju i oksidaciju fenolnih spojeva što dovodi do smanjenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktu (Spigno i De Faveri, 2007).

2.3 Antioksidacijski kapacitet

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća nedovoljno iskorištene biljke postale su posebno zanimljive u eri funkcionalne hrane i nutraceutičkih proizvoda. Sve veći broj studija o fitokemikalijama i antioksidacijskom potencijalu jarebice vodi k proširenju njezine upotrebe kao inovativnog sastojka hrane, nutraceutika ili sastojka kozmetičkih pripravaka (Sarv i sur., 2020).

Glavni polifenolni spojevi jarebice odgovorni za izražena antioksidativna svojstva su fenolne kiseline (uglavnom kofeolkininske kiseline), flavonoli (kvercetin, izokvercetin, hiperozid, rutin, katehin, epikatehin), antocijani (uglavnom cijanidin ili pelargonidin glikozidi) i proantocijanidini na čiji sastav utječu faza zrelosti, genotip, vrsta, zemljopisno podrijetlo, klimatski uvjeti i uvjeti okoliša (Bobinate i sur., 2020).

Pokretanje i razvoj raka povezani su s oksidativnim stresom koji može uzrokovati oksidativno oštećenje staničnih makromolekula, uključujući deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA), ribonukleinsku kiselinu (RNA), proteine i lipide (Saha i sur., 2017.). Egzogeni antioksidansi, poput fenolnih spojeva, koji mogu ukloniti reaktivne vrste kisika (ROS), kelatne metale i pojačati enzimske i neenzimske sustave, smatraju se obećavajućim zaštitnim pa čak i terapijskim sredstvima za upravljanje patologijama posredovanim oksidativnim stresom.

Antioksidativni učinek plodova jarebice izravno je povezan s njihovim potencialom protiv raka (Baby i sur., 2018).

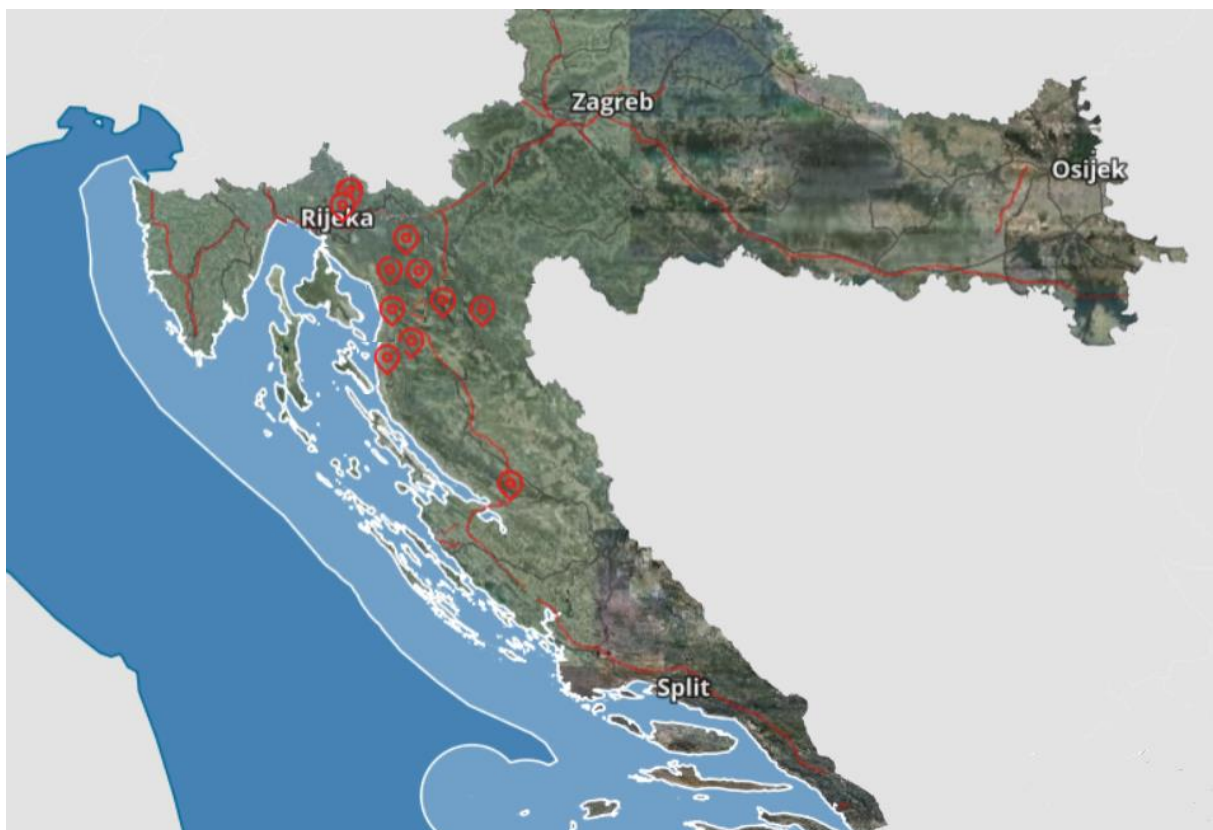
U usporedbi s plodovima drugih vrsta iz *Sorbus spp.*, plodovi *S. aucuparia* pokazuju bolju sposobnost uklanjanja DPPH, $\cdot\text{NO}$, $\text{O}_2\cdot$ i $\text{HO}\cdot$ slobodnih radikala, a navedena sposobnost povezuje se s ukupnim sadržajem fenola te antioksidativnim kapacitetom (Sarv i sur., 2020).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci

U ovom istraživanju korišteni su zreli plodovi planinske jarebrike s različitih lokaliteta Velebita i Gorskog kotara (n=50) (Slika 6). Berba plodova je obavljena u periodu zrelosti u kolovozu i rujnu 2020. godine, nakon čega su plodovi dopremljeni u Laboratorij, zatim pakirani, zamrznuti i skladišteni na temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja analize (Slika 7).



Slika 6. Lokacije uzorkovanja planinske jarebrike (vlastita slika, <https://geoportal.dgu.hr/>)



Slika 7. Smrznuti plodovi jarebike (vlastita fotografija)

Prije početka analize plodovi jarebike odmrznuti su na sobnoj temperaturi, a nakon odmrzavanja su homogenizirani mikserom. Homogenizirana kaša korištena je za daljnju analizu (Slika 8).



Slika 8. Homogenizirani plodovi jarebike (vlastita fotografija)

3.1.2 Kemikalije

- Destilirana voda
- Folin-Cocalteu reagens (Kemika, Zagreb)
- Galna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Klorovodična kiselina (HCl), 2 %
- Metanol (HPLC čistoće)
- Natrijev karbonat (Poch S.A., Sowinskiego, Poland)

3.1.3 Aparatura i pribor

- Analitička vaga (tip AX 200, Shimadzu)
- Automatske pipete
- Boca za odsisavanje
- Büchnerov lijevak
- Erlenmeyerove tikvice, volumena 50 mL
- Filter papir (21/N 80 gm⁻¹, Munktell)
- Graduirane pipete, volumena 10 mL
- Menzura
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL, 1000 mL
- Plastične kivete
- Plastične žličice
- Propipeta
- Staklene čaše
- Staklene epruvete
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapić
- Tehnička vaga (tip ET 1111, Tehnica, Železniki Jugoslavija)
- Tresilica (MI0103002 *laboratory orbital linear shaker*)
- UV/VIS Spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu; Slika 9)
- Vodena kupelj (itron 16, INKO)
- Vortex mješalica (tip VV3 S40)
- Štapni mikser (Philips, ProMix))



Slika 9. Spektrofotometar Shimadzu UV-1280 (vlastita fotografija)

3.4. Metode rada

Postupkom ekstrakcije s ekstrakcijskim otapalom dobiveni su ekstrakti u kojima se zatim spektrofotometrijski određivao maseni udio fenolnih spojeva (ukupni fenoli).

3.4.1 Postupak ekstrakcije

Kemikalije:

- **Otopina 2 % HCl**

U odmjernoj tikvici od 100 mL razrijedi se 5,4 mL klorovodične kiseline (37 %) s destiliranom vodom.

- **Otapalo za ekstrakciju: MeOH/2 % HCl (95:5)**

U odmjernoj tikvici od 200 mL otpipetira se 10 mL klorovodične kiseline (2 %) te nadopuniti metanolom do oznake.

U Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL izvaže se 6,000 g homogeniziranog uzorka ($\pm 0,001$ g) te se doda 20 mL otapala za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl) pomoću staklenog lijevka. Otopina se

stavi na tresilicu, smještenu na tamnom mjestu 90 minuta te se nekoliko puta otvori čep kako bi se tlakovi izjednačili. Nakon završetka ekstrakcije uzorci se profiltriraju pod vakuumom, a dobiveni ekstrakt prelije u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni do oznake otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl).

Priređene ekstrakte potrebno je čuvati na +4°C do provođenja analiza.

3.4.2. Određivanje ukupnih fenola

Kemikalije:

- **Otopina Folin-Ciocalteu reagensa**

Na dan analize razrijedi se 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa s 2 mL destilirane vode.

- **Zasićena otopina natrijeva karbonata ($\gamma=200 \text{ mg mL}^{-1}$)**

10 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 40 mL vruće destilirane vode, u odmjernoj tikvici od volumena 50 mL te se ohladi na sobnu temperaturu i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Tako pripremljena otopina ostavi se stajati 24h nakon čega slijedi filtracija.

- **Stock otopina galne kiseline ($\gamma=5 \text{ mg mL}^{-1}$)**

250 mg galne kiseline otopi se u metanolu u odmjernoj tikvici od 50 mL.

Princip određivanja

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin–Ciocalteu reagensom pri kojoj nastaje plavo obojenje koje se potom mjeri pri 765 nm. Folin–Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibdene i fosfovolframove kiseline koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva u blago alkalnim uvjetima reduciraju u molibdenov oksid i volframov oksid, plave boje. Redukcija kiselina odnosno plavo obojenje bit će intenzivnije što je prisutan veći broj hidroksilnih ili oksidirajućih skupina u fenolnim tvarima.

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je napraviti razrijeđenja iz prethodno pripremljene stock otopine galne kiseline, u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da koncentracije standardne otopine galne kiseline iznose 0, 25, 50, 100, 150, 250 i 500 mgL^{-1} .

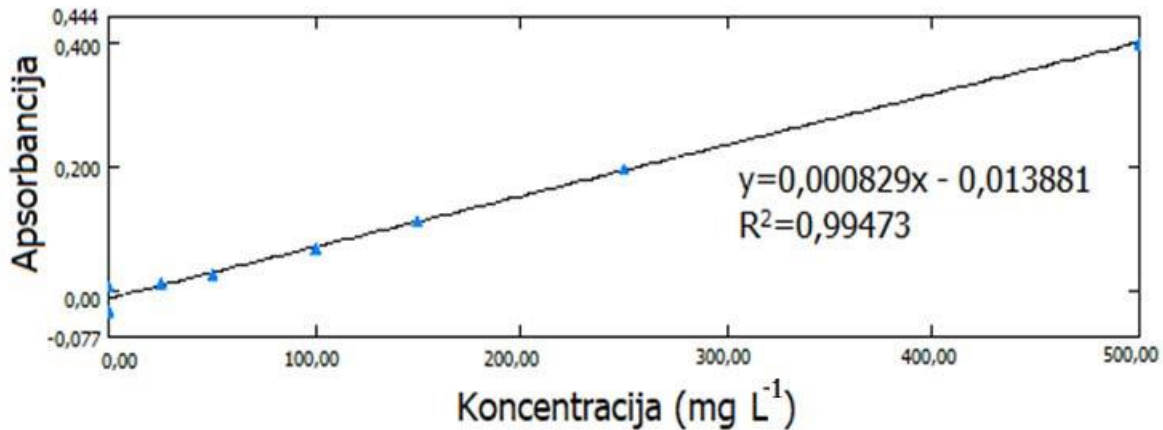
Za pripremu razrijeđenja u odmjerne tikvice od 100 mL doda se redom 0, 0,5, 1, 2, 3, 5 i 10 mL stock otopine galne kiseline te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

U epruvete se otpipetira 40 μL uzorka iz svake tikvice, 3160 μL destilirane vode i 200 μL otopine Folin-Cocalteau reagensa te se sadržaj epruvete promiješa na vortexu i ostavi stajati 3 minute. Naknadno se doda još 600 μL zasićene otopine Na_2CO_3 te se sadržaj ponovno promiješa na vortexu. Pripremljeni uzorci inkubiraju se u vodenoj kupelji na 40°C 30 minuta nakon čega se mjeri apsorbancija na 765 nm. Izmjerene vrijednosti apsorbancije služe za izradu baždarnog pravca na način da se na apscisu nanese koncentracija galne kiseline (mgL^{-1}), a na ordinatu apsorbancija izmjerena pri 765 nm.

U tablici 2 prikazane su vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline i pripadajuće izmjerene vrijednosti apsorbancije prema kojima je izrađen baždarni dijagram. Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao mg galne kiseline na kg jestivog dijela uzorka (mg GAE kg^{-1}) (Tablica 2).

Tablica 2. Masene koncentracije standardnih otopina galne kiseline s pripadajućim vrijednostima apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri 765 nm.

STANDARDNA OTOPINA	γ (mgL^{-1})	A
1	0	-0,033
2	25	0,01
3	50	0,025
4	100	0,067
5	150	0,112
6	250	0,197
7	500	0,399



Slika 10. Baždarni dijagram za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva.

Postupak određivanja

Prije samog postupka određivanja uzorci se razrijede otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl) tako što se u odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetira 1 mL ekstrakta te nadopuni do oznake otapalom za ekstrakciju (MeOH/2 % HCl).

U epruvetu se otpipetira redom 40 μ L razrijeđenog ekstrakta, 3160 μ L destilirane vode i 200 μ L otopine Folin-Ciocalteu reagensa, a zatim se sadržaj epruvete promiješa na vortexu i ostavi stajati 3 min. Nakon toga se doda 600 μ L zasićene otopine Na_2CO_3 te se sadržaj ponovno promiješa na vortexu. Slijedi inkubacija u vodenoj kupelji na 40°C 30 minuta nakon čega se mjeri apsorbancija na 765 nm.

Na isti način priprema se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima ista količina otapala za ekstrakciju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Različite vrste bobičastog voća izrazito su cijenjene radi sadržaja značajne količine fenolnih spojeva iz čega proizlazi njihov velik antioksidacijski kapacitet. Autohtona biljka planinska jarebika (*Sorbus aucuparia* L.) jedna je od potencijalno bogatih fenolnim spojevima i korisnim za ljudsko zdravlje, ali je još uvijek zapostavljena. Stoga je cilj ovog rada bio utvrditi količinu ukupnih fenolnih spojeva u plodovima jarebice.

U ovom radu prikazani su rezultati istraživanja kojim se spektrofotometrijski određivao sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima zrelih plodova jarebice. Prilikom ekstrakcije korišteno otapalo za ekstrakciju sadržavalo je metanol i 2 % HCl u omjerima 95:5.

Tijekom ovog istraživanja analizirano je 50 uzoraka planinske jarebice s 12 različitih lokaliteta na području Velebita i Gorskog kotara (Slika 6). Svi uzorci su nakon berbe bili zamrznuti do daljnjih analiza. Analize svih uzoraka provedene su kroz tri paralelna mjerenja.

U tablici 3. i tablici 4. prikazani su udjeli ukupnih fenola izraženih kao mg GAE kg⁻¹ jestivog djela.

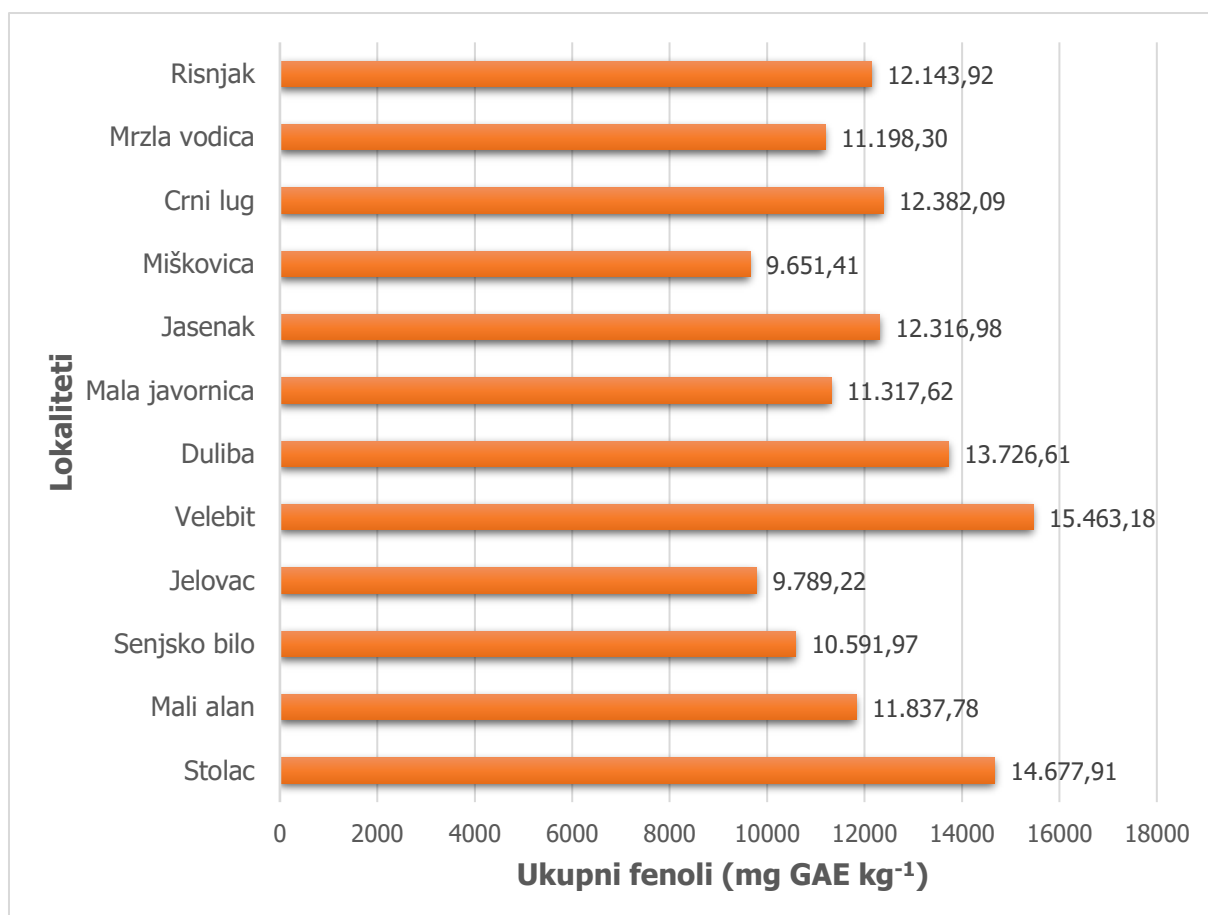
Tablica 3. Udio ukupnih fenola (mg GAE kg⁻¹) uzoraka planinske jarebике prikupljene s marko lokacije Gorski kotar.

LOKALITET	ŠIFRA UZORKA	UDIO UKUPNIH FENOLA	PROSIJEK
MALA JAVORNICA	MJ1	11338,90	11317,62
	MJ2	11224,65	
	MJ4	10301,53	
	MJ5	11075,12	
	MJ6	12647,93	
	JASENAK	JA1	
JA2		10601,70	
JA3		12880,81	
JA4		13197,93	
JA5		12486,9	
MIŠKOVICA	M1	10112,96	9651,411
	M2	10098,14	
	M3	8743,13	
CRNI LUG	CL2	12472,61	12382,09
	CL3	11880,88	
	CL4	11422,20	
	CL5	13838,86	
	CL6	12295,92	
MRZLA VODICA	MV7	12579,93	11198,3
	MV8	12011,35	
	MV10	11074,82	
	MV11	9263,506	
	MV12	11061,87	
RISNJAK	R1	15142,39	12143,92
	R3	12498,57	
	R5	11441,75	
	R6	10707,42	
	R7	10929,47	
PROSIJEK LOKACIJE (GORSKI KOTAR)			11633,89 ± 1369,79

Tablica 4. Udio ukupnih fenola (mg GAE kg⁻¹) uzoraka planinske jarebике prikupljene s marko lokacije Velebit.

LOKALITET	ŠIFRA UZORKA	UDIO UKUPNIH FENOLA	PROSIJEK
STOLAC	S1	12690,91	14677,91
	S2	12598,33	
	S3	18744,47	
MALI ALAN	MA1	13902,57	11837,78
	MA2	11518,6	
	MA4	12129,5	
	MA5	10626,03	
	MA9	11012,18	
SENJSKO BILO	SB1	10335,83	10591,97
	SB2	11487,63	
	SB3	9952,44	
JELOVAC	JE2	9087,78	9789,219
	JE3	10490,66	
VELEBIT	V2	10778,33	15463,18
	V3	11591,19	
	V4	12516,11	
	V6	11642,3	
	V7	30777,96	
DULIBA	D1	12033,44	13726,61
	D2	13800,06	
	D3	16259,43	
	D4	12813,51	
PROSIJEK LOKACIJE (VELEBIT)			13036,33 ± 4494,14

Na slici 11. prikazane su prosječne vrijednosti ukupnih fenola s dvanaest različitih lokacija izraženih kao mg GAE kg⁻¹ jestivog dijela



Slika 11. Prosječne vrijednosti ukupnih fenola (izraženih kao mg GAE kg⁻¹ jestivog dijela) s dvanaest različitih lokacija.

U provedenom eksperimentu određen je udio ukupnih fenola izražen kao mg GAE kg⁻¹ jestivog dijela uzorka.

U tablici 3. i tablici 4. prikazani su rezultati ukupnih fenola sa 12 različitih lokaliteta. Prosječne vrijednosti ukupnih fenola na dvanaest izuzetih lokaliteta (slika 6) kreću se od 9651,41 do 15463,18 mg GAE kg⁻¹ jestivog dijela. Najveći udio ukupnih fenola zabilježen je u uzorcima s mikro lokacije „Velebit“, a najmanji imaju uzorci s lokacije „Miškovića“ (slika 11). Plodovi jarebrike izuzeti s makro lokacije „Velebit“ (tablica 4) u prosjeku sadrže veći udio ukupnih fenola od plodova izuzetih s makro lokacije „Gorski kotar“ (tablica 3). Proveden je t-test i utvrđena razlika između lokacija nije se pokazala statistički značajna ($p=0,085$).

Mikulić-Petkovsek i suradnici (2012) određivali su udio ukupnih fenola u plodovima divlje jarebrike. Dobivena koncentracija ukupnih fenola u prosjeku iznosi 5407 mg GAE kg⁻¹, što je

niže od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju, (slika 11), bliže vrijednostima određenim na lokalitetima Gorskog kotara (posebice lokaliteta „Miškovića“).

Šavikin i suradnici (2017) u svom znanstvenom radu ispitivali su udio ukupnih fenola u plodovima divlje jarebice sakupljenim na području Srbije i Crne gore. Dobiveni udjeli ukupnih fenola u njihovom istraživanju iznose 5,25-15,91 mg GAE g⁻¹ suhe tvari, sa čime su u skladu (nešto su manji ili upadaju u raspon) rezultati dobiveni u ovom istraživanju, koji se kreću od 2,01 (lokacija „Jelovac“) - 6,39 (lokacija „Velebit“) mg GAE g⁻¹ suhe tvari.

U znanstvenom radu koji su proveli Tahirović i suradnici (2019) rezultati pokazuju kako udio ukupnih fenola u plodovima divlje jarebice, sakupljenih na području Bosne i Hercegovine, iznosi 10,13 mg GAE g⁻¹. Ovi rezultati su najviše u skladu s rezultatima ovog završnog rada.

Smrzavanje i skladištenje voća u smrznutom stanju može dovesti do oslobađanja antioksidativnih spojeva i njihove razgradnje zbog kemijskih i enzimskih oksidacijskih reakcija (Neri i sur., 2020). Iz tog razloga, analizirani plodovi mogu imati niži udio fenolnih spojeva te nižu antioksidacijsku aktivnost u odnosu na svježi ili drugačije skladišten proizvod, što može biti razlog zašto se rezultati ovog istraživanja razlikuju od dosadašnjih istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

Prema prikazanim rezultatima i raspravi može se zaključiti sljedeće:

1. Udio ukupnih fenola u plodovima jarebike u prosjeku iznosi od 9651,411 do 15463,18 mg GAE kg⁻¹ (jestivog djela), gdje je vidljiva razlika u rezultatima između lokacija, pri čemu su uzorci s makro lokacije „Velebit“ bogatiji ukupnim fenolima u odnosu na makro lokaciju „Gorski kotar“, ali ne statistički značajno.
2. Vrijednosti udjela ukupnih fenola koji su utvrđeni u sklopu ovog istraživanja ukazuju na visoku antioksidacijsku aktivnost plodova planinske jarebike, što je u skladu sa sličnim istraživanjima provedenim u regiji.

6. POPIS LITERATURE

- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**:426–436
- Baby B., Antony P., & Vijayan R. (2018). Antioxidant and anticancer properties of berries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **58**:2491–2507
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by product: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry* **99**:191-203
- Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317-333
- Brglez-Mojzer E., Hrnčič M. K., Škerget M., Knez Ž., Bren U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**:901
- Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant phenolic: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**:7313-7352
- Drvodelić D., Jemrić T., Oršanić M. (2019) Jarebika (*Sorbus aucuparia* L.): važnost, uzgoj i uporaba. Sveučilište u Zagrebu – Šumarski fakultet
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**:572-584
- Hukkanen A. T., Pölönen S. S., Kärenlampi S. O., Kokko H. I. (2006) Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Sweet Rowanberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:112-119
- Johansson A., Laakso P., Kallio H. (1997) Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Z Lebensm Unters Forsch* **204**:300-307
- Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**:2328-2375
- Kumar N., Goel N. (2019) Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* **24**

- Mlcek J., Rop O., Jurikova T., Sochor J., Fiser M., Balla S., Baron M., Hrabe J. (2014) Bioactive compounds in sweet rowanberry fruits of interspecific Rowan crosses. *Open life sciences* **9**: 1078-1086
- Neri L., Faieta M., Di Mattia C., Sacchetti G., Mastrocola D., Pittia P. (2020) Antioxidant Activity in Frozen Plant Foods: Effect of Cryoprotectants, Freezing Process and Frozen Storage. *Foods* **9**:1886
- Olszewska M. A., Michel P. (2009) Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three Sorbus species in relation to their polyphenolic composition. *Natural Product Research* **23**:1507-1521
- Poyrazoglu E. S. (2004) Changes in ascorbic acid and sugar content of rowanberries during ripening. *Journal of Food Quality* **27**:366-370
- Raspé O., Findlay C., Jacquemart A. (2000) Sorbus aucuparia L. *Journal of Ecology* **88**: 910-930
- Räty M., Caudullo G., De Rigo D. (2016) European Atlas of Forest Tree Species, str. 176-177
- Raudonis R., Raudonė L., Gaivelytė K., Viškelis P., Janulis V. (2014) Phenolic and antioxidant profiles of rowan (Sorbus L.) fruits. *Natural Product Research* **28**:1231-1240
- Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**:401-436
- Saha S. K., Lee S. B., Won J., Choi H. Y., Kim K., Yang G. M., Dayem A. A, Cho S. G. (2017). Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *International Journal of Molecular Sciences* **18**:1544.
- Sarv V., Venskutonis P. R., Bhat R. (2020) The Sorbus spp.—Underutilised Plants for Foods and Nutraceuticals: Review on Polyphenolic Phytochemicals and Antioxidant Potential. *Antioxidans* **9**:81
- Singla R. K., Dubey A. K., Garg A., Sharma R. K., Fiorino M., Ameen S. M., Haddad M. A., Al-Hiary M., Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International* **102**:1397-1400
- Spigno G., De Faveri D. M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* **78**:793–801

Šavikin K. P., Zdunić G. M., Krstić-Milošević D. B., Šircelj H. J., Stešević D. D., Pljevljakušić D. S. (2017) Sorbus aucuparia and Sorbus aria as a Source of Antioxidant Phenolics, Tocopherols, and Pigments. *Chemistry and biodiversity* **14**:e1700329

Zymone K., Raudone L., Raudonis R., Marksa M., Ivanauskas L., Janulis V. (2018) Phytochemical Profiling of Fruit Powders of Twenty Sorbus L. Cultivars. *Molecules* **23**:2593

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Božica Jerak