

Karakterizacija kemijskog sastava i antioksidacijski potencijal plodova biljke jarebike (*Sorbus Aucuparia* L.) s različitih prirodnih staništa u Republici Hrvatskoj

Kragić, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:983646>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Karla Kragić

**KARAKTERIZACIJA
KEMIJSKOG SASTAVA I
ANTIOKSIDACIJSKI
POTENCIJAL PLODOVA BILJKE
JAREBIKE (*Sorbus aucuparia* L.) S
RAZLIČITIH PRIRODNIH
STANIŠTA U REPUBLICI
HRVATSKOJ**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda i u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Rumore Samarin, te uz pomoć dr. sc. Antonije Sulimanec Grgec.

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Ivani Rumori Samarin na prihvaćanju izazova, stručnim savjetima, ukazanom povjerenju i podršci tijekom svih faza izrade rada, dr. sc. Antoniji Sulimanec Grgec na gostoprimstvu u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu radu i strpljivom mentoriranju dijela rada i Valentini Hohnjec na svim tajnama laboratorijskog rada i na brojnim savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala mojim prijateljima na svakom druženju, izlasku i zajedničkom učenju. Uz Vas je studentsko doba zaista bilo najljepše.

Luciju, hvala što si mi uvijek bio najveća podrška i što vjeruješ u moje snove čak i kada ja ne vjerujem.

Mama i tata, hvala Vam što mi ničeg nije nedostajalo.

Za kraj, najveće hvala mojim bakama. Za njih, propušten poziv ne postoji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

KARAKTERIZACIJA KEMIJSKOG SASTAVA I ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL PLODOVA BILJKE JAREBIKE (*SORBUS AUCUPARIA L.*) S RAZLIČITIH PRIRODNIH STANIŠTA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Karla Kragić, univ. bacc. nutr.

0058210359

Sažetak: Jarebika je autohtona biljka čiji se plodovi smatraju bobičastim voćem. Iako se svježi plodovi divlje jarebике smatraju otrovnim zbog sadržaja parasorbinske kiseline, u narodnoj medicini koristila se kao ljekovito sredstvo zbog njenog antioksidativnog djelovanja, odnosno sadržaja fenolnih spojeva, vitamina i minerala. Ovim radom ispitan je osnovni kemijski sastav jarebике (voda 75,72 %, ukupni šećeri 4,70 %, proteini 2,93 %, masti 1,48 %, celuloza 1,32 %, pepeo 1,07 %), količina ukupnih fenola ($9322,29 \pm 3296,28$ mg GAE/kg), antioksidativni kapacitet DPPH i FRAP metodom ($60,14 \pm 14,48$ %; $23,73 \pm 6,58$ mmol (FE)/100 g s.t.) te sadržaj mineralnih elemenata. Rezultati ovog istraživanja uspoređeni su sa sličnim istraživanjima. Dodatnim istraživanjima mogao bi se iskoristiti potencijal ove biljke, koja bi svoju primjenu mogla pronaći u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, u obliku dodatka prehrani i funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

Ključne riječi: *jarebika, antioksidativni kapacitet, mineralni sastav*

Rad sadrži: 55 stranica, 22 slike, 19 tablica, 49 literaturnih navoda, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Rumora Samarin

Pomoć pri izradi: dr. sc. Antonija Sulimanec Grgec

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Nada Vahčić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Ivana Rumora Samarin (mentor)
3. dr. sc. Antonija Grgec Sulimanec, znan. sur., IMI (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Marković (zamjenski član)

Datum obrane: 30. rujna, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

CHARACTERIZATION OF CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ROWANBERRIES (*SORBUS AUCUPARIA L.*), FROM DIFFERENT NATURAL HABITATS IN REPUBLIC OF CROATIA

Karla Kragić, univ. back. nutr.

0058210359

Abstract: Rowanberry is an indigenous plant whose fruits are considered berries. Although the raw fruits of the wild rowanberry are considered poisonous due to the content of parasorbic acid, it has been used in folk medicine as a medicinal agent. The reason is its antioxidant action, i.e. the content of phenolic compounds, vitamins, and minerals. This study examined basic chemical composition (water 75.72 %, total sugar 4.70 %, proteins 2.93 %, fat 1.48 %, cellulose 1.32 %, ash 1.07 %), the amount of total phenols (9322.29 ± 3296.28 mg GAE/kg), the antioxidant capacity of DPPH and FRAP (60.14 ± 14.48 %; 23.73 ± 6.58 mmol (FE)/100 g d.m.), and mineral content. The results of this study were compared with similar studies. Further research is needed to exploit the potential of this plant, which could find its application in the pharmaceutical and food industries as a supplement or functional food.

Keywords: *rowanberry, antioxidant capacity, mineral content*

Thesis contains: 55 pages, 22 figures, 19 tables, 49 references, 3 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ivana Rumora Samarin, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Antonija Sulimanec Grgec, PhD.

Reviewers:

1. Nada Vahčić, PhD, Full professor (president)
2. Ivana Rumora Samarin, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Antonija Sulimanec Grgec, PhD, Research associate (member)
4. Ksenija Marković, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 30th, 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
3. TEORIJSKI DIO	2
3.1 JAREBIKA	2
3.1.1. Botanička pripradnost i dendrološki opis jarebike	3
3.1.2. Rasprostranjenost jarebike	3
3.1.3. Karakteristike jarebike s obzirom na okolišne čimbenike	4
3.1.4. Berba i čuvanje plodova jarebike	5
3.1.5. Upotreba jarebike	5
3.1.6. Kemijski sastav jarebike	6
3.1.7. Obećavajuće dobrobiti za zdravlje i primjena u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji	7
3.2. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE	8
3.2.1. Slobodni radikali i antioksidansi	8
3.2.2. Mehanizam djelovanja antioksidansa	9
3.2.3. Antioksidansi u hrani	9
3.2.3.1. Vitamini	9
3.2.3.2. Minerali	10
3.2.3.3. Fenoli	10
3.3. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL JAREBIKE	11
4. EKSPERIMENTALNI DIO	12
4.1. MATERIJALI	12
4.2. METODE	16
4.2.1. Priprema uzoraka za analizu	16
4.2.1.1. Ekstrakcija uzoraka za određivanje antioksidacijskog kapaciteta	16
4.2.1.2. Priprema uzoraka za multielementnu analizu metodom ICP-MS	16
4.2.2. Određivanje udjela vode	17
4.2.3. Određivanje udjela mineralnog ostatka	18
4.2.4. Određivanje udjela reducirajućih šećera	19
4.2.5. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahlu	21
4.2.6. Određivanje udjela masti metodom po Soxhletu	22
4.2.7. Određivanje ukupnih fenola	23
4.2.8. DPPH metoda	25
4.2.9. FRAP metoda	28
4.2.10. Određivanje sadržaja elemenata primjenom ICP-MS metode	29
4.2.11. Obrada podataka	30
5. REZULTATI I RASPRAVA	31
5.1. ODREĐIVANJE OSNOVNOG KEMIJSKOG SASTAVA	31

5.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	39
5.2.1. Određivanje ukupnih fenola	39
5.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	41
5.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	43
5.3. Određivanje sadržaja mineralnih tvari	45
7. ZAKLJUČCI	51
9. LITERATURA	52

1. UVOD

Jarebika je bobičasto voće koje pripada porodici *Rosaceae*, rod *Sorbus*. Ovisno o vrsti, u prirodi se nalazi kao grm ili kao drvo, a specifična je po jarko crvenim, sjajnim, okruglim plodovima.

Neopravdano je zanemareno korištenje ove biljke, kako njezinih plodova, tako i lišća i cvijeća. Pretpostavlja se da, zbog sadržaja polifenolnih spojeva, ima visoki antioksidativni i antimikrobni potencijal. Sirovi plodovi jarebike se, zbog sadržaja parasorbinske kiseline i hidrogen cijanida smatraju toksičnim za zdravlje ljudi. Toplinskom obradom i preradom plodova u džemove, sokove i slične prehrambene proizvode, kao i sušenjem ili potapanjem plodova u otopini octa, toksični učinci navedenih spojeva se smanjuju (Mlček i sur., 2014).

Današnji užurban način života ljudi zahtijeva, između ostalog, prehranu bogatu antioksidansima kako bi se smanjio učinak oksidativnog stresa u organizmu. Bobičasto voće predstavlja odličan izvor prirodnih antioksidansa, a konzumacija u adekvatnoj količini smanjuje rizik od kroničnih bolesti poput pretilosti, dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti i nekih vrsta raka (Bincy i sur., 2017). Brojna istraživanja usmjerena su na mogućnost upotrebe ekstrakata bobičastog voća kao dodatka prehrani, poput aronije i goji bobica. Jarebika, autohtona biljka našeg područja s bogatim nutritivnim sastavom i obećavajućim antioksidativnim kapacitetom, potencijalno je iskoristiva u farmakološko-prehrambenoj industriji, zbog čega je predmet ovog istraživanja.

Cilj ovog rada je određivanje osnovnog kemijskog sastava, udjela pojedinih mineralnih elemenata i antioksidativnog potencijala u uzorcima ploda jarebike, sakupljenih na lokacijama na području Velebita i Gorskog kotara na kojima su autohtono prisutne. U tu svrhu primijenjene su sljedeće metode: određivanje udjela vode, određivanje udjela pepela, određivanje udjela masti metodom po Soxhletu, određivanje udjela ukupnih šećera, određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahlu, određivanje ukupnih fenola, određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH i FRAP metodom i određivanje mineralnih elemenata masenom spektrometrijom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Rezultati ovog rada bit će uspoređeni s rezultatima sličnih istraživanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JAREBIKA

Jarebika (*Sorbus aucuparia*) je drvo prirodno široko rasprostranjeno u europskim planinskim regijama i uzgojeno kao ukrasno bilje u parkovima i vrtovima diljem Europe i Sjeverne Amerike zahvaljujući dekorativnom lišću, bogatim cvjetovima i jarko obojenim plodovima (Slika 1). Prvi zabilježeni podaci korištenja jarebrike datiraju iz 6650–6400 godine pr. Kr. na području današnje južne Švedske (Regnell i sur., 1995). Plodovi se konzumiraju sirovi ili prerađeni u džemove i pića. Veće količine sirovih plodova mogu biti toksične zbog sadržaja parasorbinske kiseline. Količina parasorbinske kiseline pozitivno korelira s gorčinom ploda pa ovo ne vrijedi za slatke, prezrele plodove. Plodovi jarebrike koriste se u tradicionalnoj medicini za liječenja brojnih stanja poput bolesti jetre i bubrega te gastrointestinalnih smetnji. U nekim zemljama, jarebika se koristila i kao sredstvo za regulaciju šećerne bolesti (Sołtys i sur., 2020; Šavikin i sur., 2017).



Slika 1. Plodovi jarebrike (izvor: Anonymous, 2022)

U Hrvatskoj se, o jarebici, tijekom povijesti vrlo malo pisalo, iako je u ostatku Europe i svijetu bila poznata. Prvi pisani trag o jarebici i njezinoj rasprostranjenosti u Hrvatskoj pronađen je u radu Ettinger (1889) Priegled drveća i grmlja od osobite vrsti, koje raste u perivoju Maksimiru

kada je o njoj napisao sljedeće: “*Sorbus aucuparia* (*Vogelbeerbaum*), jarebika, drvo domaće; raste po brdih, ima liep crljeni plod.“. Nažalost, danas se u cijelom Maksimiru ne može pronaći niti jedno drvo jarebike.

Jarebika je relativno jednostavna vrsta za uzgoj u kontinentalnom dijelu Republike Hrvatske s obzirom na to da dobro tolerira onečišćenje zraka, niske temperature i veće količine vode (Drvodelić, 2019).

2.1.1. Botanička pripradnost i dendrološki opis jarebike

Rod *Sorbus* L. pripada porodici *Rosaceae*, potporodici *Pomoideae* i obuhvaća do 250 vrsta listopadnog drveća i grmlja rasprostranjenog na sjevernoj polutci. Ime roda *Sorbus* L. dolazi od latinske riječi *sorbum*, što je bio naziv za plodove prave oskoruše (*Sorbus domestica* L.). Vrste *Sorbus* mogu se podijeliti u 3 podroda: jarebike i oskoruše (*Sorbus* L. subg. *Aucuparia* i *Cormus*), mukinje i mukinjice (*Sorbus* L. subg. *Aria* i *Chamaemespilus*) i brekinje (*Sorbus* L. subg. *Torminaria*). Vrste roda *Sorbus* L. različitih su visina, od niskog grma do srednje visokog stabla. Ime vrste *aucuparia* potječe iz latinskog jezika od riječi *avis*, što znači ptica i *capio*, što znači hvatam, jer su se u prošlosti plodovi jarebike koristili kao mamci u zamkama za hvatanje ptica (Drvodelić i sur., 2019; Sarv i sur., 2020).

Jarebika, drugog imena planinska oskoruša ili smrdeljika, raste kao stablo visine oko 15 m. Kora drveta je sivkasta i glatka, krošnja uska s uspravnim granama. Pupovi su goli, sivosmeđi s lenticelama. Listovi su različitih veličina, sastoje se od manjih ušiljenih listića, a cvjetovi tvore krupne, bijele cvatove. Plodovi su sitni, promjera 7-9 mm, okruglasti, u početku žute, kasnije sjajnocrvene boje (Drvodelić, 2010; Raspe i sur., 2000).

2.1.2. Rasprostranjenost jarebike

Jarebika je najviše rasprostranjena u Europi, na sjeveru od Islanda i sjeverne Rusije (izuzev Arktika) preko središnje Europe sve do njezinih južnih dijelova, poput planina središnje Španjolske i Portugala, Korzike, Italije, Balkanskog poluotoka, Kavkaza i Turske na istoku, izuzev područja Azora, Balearskog otočja, Krete, Farskih otoka, Sardinije i Svalbarda. U Sjevernoj Americi ova vrsta poznata je kao ukrasno drvo, pa se može pronaći u vrtovima i parkovima Kanade i Sjedinjenih Američkih Država. Jarebika uspijeva na velikim nadmorskim visinama, u Francuskoj do 2000 m, a u Norveškoj do 1500 m (Drvodelić, 2010; Raspe i sur.,

2000). Neki autori jarebiku smatraju suboceanskom vrstom (Rameau i sur., 1989), dok je drugi svrstavaju pod vrste umjerenih temperaturnih područja (Preston i Hill, 1997). Ipak, i jedni i drugi slažu se u tome da je vrsta euro-azijskog podrijetla.

U Hrvatskoj, jarebika je zabilježena u 21 šumskoj zajednici, od čega najviše u smrekovim, jelovim i bukovo-jelovim zajednicama na području Gorskog Kotara i Velebita. Ipak, uspijeva i u listopadnim šumama poput bukovih i u šumama smreke, gdje raste kao nisko drvo koje ne cvate. Lokaliteti na kojima je pronađena jarebika su: Vratnik, Mali Rajinac, Zavižan, Rožanski kukovi, Lomska duliba, Šugarska duliba, Visočica, Medačka staza, Sveto brdo, Crnopac, Tremzina i Plitvička jezera (Drvodelić i sur., 2019), kako je prikazano na Slika 2.



Slika 2. Rasprostranjenost jarebike u Hrvatskoj s obzirom na istraživanje Drvodelić i sur.(2019) (vlastita fotografija).

2.1.3. Karakteristike jarebike s obzirom na okolišne čimbenike

Jarebika se, s obzirom na stanište, svrstava u skupinu tolerantnih vrsta drveća. Slabo je do srednje osjetljiva na poplave i visoku razinu vode. Dobro podnosi i hladnoću, a apsolutne minimalne temperature su do -25°C . Jarebika uspijeva u širokom rasponu nadmorskih visina, čak i do 2000 m, iz čega se može zaključiti da tolerira snijeg i vjetar. S druge strane, jarebika

teško podnosi visoke ljetne temperature, premda neka istraživanja navode dobro preživljavanje na ovakvim temperaturama ako one ne uključuju i nedostatak vlage (Drvodelić i sur., 2019; Raspe i sur., 2010).

Ova vrsta dobro podnosi onečišćenje zraka, stoga se može pronaći u velikim gradovima i urbanim sredinama. Jarebiku ne napada velik broj vrsta insekata jer ima obrambeni kemijski mehanizam protiv defolijacije i napada insekata. Međutim, osjetljiva je na štetnike i bolesti koje napadaju porodicu *Rosaceae* (Drvodelić i sur., 2019).

2.1.4. Berba i čuvanje plodova jarebike

Beru se zreli plodovi, najbolje nakon prvih jesenskih mrazova jer hladnoća pospješuje razgradnju toksične parasorbinske kiseline. To je manje značajno za sorte koje daju slađe plodove, ali za one s izraženom gorčinom, berba nakon mrazova može se smatrati obveznom. Plodove je, za čuvanje, potrebno pripremiti sušenjem, najbolje u tankom sloju u sušarama na 40 °C. Za ponovnu upotrebu nakon sušenja, potrebno ih je napaniti kako bi omekšali i upili vlagu (Drvodelić i sur., 2019). Konzerviranje plodova jarebike zamrzavanjem nije istraženo, iako se, prema podacima o skladištenju zamrzavanjem drugog bobičastog voća, može zaključiti kako je takav način skladištenja adekvatan za mikrobiološku sigurnost, ali i očuvanje nutritivnog bogatstva bobica. Zamrzavanje ne utječe na antioksidativni kapacitet i razine vitamina C i fenola (Mullen i sur., 2002).

2.1.5. Upotreba jarebike

Razni dijelovi biljke koriste se u različite svrhe. Drvo jarebike upotrebljava se u drvnoj, kožnoj, te prehrambenoj industriji.

Dijelovi jarebike, poput kore drveta, lišća, cvijeća i ploda pokazuju ljekovita svojstva, zbog čega se koriste u narodnoj medicini. Prema nekim istraživanjima plodovi jarebike imaju antimikrobno, antireumatsko, antiseptičko, dijabetičko i diuretičko djelovanje, ali i mnoga druga (Drvodelić i sur., 2019, Zymone i sur., 2018). Oni su jestivi te se prerađuju u brojne prehrambene proizvode, likere i destilate.

Koliko je povijesno poznato, upotreba plodova jarebike u smislu hrane/prehrane započinje kao hrana (lijek) za bolesne koze (Drvodelić i sur., 2019). Koze rado jedu plodove, ali i lišće te izbojke jarebike. Nadalje, u narodnoj medicini koristi se za liječenje gastrointestinalnih

poremećaja i bronhitisa (Bobainate i sur. 2020). Također, pripremao se čaj i od drugih dijelova biljke, primjerice lišća, pa se takav koristio za liječenje gastrointestinalnih smetnji, što ne čudi, s obzirom na to da listovi jarebike imaju purgativno djelovanje (Drvodelić i sur., 2019). Kompot od jarebike, odnosno žele ili sok od plodova dobar su izvor vitamina C, stoga se mogu koristiti za liječenje deficita navedenog vitamina, odnosno otklanjanje posljedica prouzročenih tim deficitom. Plodovi sadrže i šećerni alkohol sorbitol, koji se sporo metabolizira u organizmu čovjeka, zbog čega je pogodan za dijabetičare. Također, zahvaljujući inhibitornom djelovanju fenola na aldoza reduktazu, konzumacija jarebike može ublažiti simptome šećerne bolesti poput neuropatije, nefropatije i retinopatije (Termentzi i sur., 2008).

Jarebika je važan izvor hrane za faunu. Plodovi su značajan izvor hrane za ptice, ali i zečeve, sobove, lisice, kune i ostale sisavce, naročito zimi. Lišće i mladi izbojci jarebike hrana su za divlje životinje poput jelena (Drvodelić i sur., 2019; Sarv i sur., 2020; Sołtys i sur., 2020).

2.1.6. Kemijski sastav jarebike

Kemijski sastav jarebike mijenja se dozrijevanjem ploda. Zreli plodovi imaju više topljive suhe tvari, karotenoida i ukupnih šećera, dok nedovoljno zreli plodovi sadrže više vitamina C. Zreli plodovi jarebike sadrže oko 72 % vode, 6 % šećera, 1 % dušičnih tvari i 2,8 % organskih kiselina. Sadržaj suhe tvari u svježem plodu kreće se u rasponu 19-34 %, dok je udio pepela 0,55-1,70 %. Procijenjena energetska vrijednost 100 g plodova iznosi 78 kcal (Drvodelić i sur., 2019).

Kao i drugo bobičasto voće, jarebika se ističe sadržajem polifenolnih spojeva poput transklorgenične kiseline, kafeinske kiseline, q-kumarinske i ferulinske kiseline. Također, značajni su i spojevi iz skupine antocijana te flavonoida.

Parasorbinska kiselina važan je inhibitor klijanja. U voću i sjemenkama jarebike nalazi se u koncentracijama 4-7 mg/g, odnosno 0,08-0,12 mg/g. Nadražuje sluznicu želuca i, u većim količinama, može izazvati gastrointestinalne smetnje i oštetiti bubrege. Ona plodu jarebike daje okus gorčine, stoga je poželjno izbjegavati konzumaciju sirovih gorkih plodova. Parasorbinska kiselina osjetljiva je na promjene temperature zbog čega grijanje ili zamrzavanje čini plodove jarebike sigurnima za konzumaciju, ako su plodovi ubrani nakon prvog mraza. U kultiviranim hibridima jarebike, parasorbinska kiselina gotovo je odsutna (Sarv i sur., 2020).

Druga toksična komponenta koja se može pronaći u plodovima jarebrike je cijanogeni glikozid prunazin, derivat aminokiseline fenilalanina. Potencijalna toksičnost cijanogenih glikozida proizlazi iz njihove enzimatske razgradnje, pri čemu nastaje cijanovodična kiselina (HCN). Iz 1 g prunazina može se osloboditi 91,5 mg HCN. Klinički simptomi akutne toksičnosti su ubrzano disanje, pad krvnog tlaka, ubrzani puls, glavobolja, vrtoglavica, povraćanje, proljev, plavo obojena koža zbog nedostatka kisika, konvulzije. Cijanovodična kiselina iz sjemenki plodova jarebrike, kada dosegne razinu 2-3 mg/L, može izazvati otkazivanje respiratornog sustava i smrt. Zbog toga je poželjno odvojiti sjemenke prilikom prerađivanja plodova jarebrike u prehrambene proizvode (Cressey i Reeve, 2019; Sarv i sur., 2020).

2.1.7. Obećavajuće dobrobiti za zdravlje i primjena u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji

Bioaktivne komponente bobičastog voća pokazuju brojne povoljne učinke na zdravlje čovjeka zahvaljujući svom antioksidativnom, antidijabetičkom, antihiperlipidemičnom, protuupalnom, antimikrobnom, antikancerogenom, antivirusnom, antifungalnom djelovanju kao i neuroprotektivnom, vazoprotektivnom kardioprotektivnom i hepatoprotektivnom djelovanju. Svoja antikancerogena svojstva pokazuju putem više komplementarnih i isprepletenih mehanizama, uključujući indukciju metaboličkih enzima, modulaciju genske ekspresije i utjecaja gena na staničnu proliferaciju, apoptozu i substanične signalne puteve (Nile i Park, 2014). Bioaktivne komponente jarebrike uključuju vitamin C i polifenole poput fenolnih kiselina, flavanola, flavonola i karotenoida (Gil-Izquierdo i Mellenthin, 2001). Oni su poznati kao prirodni antioksidansi, a zahvaljujući visokim razinama i kvantitativnoj raznolikosti, bobičasto voće, uključujući jarebiku, učestalo se naziva prirodnom funkcionalnom hranom (Szajdek i Borowska, 2008).

Zbog potencijalne dobrobiti za ljudsko zdravlje, u porastu je i trend korištenja ekstrakta bobičastog voća kao sastojka u funkcionalnoj hrani i dodacima prehrani, a koji se mogu kombinirati s drugim voćnim, povrtnim ili biljnim ekstraktima (Nile i Park, 2014). Dosadašnja istraživanja pokazuju da dodaci prehrani i hrana na bazi bobičastog voća pokazuju povoljan učinak na kognitivne funkcije, pamćenje, pažnju i perfuziju mozga u mirovanju (Bonyadi i sur., 2022). Ekstrakt plodova jarebrike obećavajući je izvor prirodnih sastojaka s antioksidativnim djelovanjem (Bobinaite i sur., 2020), zbog čega bi se mogao koristiti kao dodatak prehrani. Sjemenke jarebrike bogate su linolenskom, oleinskom i, u manjoj količini, palmitinskom

kiselinom (Johansson i sur., 1997), što upućuje na mogućnost korištenja istih u dodacima prehrani ili u kozmetičkoj industriji.

Mikrobiološka sigurnost hrane svjetski je zdravstveni problem u porastu. Također, otporne bolesti koje se prenose hranom jedan su od najvažnijih javnozdravstvenih problema povezanih s rizikom pojave bakterijskih sojeva otpornih na lijekove u prehrambenom lancu. Posljedično se javlja zahtjev za prirodnim konzervansima i antimikrobnim komponentama na biljnoj bazi. Bobičasto voće i komponente koje ono sadrži, poput fenolnih spojeva i organskih kiselina, mogu inhibirati rast bakterijskih patogena (Bobinaite i sur., 2020). Antimikrobna aktivnost jarebice pripisuje se sorbinskoj kiselini, organskoj kiselini s inhibitornim utjecajem na kvasce i plijesni, dok fenolni ekstrakt jarebice pokazuje bakteriostatski utjecaj na *Campylobacter jejuni* i *Staphylococcus aureus* (Kylli i sur., 2010), što ukazuje na mogućnost uporabe jarebice.

2.2. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE

2.2.1. Slobodni radikali i antioksidansi

Slobodni radikali definiraju se kao bilo koja neovisna molekula koja sadržava nespareni elektron u atomskoj orbitali. Prisutnost tog nesparenog elektrona rezultira zajedničkim karakteristikama svih slobodnih radikala, kao što je nestabilnost i visoka reaktivnost. Taj elektron radikali mogu donirati ili primiti drugi kako bi stvorili par (Lobo i sur., 2010). Navedena karakteristika razlog je zašto se mogu ponašati i kao oksidansi i kao reducensi. Najpoznatiji slobodni radikali i reaktivni spojevi koji se tako ponašaju (a koji se zajedno nazivaju reaktivnim vrstama kisika (ROS engl. *Reactive oxygen species*)), koji sudjeluju u razvoju mnogih bolesti, jesu: hidroksil radikal, superoksid radikal, lipidni radikali, peroksinitritni radikal, vodikov peroksid, singletni kisik, lipidni hidroperoksid, itd. Ove molekule sposobne su, u jezgri ili membrani stanice, uništiti biološki važan materijal poput DNK, proteina, ugljikohidrata i lipida, što dovodi do oštećenja stanice i narušavanja homeostaze (Lobo i sur., 2010). U konačnici to rezultira razvojem mnogih bolesti, poput tumora, kardiovaskularnih bolesti, astme, dijabetesa, gastrointestinalnih bolesti i drugih upalnih procesa.

Antioksidansi mogu smanjiti ili neutralizirati djelovanje slobodnih radikala kisika, odnosno imaju sposobnost suprotstavljanja oksidaciji ili mogu inhibirati reakcije potaknute djelovanjem

kisika ili peroksida. Zbog toga imaju važnu ulogu u očuvanju (kvalitete) života, ali i hrane, pa se koriste i kao aditivi, kako bi spriječili ili odgodili propadanje proizvoda djelovanjem kisika u zraku (Huang i sur., 2005; Yang i sur., 2018). Antioksidansi sudjeluju u prevenciji bolesti i stanja koje izazivaju slobodni radikali, zbog čega imaju pozitivan utjecaj na zdravlje (Soče, 2019).

2.2.2. Mehanizam djelovanja antioksidansa

Dva su moguća mehanizma djelovanja predložena za antioksidanse. Jedan se temelji na prekidanju lanca nastajanja slobodnih radikala, pri čemu primarni antioksidansi doniraju jedan elektron prisutnom slobodnom radikalu. Drugi mehanizam uključuje uklanjanje inicijatora reaktivnih vrsta kisika od strane sekundarnih antioksidansa što rezultira suzbijanjem lanca nastajanja slobodnih radikala. Antioksidansi mogu vršiti svoj učinak na biološki sustav različitim mehanizmima poput doniranja elektrona, kelacijom iona metalom, regulacijom ekspresije gena itd. (Lobo i sur., 2010).

2.2.3. Antioksidansi u hrani

Mnoge namirnice prirodno su bogate antioksidansima. U hrani ih možemo pronaći u obliku vitamina, minerala i drugih, nenutritivnih, bioaktivnih komponenti poput pigmenata, fenola i sl.

2.2.3.1 *Vitamini*

Vitamini su organski spojevi koji se nalaze u hrani u vrlo malim količinama (mg ili µg), ne sintetiziraju se u organizmu ili se ne sintetiziraju u dovoljnim količinama za zadovoljavanje fizioloških potreba što ih čini esencijalnim. Manjak određenog vitamina u organizmu izaziva opće ili karakteristične simptome manjka. Osim što su vitamini esencijalni za rast, razvoj, održavanje homeostaze i reprodukciju, određeni vitamini pokazuju antioksidativnu aktivnost čime pridonose zaštiti od upalnih procesa i unapređenju zdravlja. Vitamini koji pokazuju antioksidativnu aktivnost su vitamin A, vitamin C i vitamin E.

Vitamin C, drugog naziva askorbinska kiselina, je elektron donor, odnosno reducens. Sve poznate fiziološke i biokemijske uloge ovoga vitamina temeljene su na sposobnosti reduciranja drugih molekula (Padayatty i sur., 2003). Vitamin C topiv je u vodi, stoga njegova

antioksidativna aktivnost dolazi pomaže u prevenciji oštećenja tkiva, što je važno za prevenciju bolesti. U tankom crijevu, vitamin C štiti željezo od oksidacije i tako potiče njegovu apsorpciju.

Vitamin E obuhvaća nekoliko izoformi tokoferola, koji se označavaju slovima grčkog alfabeta: α , β , γ i δ . Najrašireniji i s najvećom biološkom aktivnosti je α -tokoferol. Vitamin E je najvažniji lipofilni antioksidans u stanici. Štiti stanične lipide i druge osjetljive komponente stanica i njihove membrane od slobodnih radikala, a posebno je važan u sprječavanju oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina. Djeluje sinergistički sa selenom.

2.2.3.2. Minerali

Minerali se u tijelu i hrani uglavnom javljaju u obliku soli, odnosno iona ili kao komponenta organskih spojeva. Oni su, kao i vitamini, esencijalni mikronutrijenti te sudjeluju u rastu, razvoju i reprodukciji. Neki od njih također pokazuju antioksidativnu aktivnost, poput cinka, bakra, željeza, mangana i selen. Cink, bakar i mangan komponente su superoksid dismutaze, a željezo dio katalaze. Superoksid dismutaza i katalaza važni su endogeni enzimi visoke antioksidativne aktivnosti. S druge strane, selen može samostalno djelovati kao antioksidans ili kao komponenta selenoproteina (Griffiths i sur., 2016).

Selen u obliku selenocisteina, 21. aminokiseline, tvori brojne selenoproteine, od kojih neki imaju važne enzimske funkcije. Svi ti enzimi ovisni su o selenu, s obzirom na to da se selenocistein najčešće nalazi u aktivnom dijelu enzima, a selen u njemu djeluje kao redoks centar. On, primjerice, reducira vodikov peroksid te time smanjuje mogućnost nastanka lipidnih i fosfolipidnih hidroperoksida, a razlaže ih na bezopasne produkte - alkohol i vodu. Antioksidativna aktivnost selen pomaže u održavanju integriteta membrane stanice, odnosno smanjuje mogućnost oksidativnog oštećenja biomolekula poput lipida, lipoproteina i DNK (Rayman, 2002).

2.2.3.3. Fenoli

Fenoli su organski spojevi koji se sastoje od hidroksilne skupine (-OH) izravno vezane na aromatski ugljikovodik. Najjednostavniji takav spoj je fenol, a mogu formirati brojne molekule, od jednostavnih fenola do visoko polimeriziranih spojeva. Prirodno se nalaze u biljkama kao njihovi sekundarni metaboliti koji imaju ulogu u obrambenom mehanizmu, štiteći ih od ultraljubičastog zračenja, patogenih mikroorganizama, parazita i predatora (Dai i Mumper, 2010). Njihov sadržaj u biljkama ovisi o vrsti, uzgoju, stupnju zrelosti, okolišu i uvjetima prerade i skladištenja (Kovačec, 2020). Zahvaljujući svom velikom antioksidativnom

potencijalu, predmet su brojnih istraživanja u posljednja dva desetljeća. Prema svojoj kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi uključuju antocijane i antoksantine, a neflavonoidi fenolne kiseline i ostale spojeve. Fenoli, osim što imaju antioksidativnu aktivnost, sudjeluju u sprječavanju agregacije trombocita, kontroli koncentracije steroidnih hormona i endokrinog metabolizma, utječu na promjene u metabolizmu kolesterola, reduciraju krvni tlak i imaju antibakterijsko i antivirusno djelovanje (Mihalić, 2013).

2.3. ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL JAREBIKE

Bobičasto voće pokazuje značajne dobrobiti za zdravlje ponajprije zahvaljujući visokim razinama polifenola, antioksidansa, vitamina, minerala i prehrambenih vlakana. Brojne fitokemikalije te vitamini C i E, zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima, štite tijelo od negativnih utjecaja slobodnih radikala poput kroničnih bolesti povezanih sa starenjem, ali i drugih bolesti i poremećaja (Nile i Won, 2014). Sadržaj fenolnih komponenti u bobičastom voću određen je brojnim čimbenicima, poput vrste i varijeteta, regije, vremenskih uvjeta, zrelosti ploda, vremenu branja i vremenu i uvjetima skladištenja (Szajdek i Borowska, 2008). Primjerice, skandinavsko istraživanje (Häkkinen i Törrönen, 2000; Kähkönen i sur., 2001) pokazalo je veće količine polifenola u plodovima bobičastog voća koje raste u hladnoj, sjevernoj klimi s kratkom sezonom vegetacije bez upotrebe pesticida, u odnosu na iste varijetete koji rastu u blagoj klimi.

Kultivari i hibridi jarebike pokazuju visok antioksidacijski kapacitet povezan sa sadržajem fenola. Izgleda kako su flavonoidi, kao grupa fenolnih spojeva, od ključne važnosti za antioksidacijski potencijal jarebike (Mlček i sur., 2014). Njihova antioksidativna aktivnost utječe na reaktivne kisikove vrste poput hidroksidnih i peroksidnih radikala i na lipidnu peroksidaciju (Gil-Izquierdo i Mellenthin, 2001). Iz plodova jarebike izolirani su kvercentin, izokvercentin, hiperin, rutin, katehin, epikatehin i klorogenska kiselina (Aldedunye i Matthäus, 2014). Plodovi jarebike također sadržavaju karotenoide, vitamin E i vitamin C koji pridonose antioksidacijskom djelovanju. Razine karotenoida u slatkoj jarebici jednako su visoke kao one u mrkvi, a razine vitamina C slične su razinama istog vitamina u jagodama (Kampuss i sur., 2009). Jarebika se može smatrati i bogatim izvorom 3-kafeoilkvinične kiseline koja ublažava djelovanje oksidativnog stresa u različitim modelima bolesti i ima neuroprotektivno, kardioprotektivno, antihiperlipidemično, protuupalno, antidijabetičko, antiviralno, antifungalno i hepatoprotektivno djelovanje (Zymone i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za potrebe ovog istraživanja, plodovi jarebike ubrani su na području Velebita na šest različitih lokacija (Duliba, Jelovac, Mali Alan, Senjsko Bilo, Stolac, Velebit) i Gorskog kotara na šest različitih lokacija (Crni Lug, Jasenak, Mala Javornica, Miškovića, Mrzla Vodica, Veliki Risnjak) (Slika 3).



Slika 3. Prikaz geolokacije uzorkovanja plodova jarebike (vlastita fotografija).

Sakupljena su 63 uzorka koji su, nakon branja, dopremljeni u Laboratorij, ručno očišćeni od grančica, peteljki i ostalih fizičkih nečistoća. Pakirani su u plastične vrećice te odgovarajuće označeni s obzirom na lokalitet i broj uzorka, kako je prikazano u *Prilogu 1* (Tablica 20). Zamrznuti su i skladišteni na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiza, kako bi se spriječio, odnosno smanjio gubitak nutritivnih tvari i bioaktivnih komponenta koje će se određivati.

Kemikalije, reagensi i standardi

- destilirana voda
- ultra-čista voda, specifične vodljivosti: $0,555 \mu\text{S}/\text{cm}$ (pri 25°C ; $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$)
- standardne otopine pripravljene iz 1000 mg/L ICP multi-element standard solution IV (Merck, Njemačka)
- dušična kiselina (HNO_3 , konc. 65 %, p.a., Merck, Njemačka)
- klorovodična kiselina, 20 %-tna (HCl , $\rho = 1,10 \text{ g}/\text{cm}^3$, p.a.); $c = 0,1 \text{ mol}/\text{L}$
- klorovodična kiselina, 2 %-tna (HCl) (u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 5,4 mL 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom do oznake)
- sumporna kiselina, 95 %-tna (H_2SO_4)
- borna kiselina, 4 %-tna (H_3BO_3)
- otapalo za ekstrakciju ($\text{MeOH}/2\% \text{ HCl}$) (u odmjernu tikvicu od 200 mL otpipetira se 10 mL 2 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni metanolom do oznake)
- zasićena otopina neutralnog olovnog acetata ($443 \text{ g } \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O} / \text{L } \text{H}_2\text{O}$)
- natrijev oksalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, $M = 134,01 \text{ g}/\text{mol}$, p.a.)
- natrijev hidroksid, 30 %-tni; 40 %-tni (NaOH)
- vodikov peroksid, 30 %-tni (H_2O_2)
- etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 96% p.a.)
- metanol (CH_3OH)
- fenolftalein
- Fehlingova I otopina i Fehlingova II otopina
- Kjeldahlove tablete
- medicinski benzin
- Folin-Ciocalteu reagens; na dan analize 1 mL reagensa razrijedi se s 2 mL destilirane vode.
- zasićena otopina natrijeva karbonata (Na_2CO_3 , $\gamma = 200 \text{ mg}/\text{mL}$); 10 g anhidrida natrijevog karbonata otopi se u 40 mL vruće destilirane vode, u odmjernoj tikvicu od 50 mL, ohladi na sobnu temperaturu i nadopuni destiliranom vodom do oznake volumena.
- stock otopina galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ mg}/\text{mL}$) (250 mg galne kiseline otopi se u odmjernoj tikvicu od 50 mL u metanolu)
- otopina DPPH ($c = 0,5 \text{ M}$) (na dan analize otopi se 0,02 g DPPH radikala u metanolu u odmjernoj tikvicu od 100 mL)

- stock otopina Troloxa ($c = 0,02 \text{ M}$) (0,5 g Troloxa otopi se u metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL)
- otopina klorovodične kiseline (HCl, $c = 40 \text{ mM}$) (330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopuni destiliranom vodom do oznake volumena)
- acetatni pufer ($c = 0,3 \text{ M}$, $\text{pH}=3,6$) (0,155 g natrijevog acetata trihidrata otopi se u 0,8 mL ledene octene kiseline u odmjernoj tikvici od 50 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake volumena)
- otopina željezovog(III)-klorida (FeCl_3 , $c = 20 \text{ mM}$) (0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ otopi se u 10 mL destilirane vode)
- otopina TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin, $c = 10 \text{ mM}$) (u odmjernoj tikvici od 10 mL odvaže se 0,0312 g TPTZ-a i nadopuni do oznake volumena 40 mM klorovodičnom kiselinom pa ostavi u vodenoj kupelji na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ dok se TPTZ u potpunosti ne otopi)
- otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($c = 20 \text{ mM}$) (u odmjernoj tikvici od 100 mL odvaže se 0,55604 g željezovog sulfata i nadopuni destiliranom vodom do oznake)
- FRAP reagens (pomiješa se 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL željezovog(III)-klorida neposredno prije uporabe, a između analiza čuva se u vodenoj kupelji na $37 \text{ }^\circ\text{C}$)

Uređaji

- spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- uređaj za masenu spektrometriju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS, 7500cx, Agilent Technologies, Njemačka)
- uređaj za mikrovalnu razgradnju (UltraCLAVE, Milestone S.r.l., Italija)
- uređaj za ultra-čistu vodu (BarnsteadTMSmart2Pure 6 UV/UF, Thermo Scientific, Njemačka)
- kvarcni sustav za pročišćavanje kiseline (SubPUR, Milestone S.r.l., Italija)
- uređaj za liofilizaciju (HETOSIC, Heto, Danska)
- kuglični mlin (MM 400, Retsch, Njemačka)
- analitičke vage (New Classic MS303S, Mettler Toledo AG, Švicarska; AX 200, Shimadzu, Kyoto, Japan; 2615, Tehtnica, Železniki, Slovenija) i tehnička vaga (1111, Tehtnica, Železniki, Slovenija)

- mješalice (Vortex Genius 3, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Njemačka; VV3, VWR. Radnor, Pensilvanija, SAD)
- zračna sušnica (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- mufolna peć za karboniziranje (KR-170, W.C. Heraeus GmbH, Hanau, Njemačka)
- Kjeltec sustav (Foss Kjeltec 8100 Distillation Unit)
- blok za spaljivanje
- Soxhletova aparatura (INKO tip SK6 ESS, Zagreb, Hrvatska)
- vodena (iTRON 16, Zagreb, Hrvatska) i pješčana kupelj

Pribor

- stakleno posuđe: odmjerne tikvice (10, 50, 100, 200 mL), Erlenmeyerove tikvice (50, 100, 300 mL), laboratorijske čaše (100, 250 mL), kiveta (500 mL), menzura, bireta, epruvete s gumenim čepovima, odsisna boca, sisaljka na vodeni mlaz, Büchnerov lijevak, stakleni lijevak, stakleni štapić, satno stakalce, eksikator
- kvarcne kivete s čepovima rabljene tijekom razaranja uzoraka (12 mL, Milestone)
- aluminijska posudica s poklopcem
- porculanske zdjelice i porculanski filter (poroznosti B4-1P1)
- plastični pribor: polipropilenske (PP) posudice s poklopcem na navoj (5, 100 mL, Sarstedt; 15 ml Kartell); polietilenske (PE) posudice s poklopcem (25 mL, Kartell), nastavci za pipete, plastične žličice, stalci za epruvete
- kuglice: keramičke (2,8 mm; Omni International, SAD) i staklene
- Eppendorf pipete s nastavcima (200, 300, 1000 μ L; 5 mL) (Eppendorf), pipete (2, 5, 10, 25, 50 mL), trbušasta pipeta (25 mL), propipete
- sitno zrnast kvarcni pijesak
- laboratorijska špatula, pinceta, azbestna mrežica
- plamenik
- filter papir, aluminijska folija, papirnata čahura, vata

3.2. METODE

Analiza osnovnog kemijskog sastava provedena je na ukupno 63 uzorka, analiza ukupnih fenola, odnosno antioksidacijske aktivnosti spektrofotometrijskim metodama DPPH i FRAP na 49 uzorka, a multielementna analiza na 28 uzoraka. Za pojedine analize broj uzoraka je smanjen zbog nedostatne količine svježe ubranih plodova (*Prilog 1*). Za potrebe određivanja osnovnog kemijskog sastava, ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakta jarebice, plodovi su usitnjeni u električnoj sjeckalici (Philips, ProMix (Viva Collection) HR2655/90) i pohranjeni u plastične, sterilne spremnike s čepovima na navoj, koje su označene lokalitetom i brojem uzorka te skladištene na -20 °C do provođenja analiza. Mase usitnjenih uzoraka razlikovale su se zbog neujednačene količine ubranih plodova na pojedinim lokalitetima. Uzorci jarebice odmrznuti su i homogenizirani neposredno prije određivanja osnovnog kemijskog sastava. Za određivanje antioksidativnog kapaciteta, uzorci su ekstrahirani metanolom, a ekstrakt se koristio za određivanje sadržaja ukupnih fenola i ekvivalenata određenih spojeva s visokom antioksidativnom aktivnošću. Dio svježih uzoraka pripremljen je prema protokolu za multielementnu analizu.

3.2.1. Priprema uzoraka za analizu

3.2.1.1. Ekstrakcija uzoraka za određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Odvagano je 6,000 g homogeniziranog uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL. Menzурom je dodano 20 mL otapala za ekstrakciju. Otopina je, u Erlenmeyerovoj tikvici pokrivenoj aluminijskom folijom, stajala 60 minuta na magnetskoj mješalici, a svakih 15 minuta aluminijska folija je skinuta kako bi se izjednačili tlakovi. Otopina je filtrirana pod vakuumom. Dobiveni ekstrakt preliven je u odmjernu tikvicu od 50 mL, a ostatak ekstrakta u vakuum boci ispran je s nekoliko mL otapala za ekstrakciju. Tikvica je nadopunjena do oznake otapalom za ekstrakciju. Ekstrakt je između analiza čuvan na + 4 °C u staklenim bočicama.

3.2.1.2. Priprema uzoraka za multielementnu analizu metodom ICP-MS

Svježe, cijele bobice jarebice isprane su u ultra-čistoj vodi, posušene staničevinom i očišćene od peteljki. Uzorak je stavljen u posudicu na navoj, svježa masa (ca. 10 g) izvagana na analitičkoj vagi te pohranjen na -20 °C do postupka liofilizacije (sušenja materijala sublimacijom leda u visokom vakuumu). Zamrznuti uzorci liofilizirani su tijekom 48 h pri

temperaturi -50 °C u uređaju HETOSIC i određena je vrijednost suhe mase. Nakon liofilizacije, uzorci su homogenizirani u kugličnom mlinu pomoću keramičkih kuglica u posudicama za pohranu uzoraka s poklopcem u dva navrata tijekom 4 minute pri frekvenciji vibriranja od 29,5 Hz. Uzorci su u replikatima pripremljeni za razgradnju u mikrovalnom visokotlačnom reaktoru UltraCLAVE IV. Odvagama homogenata (ca. 0,240 g) dodano je 2 mL koncentrirane dušične kiseline (HNO₃) pročišćene u sustavu i 2 mL ultra-čiste vode. Za ovu svrhu korištene su kvarcne kivete s teflonskim čepovima. Uzorci su ostavljeni u digestoru tijekom 24 h do postupka mikrovalne razgradnje (uvjeti razgradnje prikazani su u *Prilogu 2*). Nakon razgradnje, kivete s uzorcima ohlađene su na sobnoj temperaturi, uzorci nadopunjeni ultra-čistom vodom do odvage od 6 g i kvantitativno preneseni u posudice s poklopcem na navoj, promiješani i čuvani na 4 °C do multielementne analize.

3.2.2. Određivanje udjela vode

Voda je prisutna u svim namirnicama te utječe na njihova kemijska, fizikalna i nutritivna svojstva. Ona je važan čimbenik u određivanju kvalitete i sigurnosti hrane. Udio vode u namirnicama može se odrediti fizikalnim i kemijskim postupcima. Fizikalne metode dijele se na indirektna (određivanje vode sušenjem, određivanje vode/suhe tvari refraktometrom, određivanje vode na principu električne vodljivosti i određivanje vode na principu dielektrične konstante) i direktna metode (određivanje vode azeotropnom destilacijom). Najčešće se, pa tako i u ovom radu, koristi postupak sušenja. Ovisno o vrsti namirnice preporučuju se i određeni postupci pred sušenje. Kod bobičastog voća, kao što su plodovi jarebice, pogodno je sušiti uzorak prethodno pomiješan s kvarcnim pijeskom koji pospješuje sami proces (Nielsen, 2017; Vahčić i sur., 2008).

Princip metode: Uzorak namirnice poznate mase suši se u zračnoj sušnici na određenoj temperaturi (105 °C) onoliko vremena koliko je potrebno da se uzastopnim mjerenjem osušenog uzorka dobije konstantna masa. Gubitak mase izražava se kao udio vode u namirnici (Vahčić i sur., 2008).

Postupak metode: Prije sušenja uzoraka potrebno je sušiti aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom 30 minuta na temperaturi od 105 °C u zračnoj sušnici. Posudice se potom hlade u eksikatoru, označavaju i važu. U aluminijske posudice odvažuje se 2 g pripremljenog uzorka. Pomoću staklenog štapića uzorak se homogenizira s kvarcnim pijeskom. Nepokrivene posudice s uzorkom i poklopci suše se u zračnoj sušnici 4 sata pri 105 °C. Po završetku sušenja, posudice

se poklapaju i hlade u eksikatoru. Posudice s uzorkom važu se čim se ohlade na sobnu temperaturu.

Račun

$$\% \text{ vode} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100 \quad [1]$$

pri čemu je:

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.3. Određivanje udjela mineralnog ostatka

Namirnice biljnog, kao i životinjskog podrijetla, sadrže određene mineralne tvari u manjem ili većem udjelu. Ukupni udio mineralnog ostatka određuje se kao udio pepela u uzorku što predstavlja anorganski dio namirnice. Određivanje mineralnog ostatka važan je korak u analizi prehrambenih proizvoda jer se dobiveni pepeo koristi za određivanje udjela pojedinih mineralnih tvari što govori o kvaliteti i ispravnosti namirnice ili prehrambenog proizvoda. Za određivanje udjela mineralnog ostatka korištena je metoda spaljivanja u mufolnoj peći. Prilikom spaljivanja, voda i hlapljive tvari isparavaju, a organske tvari izgaraju. Preostala masa nakon spaljivanja predstavlja anorganski dio, odnosno mineralni ostatak (Nielsen, 2017; Vahčić i sur., 2008).

Princip metode: Pripremljeni uzorak karbonizira se spaljivanjem na plameniku te takav mineralizira u mufolnoj peći pri određenoj temperaturi onoliko vremena koliko je potrebno dok se ne postigne jednolično svijetli sivi pepeo, odnosno pepeo konstantne mase (Nielsen, 2017; Vahčić i sur., 2008).

Postupak metode: Prije spaljivanja uzorka potrebno je žariti porculanske zdjelice te ih ohladiti na sobnu temperaturu. Potom se zdjelice važu i označavaju nakon čega se odvagne 3 g uzorka. Uzorak u zdjelici zagrijava se na plameniku dok potpuno ne pougljeni, a zatim stavi u mufolnu

peć zagrijanu na temperaturi od oko 550 °C. Uzorak se ostavlja u peći dok se ne postigne jednolična svijetlo siva boja. Ako je sadržaj u zdjelici tamne boje može se navlažiti malom količinom destilirane vode kako bi se otopile soli. Uzorak se osuši u sušnici i nastavi se proces spaljivanja (mineralizacije). Po završetku spaljivanja, porculanska zdjelica s pepelom prebacuje se na hlađenje u eksikator i važe čim postigne sobnu temperaturu.

Račun

$$\% \text{ pepela} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} * 100 \quad [2]$$

pri čemu je:

m_1 – masa prazne porculanske zdjelice (g);

m_2 – masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g);

m_3 – masa porculanske zdjelice i pepela (g).

3.2.4. Određivanje udjela reducirajućih šećera

Ugljikohidrati su skupina prirodnih tvari koji se nalaze u biljnim i životinjskim namirnicama. S obzirom na njihovu strukturu i broj atoma dijelimo ih na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Monosaharidi su najjednostavniji spojevi, oligosaharidi se mogu hidrolizirati u dvije molekule monosaharida, dok se polisaharidi hidroliziraju u više molekula monosaharida. Karakteristično svojstvo ugljikohidrata je sposobnost redukcije metala iz alkalnih otopina njihovih soli što je rezultat prisustva slobodne aldehidne ili ketonske skupine. Fehlingova otopina (alkalna otopina bakrova (II) sulfata pentahidrata i kalijeva natrijeva tartarata tetrahidrata) koristi se kao reagens za određivanje ugljikohidrata na temelju spomenute sposobnosti. Monosaharidi mogu izravno reducirati Fehlingovu otopinu pri čemu nastaje talog, bakrov (I) oksid, koji se određuje gravimetrijski ili titracijski. Oni se nazivaju izravno reducirajućim šećerima. Nereducirajući šećeri moraju se prvo invertirati, tj. hidrolizirati

(djelovanjem kiseline ili enzima) na monosaharide kako bi se mogli odrediti uz pomoć Fehlingove otopine (Vahčić i sur., 2008).

Princip metode: Izravno reducirajući šećeri (prirodni invert), odnosno glukoza i fruktoza, određuju se na osnovu njihovih reducirajućih svojstava. Ovi monosaharidi, pri određenim uvjetima, reduciraju bakrov sulfat (CuSO_4), odnosno Fehlingovu otopinu, u bakrov (I) oksid (Cu_2O) koji se odvaja te se može odrediti gravimetrijski (vaganjem) ili titracijski, nakon čega se iz empirijskih tablica očitaju pripadajući udjeli šećera (Vahčić i sur., 2008).

Postupak metode: U laboratorijsku čašu od 250 mL, na tehničkoj vagi, odvaži se 10 g pripremljenog uzorka, razrijedi sa 100 mL destilirane vode te zagrijava na plameniku uz povremeno miješanje staklenim štapićem do trenutka kada tekućina postane homogena. Uzorak se kvantitativno, preko staklenog štapića, prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL i ohladi. U tikvicu se doda otopina neutralnog olovog acetata u suvišku (oko 2 mL), sadržaj se promiješa i nadopuni do oznake volumena destiliranom vodom. Sadržaj u tikvici filtrira se u drugu odmjernu tikvicu pri čemu se prvih nekoliko mililitara filtrata odbacuje. Potom se u tikvicu doda osušeni kalij oksalat kako bi se istaložio višak olova koji je korištenog u procesu bistrenja. Sadržaj u tikvici se promiješa i ponovno filtrira pri čemu se još jednom odbaci prvih nekoliko mililitara filtrata. Od dobivenog filtrata, 25 mL se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te mu se doda 10 mL 20 %-tne klorovodične kiseline i 20 mL destilirane vode. Tikvica se prebaci u vodenu kupelj na temperaturu od 60 °C na 10 minuta, pri čemu se tijekom prve 3 minute sadržaj tikvica mućka u kupelji. Po završetku hidrolize, tikvice se hlade pod mlazom hladne vode. Sadržaj se neutralizira otopinom natrijeva hidroksida (30%-tnom) uz dodatak indikatora, nakon čega se dopuni do oznake volumena. U Erlenmeyerovu tikvicu doda se 25 mL Fehlingove I i 25 mL Fehlingove II otopine, 25 mL neutraliziranog filtrata i 25 mL vode. Tikvica se, pokrivena satnim stakalcem zagrijava na plameniku preko azbestne mrežice tako da sadržaj zavrije u vremenu od 4 minute i vrije točno 2 minute. Vrući sadržaj tikvice kvantitativno se filtrira kroz porculanski filter koji je poznate poroznosti, prethodno osušen, ohlađen, izvagan i označen. Filtracija se odvija pomoću odsisne boce i sisaljke uz vodeni mlaz. Talog se, u porculanskome filteru, suši u zračnoj sušnici, 30 minuta pri temperaturi od 100 °C, hladi u eksikatoru i važe. Iz Hammondovih tablica očitava se udio invertnog šećera ekvivalentan izvaganoj masi taloga (Cu_2O).

Račun

$$\% \text{ šećera} = \frac{a * 100}{b * 1000} \quad [3]$$

pri čemu je:

a – očitani udio šećera iz Hammondovih tablica (mg);

b – masa uzorka u alikvotnom dijelu filtrata uzetom u konačni postupak (g).

3.2.5. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahlu

Proteini čine važnu skupinu strukturno vrlo složenih spojeva. Njihov udio može se odrediti brojnim metodama, a zahvaljujući složenosti strukture, nerijetko su one indirektne zbog čega se njihovim korištenjem određuje udio dušika u uzorku, iz čega se računa udio proteina. Najpoznatiji takav postupak određivanja naziva se Kjeldahlovom metodom. Ona određuje ukupni dušik prisutan u -NH (amino) skupinama u hrani, primjerice proteinski dušik, amino ili amido dušik. Udio proteina računa se množenjem dobivenog postotka dušika s faktorom pretvorbe F koji je karakterističan za određene namirnice ili njihove skupine (Vahčić i sur., 2008).

Princip metode: Organske tvari iz uzorka razaraju se zagrijavanjem sa sumpornom kiselinom uz dodatak Kjeldahlovih tableta ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, K_2SO_4) koje djeluju kao katalizator i povisuju vrelište sumporne kiseline što pospješuje oslobađanje (ne)proteinskog dušika koji zaostaje u obliku amonijevog sulfata. Dodatkom natrijeva hidroksida oslobađa se amonijak koji se predestilira u odmjereni volumen borne kiseline poznate koncentracije. Nastaje amonijev borat koji se titirira klorovodičnom kiselinom (Vahčić i sur., 2008).

Postupak metode: Odvaže se 5 g pripremljenog uzorka na lađici od aluminijske folije. Uzorak se prebaci s folije u kivetu velikom pincetom na način da grlo kivete ostane čisto. U kivetu se doda oko 10 mL sumporne kiseline, 2 Kjeldahlove tablete i 5 mL vodikovog peroksida (30%) nakon čega se kiveta protrese kako bi se sadržaj promiješao. Kivete se postave u blok za spaljivanje u digestoru i lagano zagrijavaju dok se reakcija u kiveti na smiri, nakon čega slijedi zagrijavanje na većoj temperaturi. Reakcija spaljivanja je gotova kada u kivetama ostane bistra zeleno-plava tekućina bez neizgorenih crnih čestica. Kivete se ohlade na sobnu temperaturu,

nakon čega se provodi destilacija u Kjeltec sustavu. Prije provođenja destilacije, u Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira se 25 mL borne kiseline te se postavlja na postolje desilacijske jedinice, dok se kivetu postavlja na postolje za kivetu. Destilacija se odvija na postavljenom programu koji dodaje 80 mL vode i 50 mL lužine. Po završetku procesa, sadržaj u tikvici titrira se klorovodičnom kiselinom (0,1 M) do pojave ružičaste boje. Utrošeni volumen kiseline za titraciju koristi se u izračunu udjela ukupnog dušika u uzorku.

Račun

$$\% \text{ ukupnog dušika (N)} = \frac{(T - B) * N * 14,007 * 100}{m} \quad [4]$$

$$\% \text{ proteina} = \% N * F \quad [5]$$

pri čemu je:

T – volumen HCl utrošenog za titraciju uzorka (mL);

B – volumen HCl utrošenog za titraciju slijepa probe (mL);

N – molalitet kiseline;

m – masa uzorka (mg);

F – faktor za preračunavanje % dušika u proteine (6,25).

3.2.6. Određivanje udjela masti metodom po Soxhletu

Pojam *masti* odnosi se na skupinu spojeva koji su slabo topljivi u vodi, ali pokazuju topljivost u brojnim organskim otapalima. Udio masti najčešće se određuje ekstrakcijom organskim otapalom ili instrumentalnim metodama koje se temelje na fizikalnim i kemijskim svojstvima masti (npr. gustoća). Izbor metode ovisi o brojnim faktorima poput prirode uzorka (suhi ili vlažni uzorak), svrha analize, dostupnost uređaja i slično (Nielsen i Carpenter, 2017). U ovom radu masti se određuju ekstrakcijom metodom po Soxhletu.

Princip metode: Masti se višekratno ekstrahiraju u organskom otapalu koje se zagrijava. Otapalo hlapi i kondenzira se iznad uzorka, odnosno kapa na uzorak i potapa ga kako bi se ekstrahirale masti. Proces se ponavlja u intervalima 15-20 min. Sadržaj masti izražava se kao gubitak na masi uzorka prije i nakon ekstrakcije (Nielsen i Carpenter, 2017).

Postupak metode: Odvaž se oko 15 g uzorka u prethodno označene porculanske zdjelice. Uzorci se suše u zračnoj sušnici 1 sat na temperaturi od 105 °C kako bi se smanjio udio vode. Osušeni i ohlađeni uzorci špatulom se prebacuju u izvagane i označene papirnate čahure koje su pokrivene s odmašćenom suhom vatom nakon čega se važu s uzorkom. Čahura se postavi u srednji dio Soxhletove aparature (ekstraktor), koji je spojen s hladilom i tikvicom. Tikvica se prije spajanja na aparaturu suši s nekoliko staklenih kuglica te se ohlađena izvaže i označi. Kroz hladilo se, uz pomoć lijevka, dodaje toliko otapala (medicinski benzin) da se ekstraktor napuni i kapilarnom cjevčicom isprazni u tikvicu. Zatim se doda još toliko otapala da ispuni pola volumena ekstraktora. Ukupni volumen otapala ne smije prelaziti $\frac{3}{4}$ volumena tikvice. Kroz hladilo se pusti mlaz vode i započinje zagrijavanje u pješčanoj kupelji. Ekstrakcija traje oko 5 sati, a prekida se u trenutku kada se otapalo prelije iz ekstraktora u tikvicu. Aparatura se rastavi, a tikvice s uzorkom suše se na temperaturi od 100 °C do konstantne mase (1,5-2 sata). Tikvice se hlade u eksikatoru i važu na analitičkoj vagi.

Račun

$$\% \text{ masti} = \frac{b - a}{m} * 100 \quad [6]$$

pri čemu je:

a – masa prazne tikvice (g);

b – masa tikvice i ekstrahirane mase (g);

m – masa uzorka (g).

3.2.7. Određivanje ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je spektrofotometrijski u razrijeđenom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 750 nm.

Princip metode: Metoda se temelji na bojenoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline). Pri oksidaciji fenolnih spojeva iz uzorka, ove kiseline reduciraju se u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Nastali intenzitet obojenja proporcionalan je broju hidroksilnih ili oksidirajućih skupina fenolnih spojeva u uzorku, a mjeri se pri valnoj duljini 765 nm.

Postupak metode: Prije određivanja udjela ukupnih fenola uzorke je potrebno razrijediti otapalom za ekstrakciju. U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetiran je 1 mL ekstrakta, a tikvica je nadopunjena otapalom do oznake volumena.

U epruvetu je otpipetirano 40 μL razrijeđenog ekstrakta, 3160 μL destilirane vode i 200 μL otopine Folin – Ciocalteau reagensa. Sadržaj epruvete promiješan je na vortex tresilici i ostavljen 3 minute na sobnoj temperaturi. Dodano je 600 μL zasićene otopine natrijevog karbonata nakon čega je sadržaj promiješan na vortex tresilici. Epruvete su inkubirane u vodenoj kupelji na temperaturi od 40°C, 30 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija na spektrofotometru na 765 nm.

Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta dodana jednaka količina otapala za ekstrakciju.

Račun

Za određivanje udjela ukupnih fenola potrebno je izraditi baždarni dijagram. Kao standardna otopina, korištena je stock otopina galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ mg/mL}$) od koje su napravljena razrjeđenja, u koncentracijama 0, 25, 50, 100, 200 i 500 mg/L. U epruvete je otpipetirano 40 μL svake od standardnih otopina galne kiseline nakon čega je praćen postupak za određivanje ukupnih fenola. Na temelju izmjerenih apsorbancija, izrađen je baždarni dijagram prikazan na Slika 4. Iz dijagrama je dobivena jednadžba pravca prema kojoj se računa koncentracija ukupnih fenola. U ovom slučaju jednadžba pravca glasi:

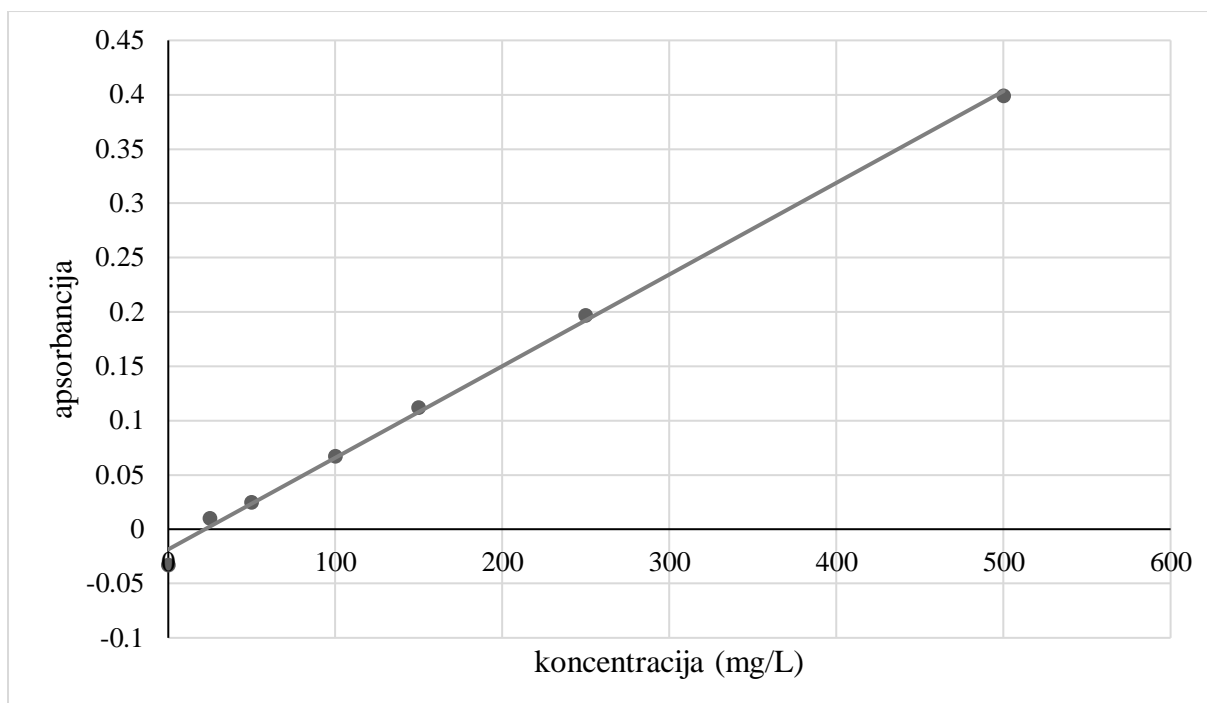
$$y = 0,0008x - 0,0186 \quad [7]$$

$$R^2 = 0,9975 \quad [8]$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm;

x – koncentracija galne kiseline (mg/mL).



Slika 4. Baždarni dijagram galne kiseline za određivanje ukupnih fenola.

Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline na kg jestivog dijela uzorka (mg GAE/kg).

3.2.8. DPPH metoda

Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti mogu se podijeliti u tri kategorije: spektrometrijske, elektrokemijske i kromatografske metode. DPPH je spektrometrijska metoda koja uključuje reakciju antioksidansa prisutnog u uzorku s organskim radikalom iz standardne otopine. Metoda procjenjuje antioksidativnu aktivnost spojeva prisutnih u ekstraktima ili drugim biološkim izvorima (Pregiban, 2017).

Princip metode: Metoda se temelji na korištenju stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Zbog svog nesporenog elektrona, apsorpcijski maksimum postiže u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Sparivanje nesporenog elektrona DPPH radikala s atomom vodika iz antioksidativnog spoja rezultira promjenom boje u žutu, pri čemu nastaje reducirani oblik DPPH-H (Slika 5). Promjena boje u stehiometrijskom je odnosu s brojem sparenih elektrona, odnosno količinom antioksidansa. Antioksidacijska aktivnost danas se najčešće opisuje TEAC vrijednošću (eng. *Trolox equivalent antioxidant activity*) koja je definira kao koncentracija otopine izražene u mmol/L u vodi topljivog analoga vitamina E, Troloxa (6-

hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina), ekvivalentne antioksidacijske aktivnosti kao i otopina ispitivanog fenolnog spoja koncentracije 1 mmol/L.



Slika 5. Reakcija redukcije DPPH radikala (prema Amić i sur., 2003)

Postupak metode: Prije određivanja antioksidacijske aktivnost uzorke je potrebno razrijediti otapalom za ekstrakciju. U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetirano je 0,1 mL ekstrakta, a tikvica je nadopunjena otapalom do oznake volumena.

U epruvetu je otpipetirano 2 mL razrijeđenog ekstrakta, 2 mL metanola i 1 mL 0,5 mM otopine DPPH. U drugu je epruvetu otpipetirano 4 mL metanola i 1 mL 0,5 mM otopine DPPH, što predstavlja kontrolni uzorak. Epruvete su ostavljene 20 minuta, u mraku, na sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 517 nm uz metanol kao slijepu probu.

Račun

Kako bi se odredila antioksidativna aktivnost, potrebno je pripremiti baždarni dijagram. Kao standardna otopina, korištena je stock otopina Troloxa od koje su pripremljena razrjeđenja u koncentracijama 0, 25, 50, 100 i 200 μM . U epruvete je otpipetirano 200 μL razrijeđene otopine Troloxa nakon čega je praćen postupak za DPPH metodu. Na temelju izmjerenih apsorbancija, izrađen je baždarni dijagram, prikazan na Slika 6. Tako se dobije jednadžba pravca prema kojoj se računa TEAC vrijednost, a u ovom slučaju glasi:

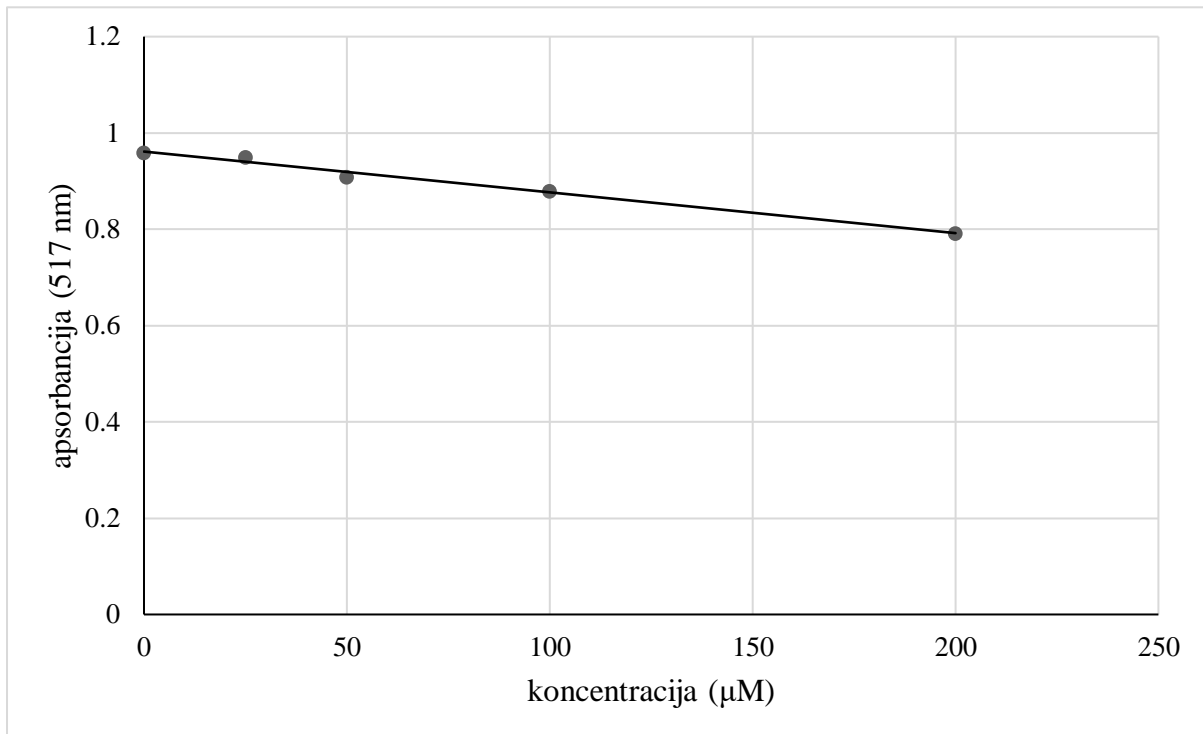
$$y = -0,0008x + 0,9613 \quad [9]$$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 517 nm;

x – koncentracija u vodi topljivog analoga vitamina D, Troloxa (μM);

a koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9886.



Slika 6. Baždarni dijagram otopine Troloxa

Antioksidacijska aktivnost računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$S = 100 - \left(\frac{A_1}{A_0} * 100 \right) \quad [10]$$

pri čemu je:

S – antioksidacijska aktivnost (%);

A_0 – apsorbancija uzorka;

A_1 – apsorbancija kontrolnog uzorka;

Rezultati se izražavaju kao % neutralizacije DPPH slobodnog radikala.

3.2.9. FRAP metoda

FRAP metoda je, kao i DPPH, spektrometrijska metoda. Prikladna je za određivanje antioksidativne aktivnosti u voćnim ekstraktima zbog brze izvedbe i povezanosti s fenolima i askorbinskom kiselinom koji su često prisutni u voću (Pregiban, 2017).

Princip metode: FRAP metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancije pri 595 nm.

Postupak metode: Prije određivanja udjela ukupnih fenola uzorke je potrebno razrijediti otapalom za ekstrakciju. U odmjernu tikvicu od 10 mL otpipetiran je 1 mL ekstrakta, a tikvica je nadopunjena otapalom do oznake volumena.

U epruvetu je otpipetirano 240 μ L destilirane vode, 80 μ L razrijeđenog uzorka i 2080 μ L FRAP reagensa. Sadržaj epruvete je dobro promiješan i termostatiran 5 minuta u vodenoj kupelji na na 37 °C, nakon čega je izmjerena apsorbancija na spektrofotometru na 595 nm.

Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta dodana jednaka količina otapala za ekstrakciju.

Račun

Prije određivanja uzorka potrebno je izraditi baždari dijagram. Za njegovu izradu koristila se standardna otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, tako da koncentracije iznose 0,125, 0,250, 0,500, 1,000 i 2,000 mM. Nadalje je praćen postupak za određivanje antioksidativnog kapaciteta FRAP metodom, osim što je, umjesto uzorka, otpipetiran jednak volumen standardne otopine. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtan je baždarni pravac pomoću računala tako što su na apscisu unešene koncentracije standardne otopine $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 595 nm (Slika 7). Tako se dobije jednadžba pravca prema, a u ovom slučaju glasi:

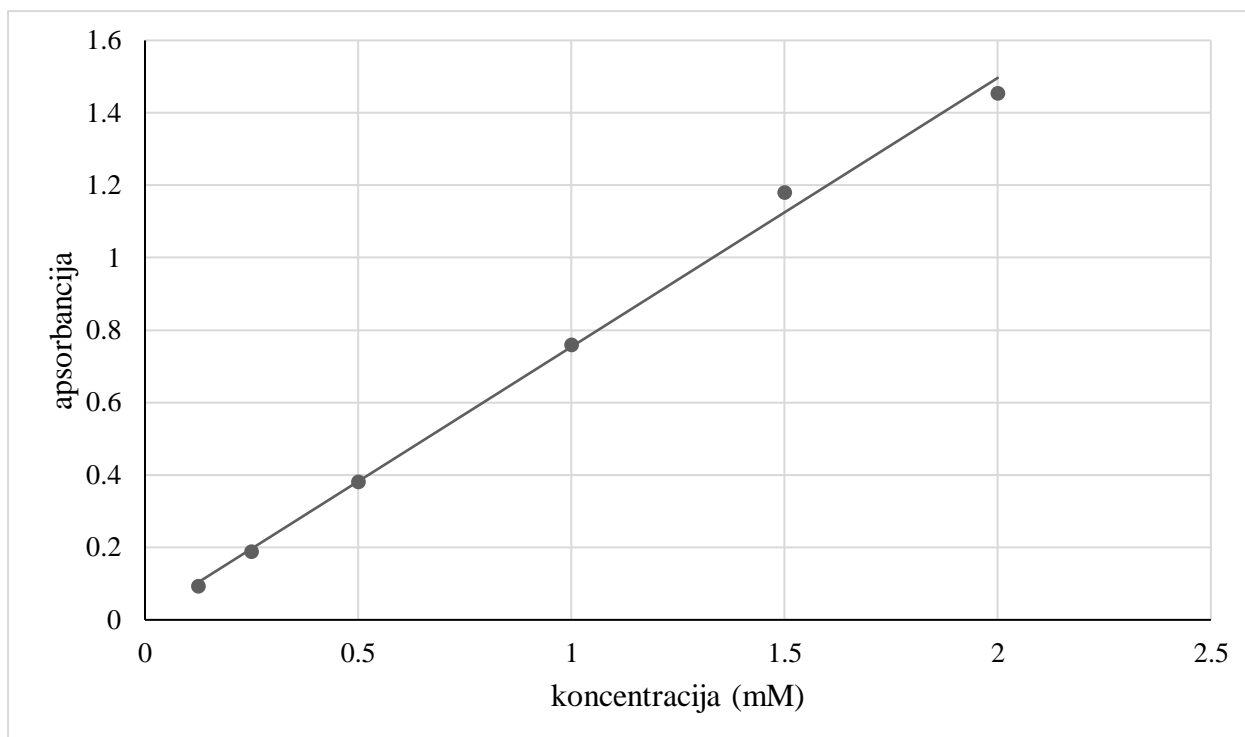
$$y = 0,7428x + 0,0109 \quad [11]$$

pri čemu je:

x – koncentracija željezovog sulfata (mM);

y – apsorbancija pri 595 nm;

a koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9967.



Slika 7. Baždarni dijagram željezovog sulfata za FRAP metodu

Rezultati se izražavaju kao mmol Fe^{2+} ekvivalenata (FE)/100 g suhe tvari.

3.2.10. Određivanje sadržaja elemenata primjenom ICP-MS metode

Koncentracije elementa (As, B, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, Sb, Se, Sr, V, Zn) u uzorcima bobica jarebice određene su primjenom tehnike ICP-MS. ICP-MS je analitička metoda koja se koristi za određivanje elemenata u tragovima u biološkim tekućinama. Njena je najveća prednost mogućnost višestrukog mjerenja elemenata u jednoj analizi.

Princip metode: U nebulizatoru se uneseni uzorci miješaju s plinom te stvaraju aerosol, a potom se male kapljice aerosola razdvajaju od većih kapljica pomoću komore za sprejanje te se unose u kvarcnu baklju. Prije nego uđu u maseni spektrometar, uzorci prolaze kroz baklju te kroz faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije. Molekule aerosola putuju

plazmom te se formiraju pozitivno nabijeni ioni. Nastali ioni prenose se kroz dva metalna konusa u sučelje masenog spektrometra. Uloga sučelja je prijenos iona iz plazme s atmosferskim tlakom u područje nižeg tlaka (maseni spektrometar). Ioni potom dolaze do ionskih leća čija je uloga da pravilno prenesu ione i zaustave neutralne čestice i fotone. Zahvaljujući ionskim lećama, pozitivno nabijeni ioni su odvojeni od ostalih čestica te se na temelju omjera masa/naboj razdvajaju i potom detektiraju upotrebom multiplikatora elektrona (Cigler, 2019).

Postupak metode: Neposredno prije analize, uzorci su razrijeđeni 4 puta u otopini koja se sastojala od 1% (v/v) HNO₃ i 3 µg/L internih standardi (Ge, Rh, Tb, Lu i Ir). Koncentracije elemenata u uzorcima izračunate su temeljem kalibracijskih krivulja multielementnih standarda priređenih u 1% (v/v) HNO₃. Uvjeti rada ICP-MS uređaja Agilent 7500cx prikazani su u Prilogu 2 (Tablica 22). Nadzor kakvoće mjerenja proveden je određivanjem koncentracija mjerenih elemenata u komercijalno dostupnim standardnim referentnim materijalima SRM-1570a lišće špinata i SRM-1573a lišće rajčice Nacionalnog centar za standarde i tehnologiju (NIST), SAD (Tablica 23). Koncentracije elemenata izražene su na suhu masu uzorka u mg/kg i/ili µg/kg.

3.2.11. Obrada podataka

S ciljem određivanja osnovnog kemijskog sastava, antioksidacijske aktivnosti i sadržaja mineralnih elemenata ploda jarebike, za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Microsoft Excel i TIBICO Statistica (ver. 14.0.0.15., TIBICO Software Inc., SAD). Za usporedbu skupina uzoraka korišten je t-test, dvosmjerna analiza varijance (two-way ANOVA) i Mann-Whitney *U test*. Svi statistički testovi provedeni su na razini značajnosti $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE OSNOVNOG KEMIJSKOG SASTAVA

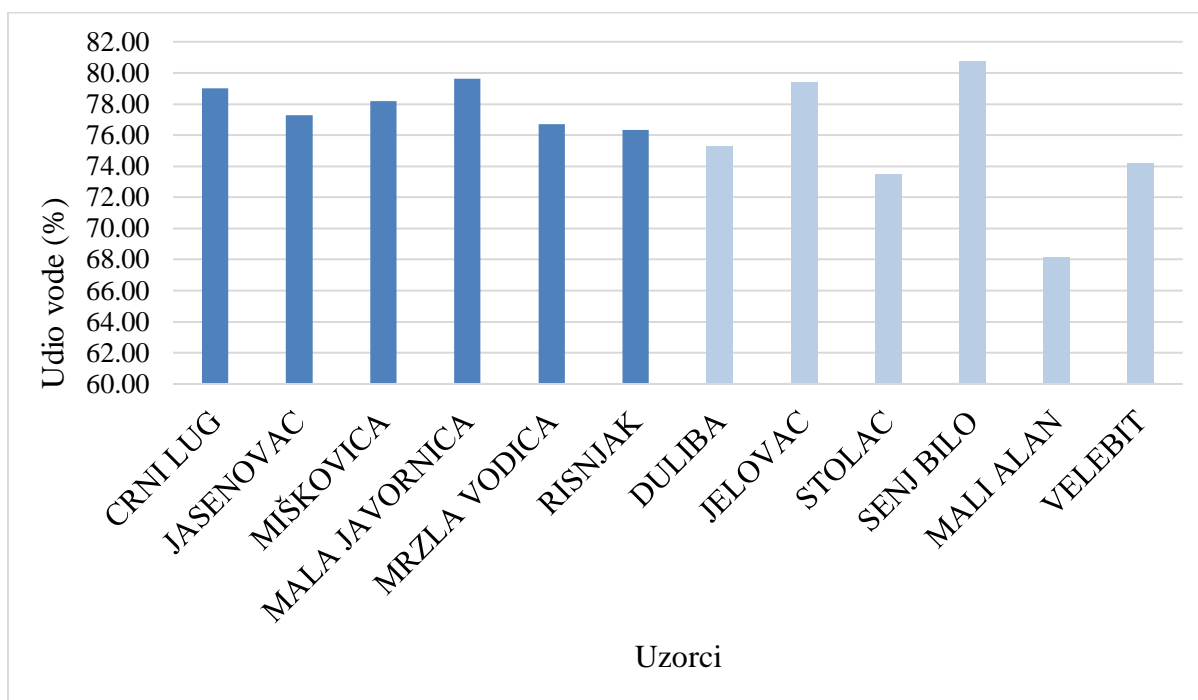
Određivanje osnovnog kemijskog sastava uključuje određivanje udjela vode, masti, proteina, šećera, pepela i celuloze. Tablica 1 prikazuje prosječan udio pojedinih nutrijenata u plodu jarebike s područja Velebita i Gorskog Kotara.

Tablica 1. Osnovni kemijski sastav ploda jarebike sakupljenog na području Velebita i Gorskog Kotara.

Statistički podatak	Voda (%)	Pepeo (%)	Proteini (%)	Šećeri (%)	Masti (%)	Celuloza (%)
Aritmetička sredina	75,72	1,07	2,93	4,70	1,48	1,32
Standardna devijacija	4,63	0,41	0,63	1,30	0,56	0,38
Koeficijent varijacije	0,06	0,38	0,21	0,28	0,37	0,29

Vrijednosti osnovnog kemijskog sastava slične su onima iz postojeće literature. Prema Drvodelić i sur. (2019), najzastupljenija u zrelom plodu jarebike je voda (72 %), potom šećer (6 %), organske kiseline (2,8 %) i dušične tvari (1 %). U istraživanju Raspe i sur. (2000), jarebika korištena za određivanje osnovnog kemijskog sastava prikupljena je na području Finske. Najveći maseni udio u uzorcima ima voda, s prosječnim udjelom od 73,50 %, a najmanji pepeo, s udjelom u prosjeku od 1,13 %, što se ne razlikuje znatno od sastava jarebike s područja Hrvatske (75,72 %, 1,07 %). U istom istraživanju određen je prosječni udio masti od 1,64 % i proteina 2,46 %. Ovi rezultati također ne odstupaju znatno, s obzirom na to da je prosječni udio masti u plodu jarebike s područja Hrvatske 1,48 %, a proteina 2,93 %, što daje razliku od 0,16, odnosno 0,47 %. Najveća razlika u sastavu ploda jarebike prikupljenog u Finskoj i u Hrvatskoj pripada udjelu šećera, a koja iznosi 2,95 %, s većim udjelom šećera u plodovima s područja Hrvatske (Raspe i sur., 2000). Radovi koji određuju količinu vlakana u plodu jarebike nisu pronađeni.

Slika 8, Slika 9, Slika 10, Slika 11, Slika 12 i Slika 13 prikazuju osnovni kemijski sastav jarebika s različitih područja, odnosno lokaliteta.



Slika 8. Udio vode u uzorcima ploda jarebika s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 2. Analiza varijance podataka o udjelu vode u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	563,50	5	112,7	8,92	6,82E-05	2,62
Unutar lokaliteta	303,39	24	12,64			
Ukupno	866,89	29				

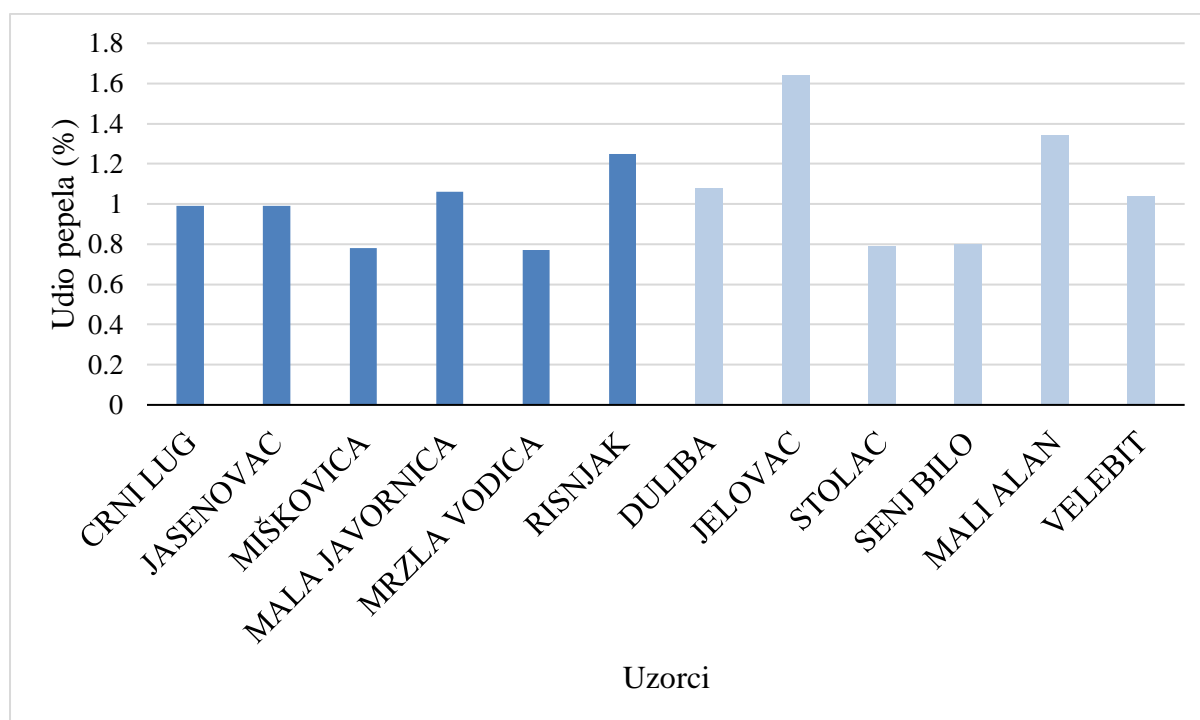
* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 3. Analiza varijance podataka o udjelu vode u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	52,54	5	10,51	2,59	0,05	2,57
Unutar lokaliteta	109,57	27	4,06			
Ukupno	162,10	32				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Na području Velebita, najveći udio vode imaju plodovi prikupljeni na lokalitetu Senj Bilo (80,72 %), najniži prikupljeni na lokalitetu Mali Alan (68,15 %), dok je prosječan udio vode u plodu jarebике s navedenog područja 73,43 %. Plodovi prikupljeni na području Gorskog Kotara imaju prosječan udio vode 77,80 %, najviši udio imaju plodovi prikupljeni na lokalitetu Mala Javornica (79,62 %), a najniži prikupljeni na Risnjaku (76,33 %). T-test ($p=0,0002$) pokazuje statistički značajnu razliku u sadržaju vode kada se uspoređuju područja Velebit i Gorski Kotar. Isto tako, ANOVA testom utvrđena je razlika između pojedinih lokaliteta na području Velebita, kao i na području Gorskog Kotara (Tablica 2 i Tablica 3).



Slika 9. Udio pepela u uzorcima ploda jarebике s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 4. Analiza varijance podataka o udjelu pepela u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	1,94	5	0,39	2,02	0,11	2,62
Unutar lokaliteta	4,62	24	0,19			
Ukupno	6,56	29				

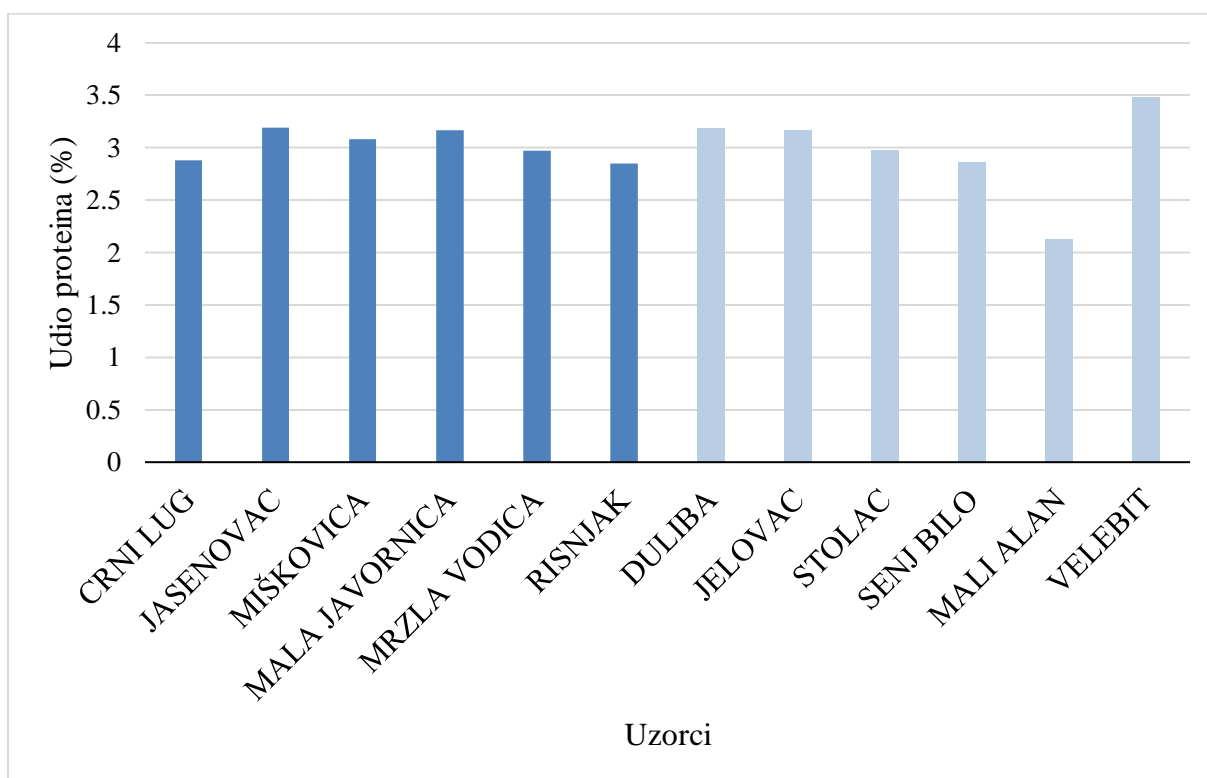
* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 5. Analiza varijance podataka o udjelu pepela u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	0,90	5	0,18	1,88	0,13	2,57
Unutar lokaliteta	2,58	27	0,01			
Ukupno	3,48	32				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Sadržaj pepela u plodu jarebice s područja Velebita, u prosjeku, iznosi 1,16%. Najveći udio pepela određen je u plodovima s Jelovca (1,64 %), a najniži u plodovima prikupljenima u Stolcu (0,79 %). Plodovi s područja Gorskog Kotara imaju, u prosjeku, nešto niži sadržaj pepela (1,00%). Najveći sadržaj pepela na tom području imaju plodovi ubrani na Risnjaku, a najniži ubrani u Mrzloj Vodici. Statistički značajna razlika u udjelu pepela ne postoji niti među lokalitetima (Tablica 4 i Tablica 5), niti među područjima (t-test; $p=0,13$).



Slika 10. Udio proteina u uzorcima ploda jarebice s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 6. Analiza varijance podataka o udjelu proteina u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	0,90	5	0,18	1,88	0,13	2,57
Unutar lokaliteta	2,58	27	0,10			
Ukupno	3,48	32				

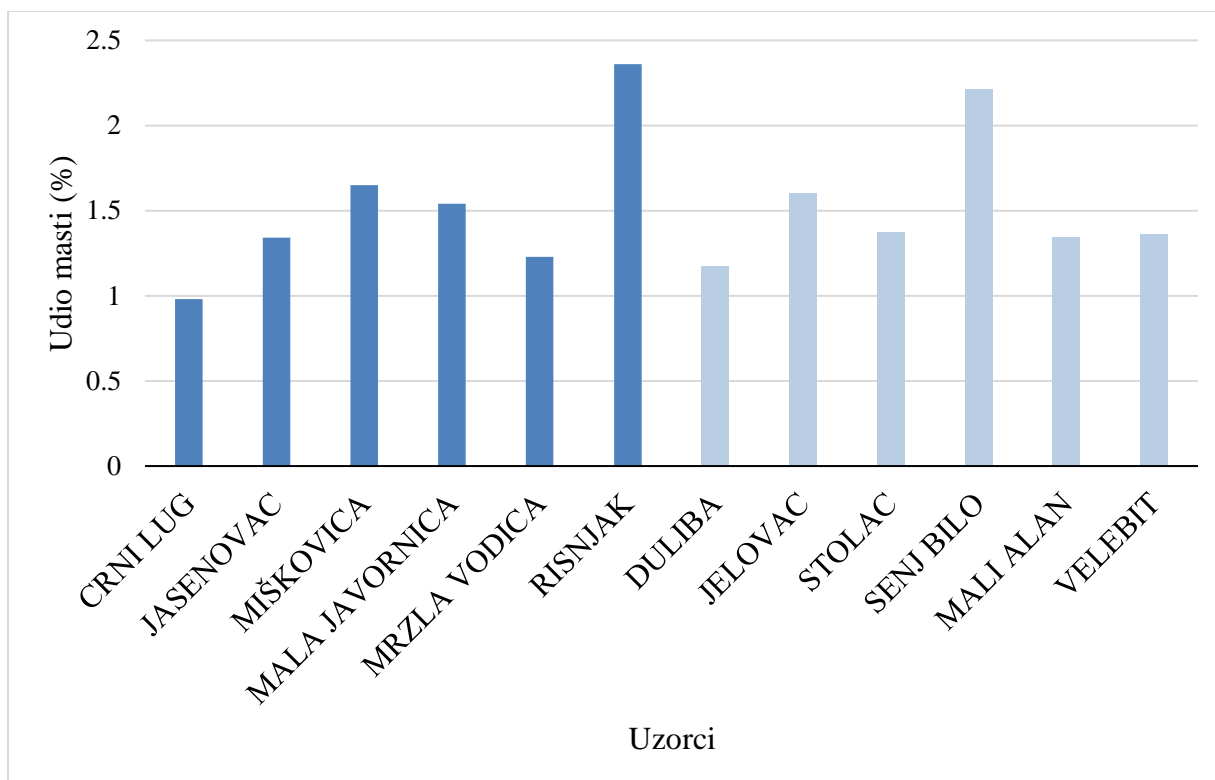
* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 7. Analiza varijance podataka o udjelu proteina u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	0,62	5	0,12	0,28	0,92	2,57
Unutar lokaliteta	11,83	27	0,44			
Ukupno	12,45	32				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Udio proteina u plodu jarebike s područja Velebita varira između 2,13 % (Mali Alan) i 3,48 % (Velebit), dok u prosjeku iznosi 2,85 %. Prosječan je udio proteina u plodu s područja Gorskog Kotara 3,01 %. Najveći udio određen je u uzorcima s Jasenovca (3,19 %), a najmanji u plodovima s Risnjaka (2,85 %). Statistički značajna razlika u sadržaju proteina postoji između lokaliteta s oba područja (Tablica 6 i Tablica 7), ali ne i među samim područjima (t-test; $p=0,32$).



Slika 11. Udio masti u uzorcima ploda jarebike s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 8. Analiza varijance podataka o udjelu masti u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	2,31	5,00	0,46	2,65	0,05	2,62
Unutar lokaliteta	4,19	24,00	0,17			
Ukupno	6,50	29,00				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

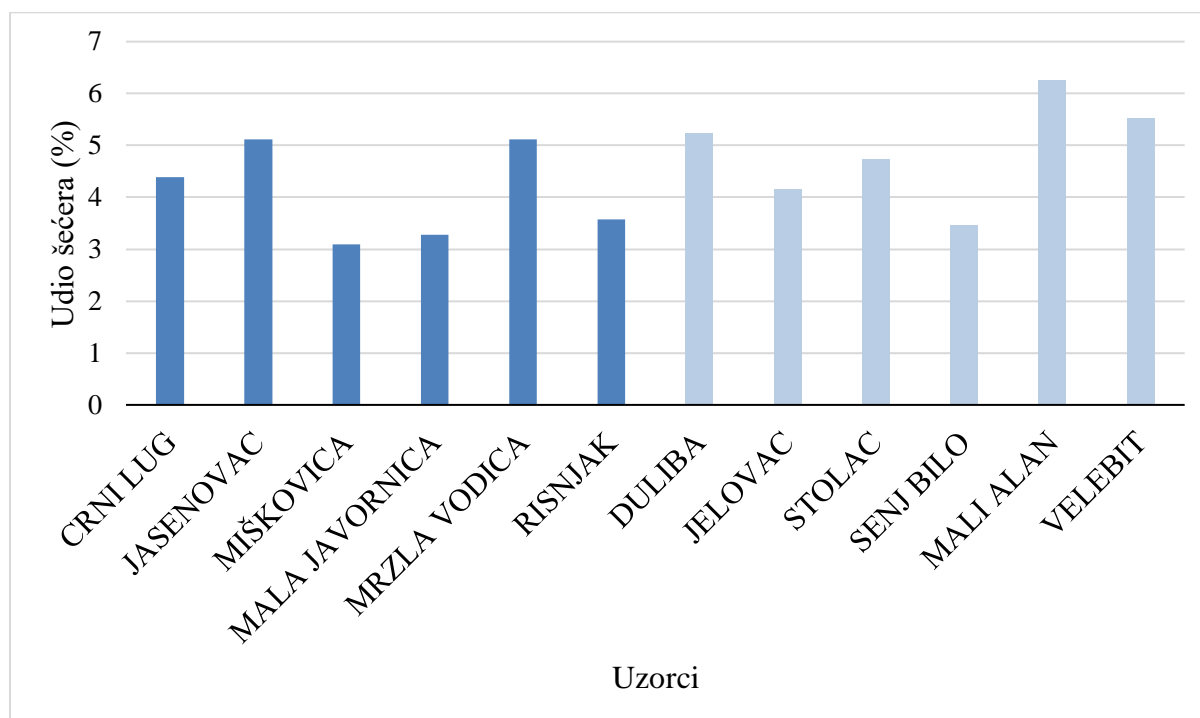
Tablica 9. Analiza varijance podataka o udjelu masti u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	6,38	5	1,28	5,76	0,00	2,60
Unutar lokaliteta	5,54	25	0,22			
Ukupno	11,92	30				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Na području Velebita udio masti u uzorcima iznosi 1,44 %, s najvišim postotkom u uzorcima s lokaliteta Senj Bilo (2,21 %), a najnižim s lokaliteta Duliba (1,17 %). Između lokaliteta na

ovom području utvrđena je statistički značajna razlika (Tablica 8). Plodovi sakupljeni na području Gorskog Kotara imaju, u prosjeku, udio masti 1,52 %. Najveći sadržaj masti određen je u uzorcima sakupljenima na Risnjaku (2,36 %), a najmanji u uzorcima iz Crnog Luga (0,98 %). ANOVA test pokazao je statistički značajnu razliku u sadržaju masti plodova sakupljenima na različitim lokalitetima Velebita (Tablica 8) i Gorskog Kotara (Tablica 9). T-test nije pokazao statistički značajnu razliku između Velebita i Gorskog Kotara ($p=0,55$).



Slika 12. Udio šećera u uzorcima ploda jarebike s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 10. Analiza varijance podataka o udjelu ukupnih šećera u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	24,70	5,00	4,94	4,39	0,01	2,62
Unutar lokaliteta	27,03	24,00	1,13			
Total	51,73	29,00				

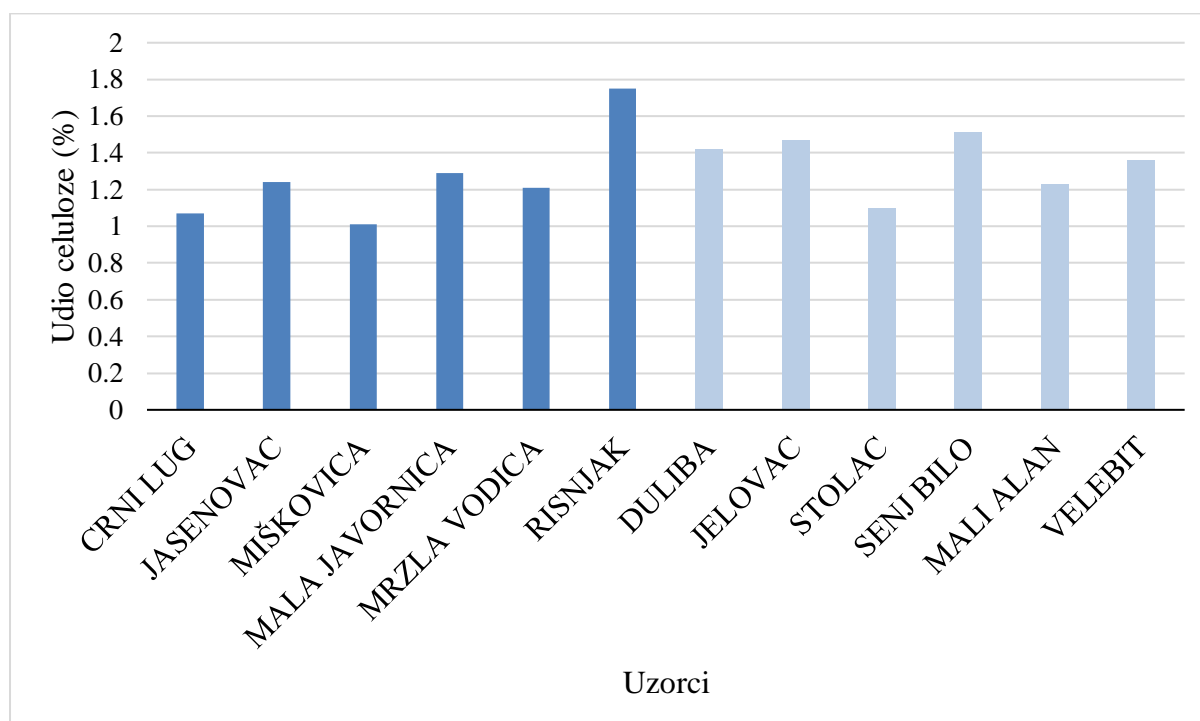
* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 11. Analiza varijance podataka o udjelu ukupnih šećera u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	20,87	5,00	4,17	10,12	0,00	2,57
Unutar lokaliteta	11,14	27,00	0,41			
Ukupno	32,01	32,00				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Udio ukupnih šećera u svježem uzorku s područja Velebita iznosi 5,31 %, pri čemu najveći udio imaju uzorci s lokaliteta Mali Alan (6,26 %), a najmanji udio uzorci s lokaliteta Senj Bilo (3,46 %). Statistički značajna razlika među lokalitetima utvrđena je ANOVA testom (Tablica 10). Uzorci s područja Gorskog Kotara imaju, u prosjeku, udio ukupnih šećera 4,14 %, najveći na Jasenovcu (5,12 %), a najmanji na Miškovici (3,09 %). ANOVA testom utvrđena je statistički značajna razlika između lokaliteta na ovom području (Tablica 11). T-test pokazao je i statistički značajnu razliku u udjelu ukupnih šećera između plodova s Velebita i onih iz Gorskog Kotara ($p=0,0002$).



Slika 13. Udio celuloze u uzorcima ploda jarebike s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 12. Analiza varijance podataka o udjelu celuloze u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	0,41	5,00	0,08	0,50	0,77	2,71
Unutar lokaliteta	3,23	20,00	0,16			
Ukupno	3,63	25,00				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 13. Analiza varijance podataka o udjelu celuloze u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	1,96	5,00	0,39	3,93	0,01	2,60
Unutar lokaliteta	2,50	25,00	0,10			
Ukupno	4,46	30,00				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Udio celuloze u uzorcima s područja Velebita iznosi 1,33 %, s najvećim udjelom na lokalitetu Senj Bilo (1,51 %), a najmanjim na Stolcu (1,10 %). Statistički ne postoji značajna razlika između lokaliteta (Tablica 12) Uzorci iz Gorskog Kotara imaju prosječan udio celuloze 1,31 %. Najveći je udio određen u uzorcima s Risnjaka (1,75 %), a najmanji u uzorcima s lokaliteta Miškovića (1,01 %). Između lokaliteta postoji statistički značajna razlika u sadržaju celuloze (Tablica 13), a među područjima ona nije utvrđena (t-test; $p=0,89$).

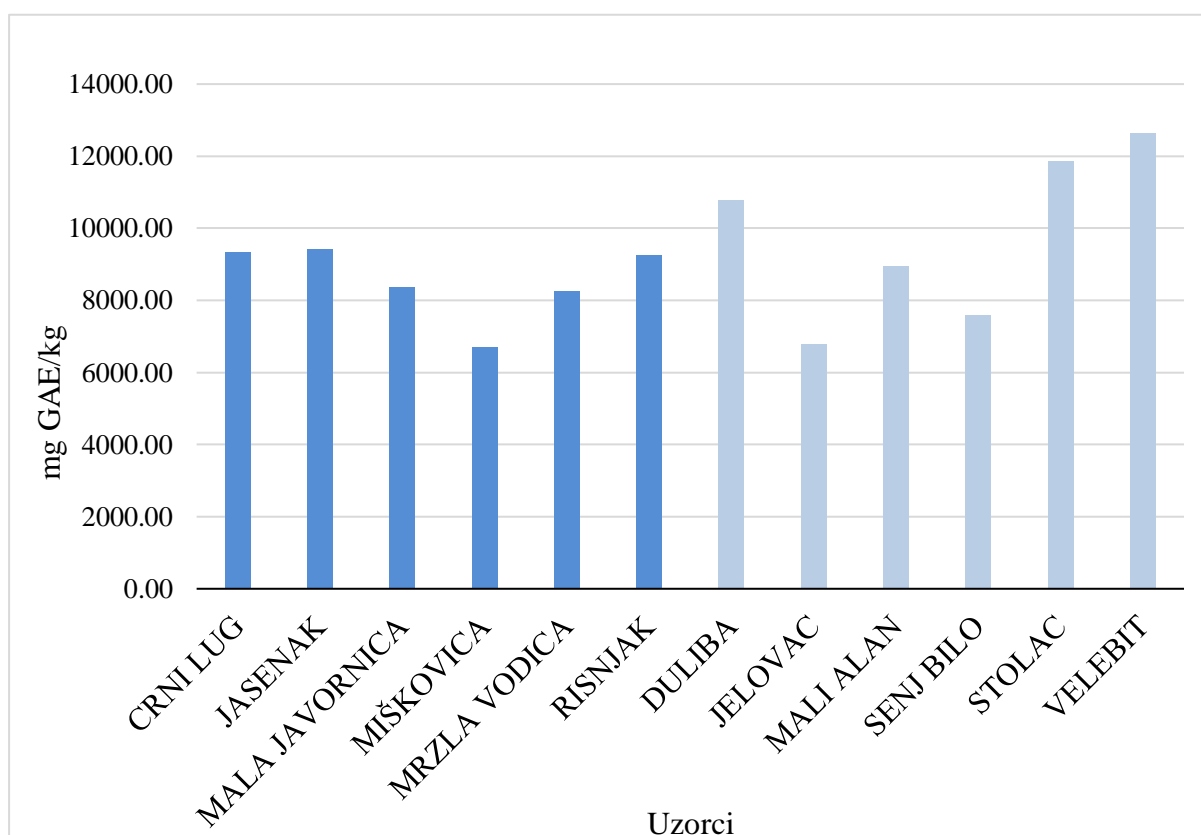
Varijacije u udjelima pojedinih sastavnica određivanog osnovnog kemijskog sastava između uzoraka s različitih lokaliteta vjerojatno je posljedica upravo različitosti lokaliteta s kojih potječu, uvjeta rasta biljke, vremena sakupljanja plodova, zrelosti plodova u trenutku sakupljanja, kao i uvjeta transporta i skladištenja prije određivanja (Shakeri i sur., 2018; Kowalska, 2012).

4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

4.2.1. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli izraženi su kao mg GAE/kg svježe mase. U kilogramu ploda jarebice s područja Gorskog Kotara određeno je $8685,81 \pm 1362,59$ mg GAE, dok je u plodovima s

područja Velebita određeno $10132,35 \pm 4662,41$ mg GAE. Prema Mlček i sur. (2014), plodovi jarebrike prikupljeni na području jugoistočne Češke sadrže, u prosjeku, 4270 mg GAE/kg svježe mase. Drugo istraživanje (Rop i sur., 2012) pokazalo je sadržaj ukupnih fenola u plodovima različitih hibrida jarebrike između 3650 mg GAE/kg i 5820 mg GAE/kg. Sadržaj ukupnih fenola u plodu jarebrike može oscilirati između 5500 i 10140 mg/kg svježe mase (Hukkanen i sur., 2006). U istraživanju Poljak i sur. (2021) provedeno je određivanje ukupnih fenola u plodovima oskoruše (*Sorbus domestica*). Radi se o drugoj vrsti iz roda kojem pripada i jarebrika, a koji su prikupljeni u različitim regijama Republike Hrvatske, kontinentalnim i mediteranskim. Uzorci iz kontinentalnog dijela Hrvatske imali su veći sadržaj ukupnih fenola (11110 i 12100 mg GAE/kg) u usporedbi s uzorcima iz mediteranskih regija (3500 i 5620 mg GAE/kg). Rezultati navedenog rada, u odnosu na ostale literaturne podatke, najviše su u skladu s rezultatima ovog istraživanja.



Slika 14. Prikaz sadržaja ukupnih fenola u uzorcima plodova jarebrike s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo) (mg GAE/kg).

Tablica 14. Analiza varijance podataka o sadržaju ukupnih fenola u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	90978403,61	5	18195680,72	0,80	0,57	2,85
Unutar lokaliteta	365520289	16	22845018,06			
Ukupno	456498692,6	21				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 15. Analiza varijance podataka o sadržaju ukupnih fenola u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	19893696,32	5,00	3978739,26	2,89	0,04	2,66
Unutar lokaliteta	30235680,98	22,00	1374349,14			
Ukupno	50129377,29	27,00				

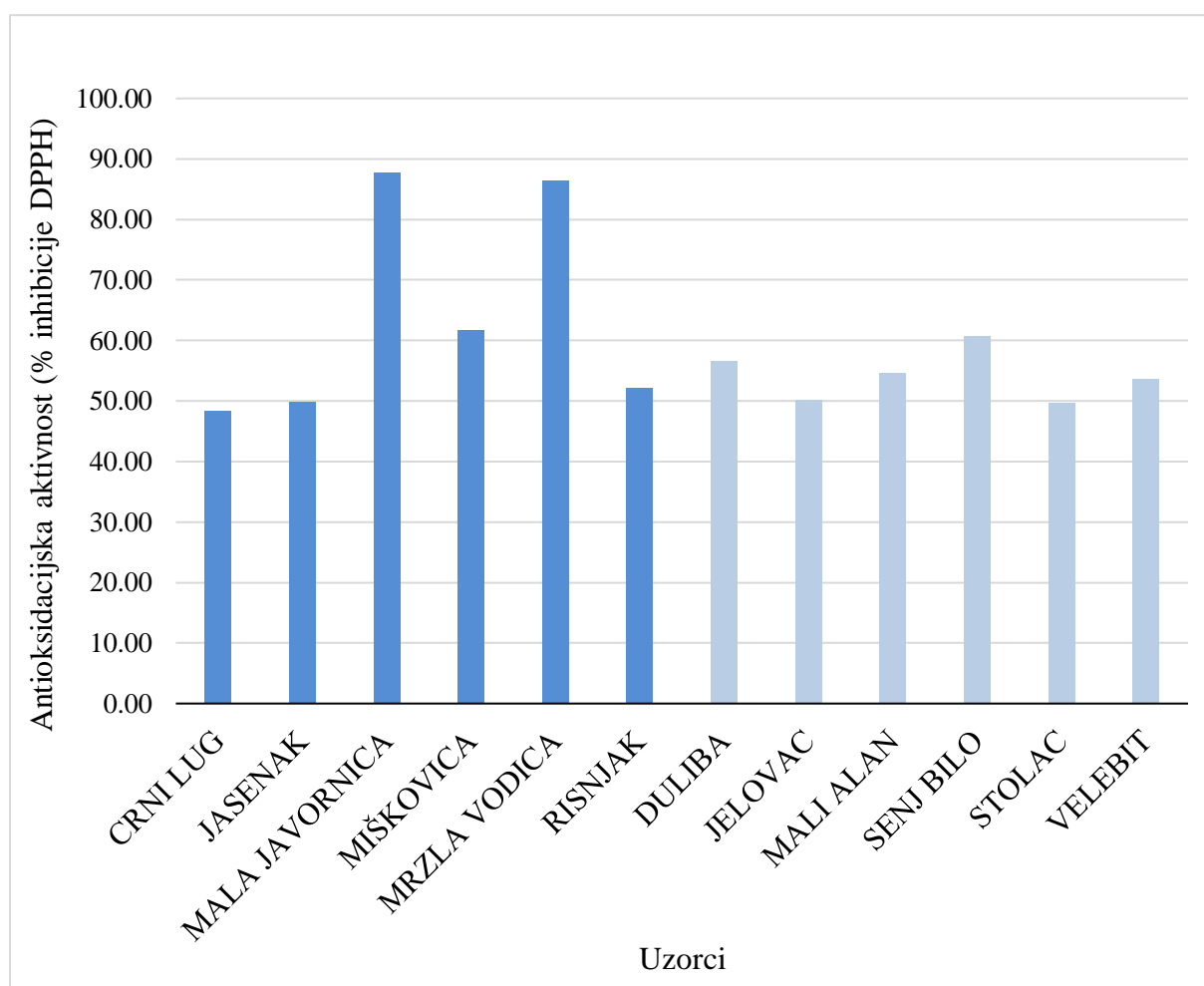
* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Slika 14 prikazuje različiti sadržaj ukupnih fenola u uzorcima s obzirom na lokalitet s kojeg su prikupljeni. Najviša vrijednost utvrđena je u uzorcima prikupljenim na lokalitetu Velebit ($12647,91 \pm 8920,30$ mg GAE/kg), a najniža u uzorcima prikupljenim na lokalitetu Miškovića ($6686,50 \pm 838,39$ mg GAE/kg). Analizom varijance (

Tablica 14) nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola u plodu jarebike s različitih lokaliteta na području makro lokacije Velebit, ali postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola u plodovima s različitih lokaliteta na makro lokaciji Gorski Kotar (Tablica 15). Zaključno, T-testom ($p=0,17$) nije dokazana statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola u plodovima jarebike s obzirom na dvije velike makro lokacije na kojima su uzorci sakupljeni.

4.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom izražena je kao postotak inhibicije slobodnih radikala. Ekstrakt plodova jarebike s područja Gorskog Kotara, u prosjeku, pokazuje antioksidacijsku aktivnost 64,57 %, a s područja Velebita 54,52 %.



Slika 15. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta ploda jarebike izražena u postotku inhibicije slobodnog radikala u uzorcima s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 16. Analiza varijance podataka o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	8235,06	5	1647,01	112,54	0,00	2,66
Unutar lokaliteta	321,97	22	14,63			
Ukupno	8557,03	27				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 17. Analiza varijance podataka o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

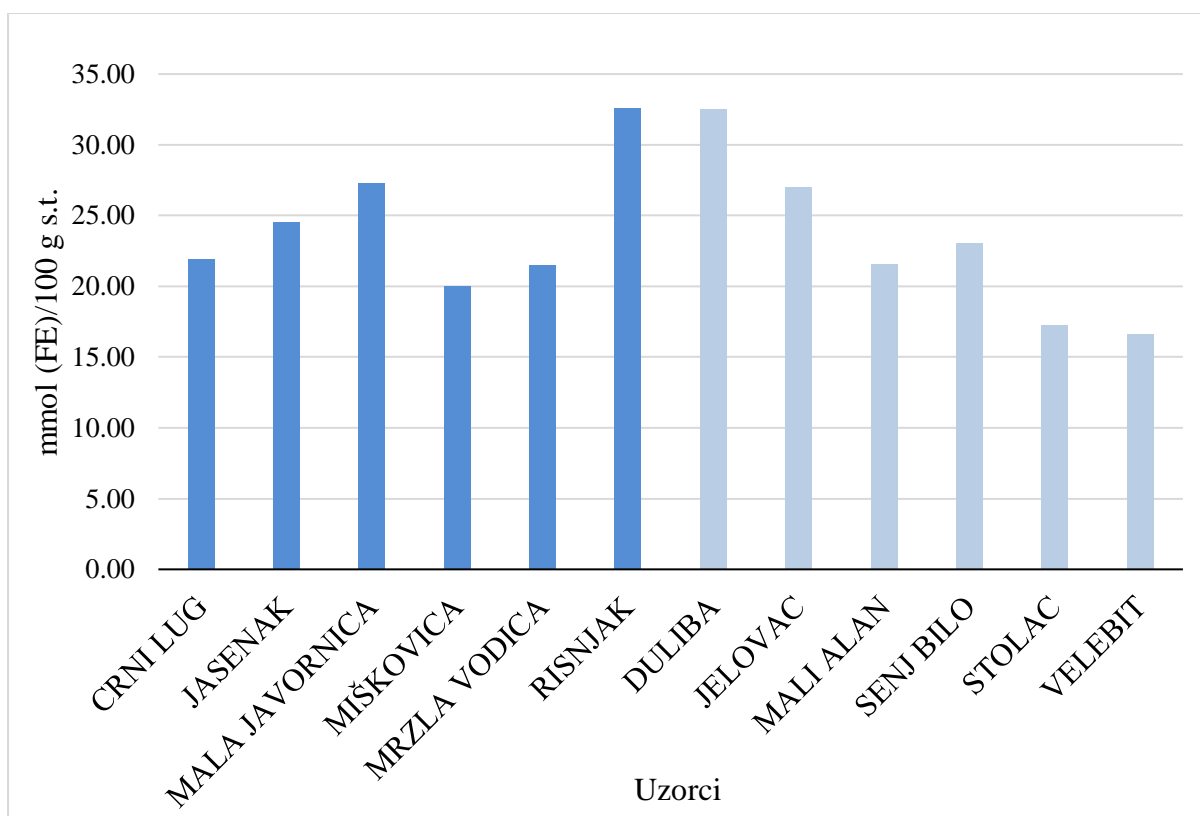
<i>Izvor varijacije</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Između lokaliteta	248,20	5	49,64	3,52	0,02	2,85
Unutar lokaliteta	225,58	16	14,10			
Ukupno	473,78	21				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Slika 15 prikazuje prosječnu antioksidacijsku aktivnost (%) ekstrakta ploda jarebике sakupljenih na svim lokalitetima. Najviša antioksidacijska aktivnost zabilježena je u ekstraktu plodova prikupljenih na lokalitetu Mala Javornica ($87,74 \pm 4,05$ %), a najniža u uzorku prikupljenom na lokalitetu Crni Lug ($48,43 \pm 5,29$). Analiza varijance (Tablica 16 i Tablica 17) pokazala je statistički značajnu razliku između pojedinih lokaliteta na obje makro lokacije, i Velebita i Gorskog Kotara. Također, statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta ploda jarebике utvrđena je i između navedene dvije velike makro lokacije primjenom t-testa ($p=0,01$).

4.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena FRAP metodom izražena je u mmol ekvivalenata $Fe^{2+}/100$ g suhe tvari. Slika 16 prikazuje prosječan sadržaj ekvivalenata Fe^{2+} u uzorcima s različitih lokaliteta.



Slika 16. Antioksiđacijska aktivnost ekstrakta ploda jarebike izražena u sadržaju mmol ekvivalenata Fe²⁺ (FE) u 100 g suhe tvari u uzorcima s različitih lokaliteta Gorskog Kotara (tamnoplavo) i Velebita (svijetloplavo).

Tablica 18. Analiza varijance podataka o antioksiđacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom u uzorcima s lokaliteta na području Velebita.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	439,82	5	87,96	3,85	0,01	2,68
Unutar lokaliteta	479,94	21	22,85			
Ukupno	919,77	26				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

Tablica 19. Analiza varijance podataka o antioksiđacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom u uzorcima s lokaliteta na području Gorskog Kotara.

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Između lokaliteta	702,95	5	140,6	5,65	0,00	2,85
Unutar lokaliteta	398,24	16	24,89			
Ukupno	1101,19	21				

* SS – suma kvadrata odstupanja; df – stupnjevi slobode; MS – prosječna varijacija, F – Fisherov koeficijent

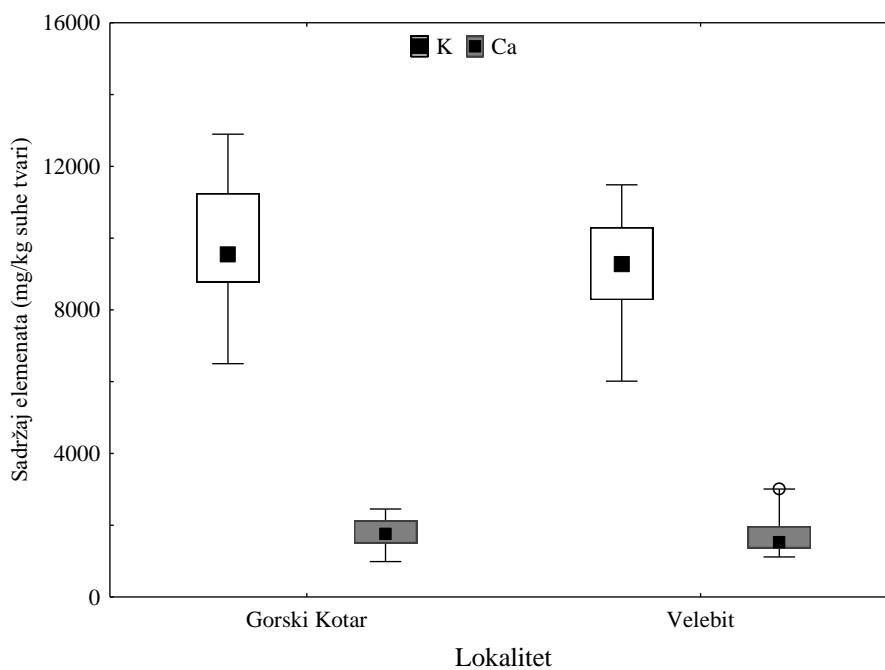
Najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazali su uzorci prikupljeni na lokalitetu Risnjak (32,60 mmol (FE)/100 g s.t.), a najnižu plodovi prikupljeni na Velebitu (16,61 mmol (FE)/100 g s.t.). U prosjeku, antioksidacijska aktivnost plodova prikupljenih s područja Gorskog Kotara iznosi 24,70 mmol (FE)/100 g s.t., a s područja Velebita 22,55 mmol (FE)/100 g s.t. Analiza varijance (Tablica 18 i Tablica 19) pokazala je statistički značajnu razliku u antioksidacijskoj aktivnosti između pojedinih lokaliteta s obje makro lokacije. Ipak, ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ekvivalenata Fe^{2+} između promatranih makro lokacija Velebita i Gorskog Kotara. Istraživanja o antioksidativnom potencijalu plodova jarebrike utvrđenom FRAP metodom nisu pronađena, stoga su rezultati uspoređeni s rezultatima drugog bobičastog voća. U istraživanju Shabanaj (2014) na 11 komercijalnih sokova aronije utvrđen je prosječan udio mmol (FE) $38,004 \pm 11,438$ u 100 g suhe tvari. U istraživanju antioksidacijske aktivnosti divlje borovnice (Soče, 2019), FRAP metodom utvrđeno je $19,28 - 81,19$ mmol (FE)/100 g svježeg uzorka, što je znatno više u odnosu na plodove jarebrike koji, na 100 g svježeg uzorka, pokazuju antioksidacijsku aktivnost 3,72 - 10,38 mmol (FE). Istraživanje je provedeno na 35 uzoraka divlje borovnice prikupljene u Primorsko-goranskoj županiji.

4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MINERALNIH TVARI

Multielementni sadržaj (mg/kg s.t.) plodova jarebrike s područja Gorskog Kotara i Velebita prikazan je na Slikama 17 do 22.

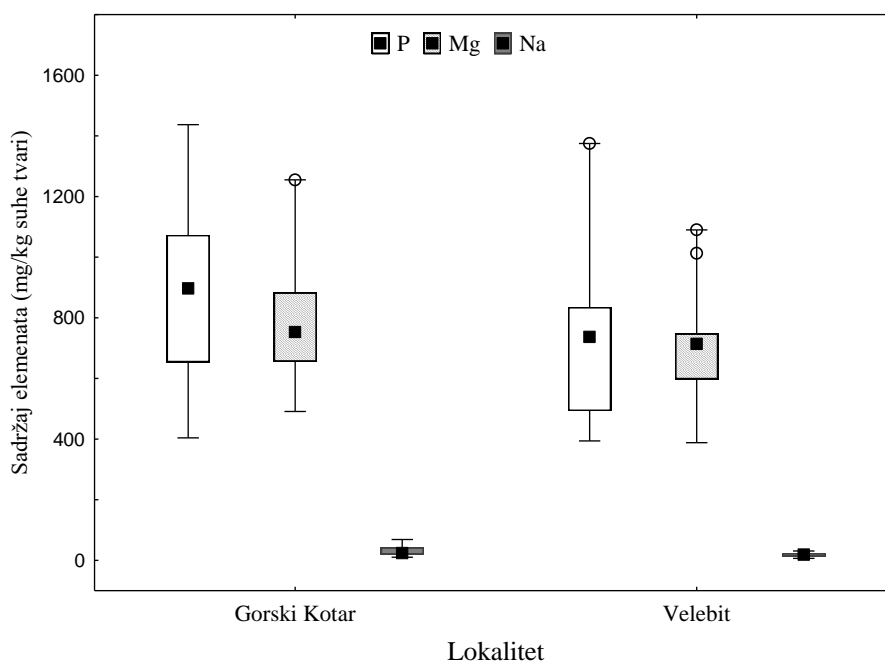
Poput ostalog bobičastog voća, kao što su borovnice, maline, kupine, ribizli i plodovi jarebrike sadrže najviše makroelemenata, K 9553 ± 1622 mg/kg, Ca 1754 ± 485 mg/kg (Slika 17), P 804 ± 293 mg/kg, Mg 745 ± 195 mg/kg te Na 25 ± 14 mg/kg (Slika 18). Dobiveni rezultati slažu se s rezultatima elementnog sastava ploda jarebrike u Finskoj; K 1500 mg/kg, P 2100 mg/kg, Ca 2000 mg/kg i Mg 1600 mg/kg (Raspe i sur., 2000), no ujedno su nekoliko puta viši od vrijednosti utvrđenih u plodovima jarebrike iz Turske (K 1540 mg/kg, Ca 299 mg/kg, Mg 278 mg/kg) (Aslantaş i sur., 2007).

Od esencijalnih mikroelemenata, plodovi jarebrike sadrže više Mn $14,0 \pm 12,4$ mg/kg i Fe $14,2 \pm 3,6$ mg/kg (Slika 19) u odnosu na Zn $4,3 \pm 1,9$ mg/kg, Cu $2,8 \pm 1,1$ mg/kg (Slika 20) i Se $0,005 \pm 0,004$ mg/kg (Slika 21).



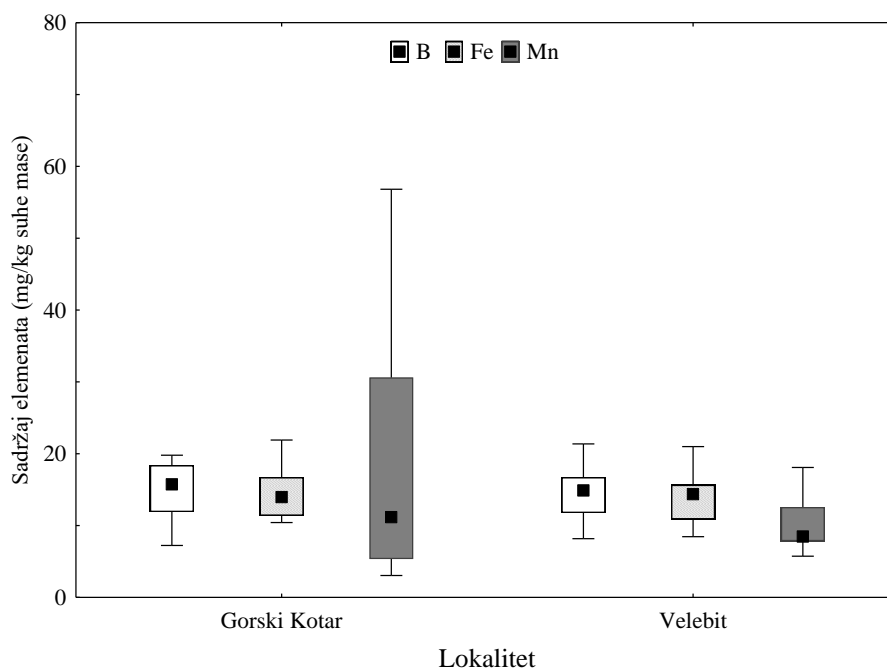
Slika 17. Sadržaj makroelemenata kalija (K) i kalcija (Ca) u plodovima jarebike s lokaliteta na područjima Gorskog Kotara i Velebita.

(Rezultati su prikazani kao Box i Whisker dijagram; donja i gornja linija označavaju najmanju i najveću vrijednost, crni kvadrat medijan, kružić netipičnu vrijednost.)



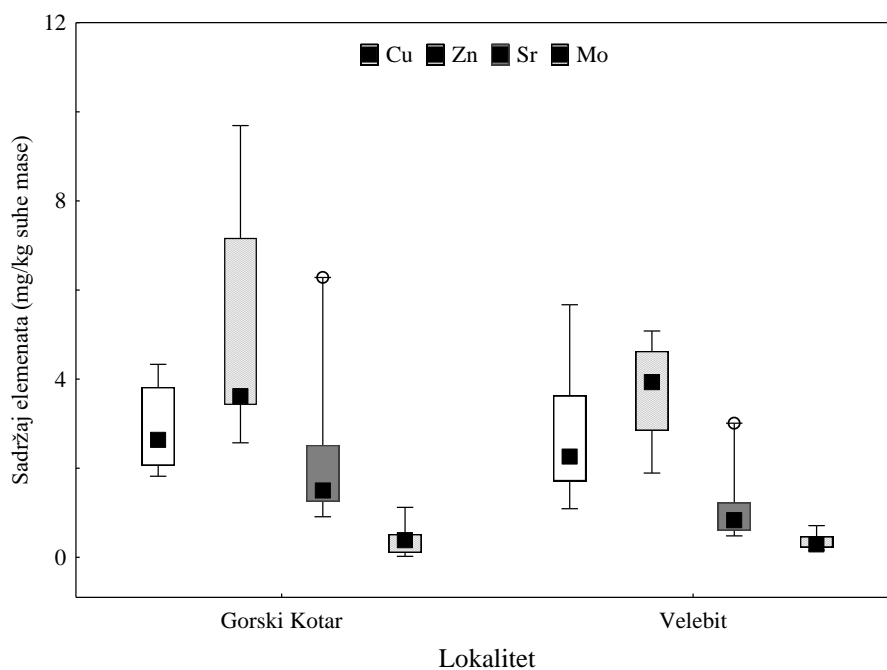
Slika 18. Sadržaj makroelemenata – fosfor (P), magnezij (Mg), natrij (Na) u plodovima jarebike s lokaliteta na područjima Gorskog Kotara i Velebita.

(Rezultati su prikazani kao Box i Whisker dijagram; donja i gornja linija označavaju najmanju i najveću vrijednost, crni kvadrat medijan, kružić netipičnu vrijednost.)

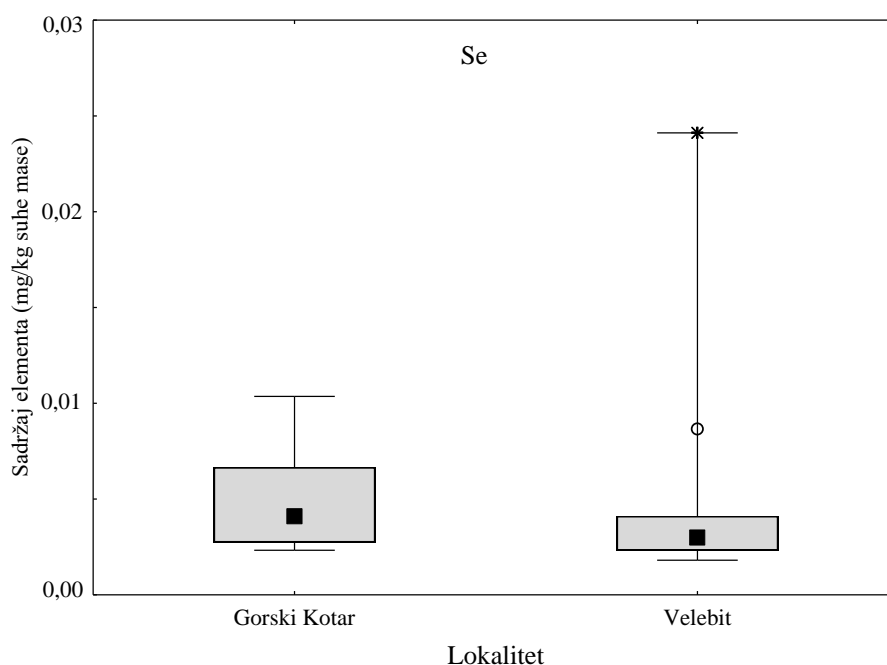


Slika 19. Sadržaj mikroelemenata – bor (B), željezo (Fe), mangan (Mn) u plodovima jarebice s lokaliteta na područjima Gorskog Kotara i Velebita.

(Rezultati su prikazani kao Box i Whisker dijagram; donja i gornja linija označavaju najmanju i najveću vrijednost, crni kvadrat medijan, kružić netipičnu vrijednost.)



Slika 20. Sadržaj mikroelemenata – bakar (Cu), cink (Zn), stroncij (Sr), molibden (Mo) u plodovima jarebice s lokaliteta na područjima Gorskog Kotara i Velebita
(Rezultati su prikazani kao Box i Whisker dijagram; donja i gornja linija označavaju najmanju i najveću vrijednost, crni kvadrat medijan.)

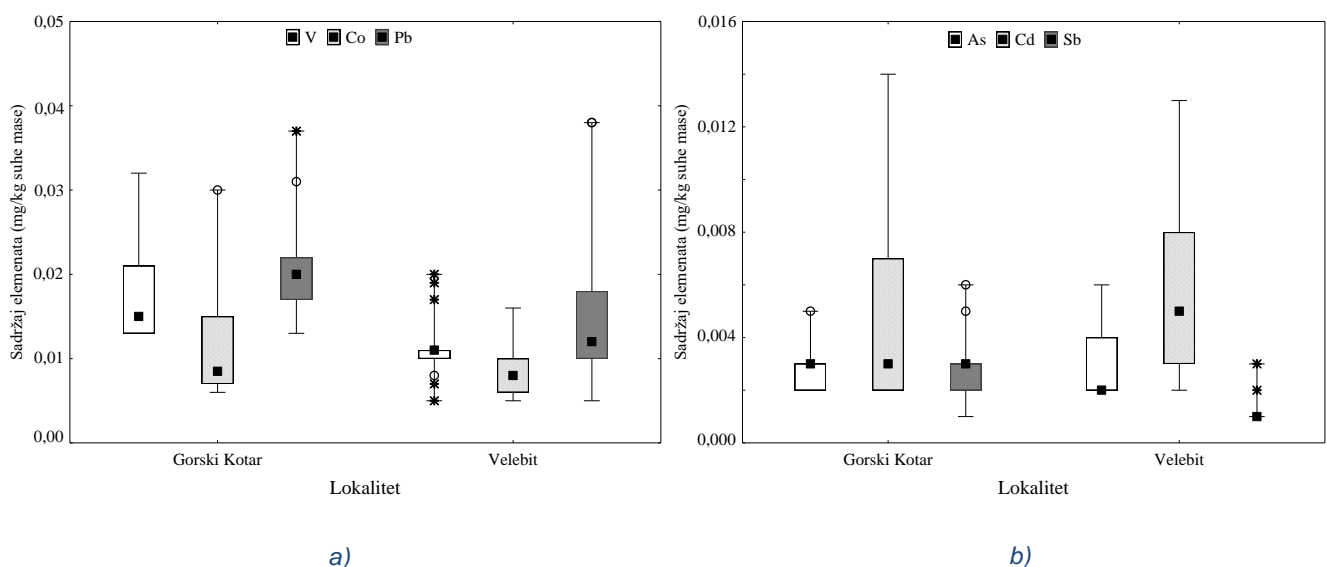


Slika 21. Sadržaj elementa u ultra tragu selena (Se) u plodovima jarebice s lokaliteta na područjima Gorskog Kotara i Velebita.

(Rezultati su prikazani kao Box i Whisker dijagram; donja i gornja linija označavaju najmanju i najveću vrijednost, crni kvadrat medijan, kružić netipičnu vrijednost.)

Dobivene vrijednosti mikroelementnog sastava vrlo su slične rezultatima istraživanja Aslantaš i sur. (2007) za Fe 24,2 mg/kg, Zn 8,61 mg/kg, Mn 5,03 mg/kg i Cu 2,94 mg/kg. U preglednom radu Nile i Park (2014) o bioaktivnim komponentama bobičastog voća i njihovim učincima na zdravlje naveden je tablični prikaz mineralnog sadržaja (mg/100 g jestive mase) šest vrsta bobica – borovnica, brusnica, malina, kupina, crni ribiz i bazga. Usporedbom rezultata, utvrđeno je su bobice jarebrike slične u sadržaju (izraženim u mg/100 g jestive mase) K: 58–356, P: 10–37, Na: 0,2–1,6 i Fe: 0,2–0,5 malinama (K: 200-225; P: 20-22; Na: 0,5-1,0; Fe: 0,4-0,6), P i Mg: 10–31; kupinama (P: 25-30; Mg: 17-20), Zn: 0,06–0,2 i Cu: 0,04–0,22; borovnicama (Zn: 0,06-0,12; Cu: 0,03-0,06), te Ca: 24–105 i Mn 0,07–1,3; crnom ribizu (Ca: 35-45; Mn: 0.35-0.52). Nadalje, sadržaj B ($14,9 \pm 3,5$ mg/kg) sličan je sadržaju Mn i Fe.

Prosječne vrijednost ostalih elemenata u tragovima su navedene u padajućem nizu: Sr $1,57 \pm 1,26$ mg/kg > Mo $0,38 \pm 0,25$ mg/kg > V $0,014 \pm 0,005$ mg/kg > Co $0,010 \pm 0,005$ mg/kg > Pb $0,018 \pm 0,009$ mg/kg > Cd $0,005 \pm 0,004$ mg/kg > As $0,003 \pm 0,001$ mg/kg > Sb $0,002 \pm 0,001$ mg/kg (Slika 20 i Slika 22).



Slika 22. Sadržaj ostalih elemenata u tragovima – vanadij (V), kobalt (Co) i olovo (Pb) (a), arsen (As), kadmij (Cd) i antimon (Sb) (b) u plodovima jarebrike s lokaliteta na područjima Gorskog Kotara i Velebita.

(Rezultati su prikazani kao Box i Whisker dijagram; donja i gornja linija označavaju najmanju i najveću vrijednost, crni kvadrat medijan, kružić netipičnu vrijednost, a zvjezdica ekstremnu vrijednost.)

S obzirom na to da su plodovi jarebike skupljani na svojim prirodnim staništima na području Gorskog Kotara i Velebita testirane su razlike u sadržaju elemenata ovisno o području sakupljanja uzoraka. Utvrđene su razlike za sadržaj V ($p=0,003$), Sr ($p=0,008$) i Sb ($p=0,0006$). Plodovi jarebike s područja Gorskog Kotara imaju do nekoliko puta više razine navedenih elementa u usporedbi s jarebikama velebitskog područja. Prema Shotyk (2020), koncentracije V u plodovima različitih divljih bobica pozitivno koreliraju s koncentracijama aluminija i povezuju se s česticama prašine, odnosno onečišćenjem okoliša. Nalaz većeg sadržaja V u jarebikama iz Gorskog Kotara u usporedbi s velebitskim područjem mogao bi upućivati na veće onečišćenje okoliša u tom području.

5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata i provedene statističke analize može se zaključiti sljedeće:

1. Prosječan osnovni kemijski sastav plodova jarebike (*Sorbus aucuparia* L.) uključuje 75,72 % vode, 4,70 % šećera 2,93 % proteina, 1,48 % masti, 1,32 % celuloze i 1,07 % pepela, pri čemu statistički značajna razlika u osnovnom kemijskom sastavu ploda jarebike među makro lokacijama (Velebit i Gorski Kotar) postoji kada je riječ o sadržaju vode i ukupnih šećera. Statistički značajna razlika između mikro lokaliteta unutar makro lokacije Gorski Kotar postoji za sadržaj vode, proteina, masti, šećera i celuloze, a između mikro lokaliteta unutar makro lokacije Velebit za sadržaj vode, masti i ukupnih šećera.
2. Utvrđeno je da je plod jarebike dobar izvor fenola, pri čemu je u kilogramu svježeg ploda jarebike, u prosjeku, određeno $9322,29 \pm 3296,28$ mg GAE. Ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola između dva makro područja, ali postoji među mikro lokalitetima Gorskog Kotara.
3. Ekstrakti plodova jarebike pokazali su dobru antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH i FRAP metodom, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti između dva makro područja (Velebit i Gorski Kotar) primjenom obje metode, dok je na makro lokacijama utvrđena samo kod DPPH metode.
4. Primjenom ICP-MS metode određen je sadržaj mineralnih elemenata u plodovima jarebike. Svojim mikroelementnim sastavom jarebike su najsličnije malinama i borovnicama.
5. Ovo istraživanje predstavlja značajan doprinos u razumijevanju osnovnog kemijskog sastava i antioksidativnog potencijala jarebike te daje ideju za daljnja istraživanja u smjeru razvitka novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani kojima bi baza bila autohtona biljka s hrvatskog podneblja.

6. LITERATURA

Aldedunye F, Matthäus B (2014) Phenolic extracts from *Sorbus aucuparia* (L.) and *Malus baccata* (L.) berries: Antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage. *Food Chem* **159**, 273-281. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.139

Anonymous (2022) *Sorbus aucuparia*, < <https://pixabay.com>>. Pristupljeno 21. lipnja 2022.

Amić D, Davidović-Amić D, Bešalo D, Trinajstić N (2003) Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croat Chem Acta* **76**, 55-61.

Aslantaş R, Pirlak L, Guleryuz M (2007) The Nutritional Value of Wild Fruits from the North Eastern Anatolia Region of Turkey. *Asian J Chem* **19**, 3072-3078.

Bincy B, Priya A, Ranjit V (2018) Antioxidant and anticancer properties of berries. *Crit Rev Food Sci Nutr* **58**, 2491-2507. doi: 10.1080/10408398.2017.1329198.

Bobinaitė R, Grootaert C, Van Camp J, Šarkinas A, Liaudanskas M, Žvikas V, Rimantas Venskutonis P (2020) Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of the extracts isolated from the pomace of rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.). *Int Food Res J* **136**. doi:10.1016/j.foodres.2020.109310

Bonyadi N, Dolatkah N, Salekzamani Y, Hashemian M (2022) Effect of berry-based supplements and food on cognitive function: a systematic review. *Sci Rep* **12**, 3239. doi: 10.1038/s41598-022-07302-4.

Cigler V (2019) Usporedba spektrofotometrijske metode s metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom ICP MS za određivanje cinka u sjemenoj plazmi (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Cressey P, Reeve J (2019) Metabolism of cyanogenic glycosides: A review. *Food Chem Toxicol* **125**, 225-232. doi: 10.1016/j.fct.2019.01.002

Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352. doi:10.3390/molecules15107313

Drvodelić D (2010) Značajke sjemena i rasadnička proizvodnja nekih vrsta roda *Sorbus* L. (doktorski rad), Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Drvodelić D, Jemrić T, Oršanić M (2019) Jarebika (*Sorbus aucuparia* L.): važnost, uzgoj i uporaba. Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Gil-Izquierdo A, Mellethin A (2001) Identification and quantitation of flavonols in rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.) juice. *Eur Food Res Technol* **213**, 12-17.

Griffiths HR (2016) Antioxidants: Characterization and Analysis. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F.), Academic Press, Cambridge, str. 221-226.

Häkkinen SH, Törrönen AR (2000) Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res Int* **33**, 517–524. doi:10.1016/S0963-9969(00)00086-7

Herman J (1971) Šumarska dendrologija. Stanbiro, Zagreb, 470 str.

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* **53**, 1841-1856. doi:10.1021/jf030723c

Hukkanen AT, Pölönen SS, Kärenlampi SO, Kokko HI (2006). Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *J Agric Food Chem* **54**, 112–119. doi:10.1021/jf051697g

Kampuss K, Kampuse S, Berņa E, Kruma Z, Krasnova I, Drudze I (2009) Biochemical composition and antiradical activity of rowanberry (*Sorbus* L.) cultivars and hybrids with different Rosaceae L. cultivars. *J Agron* **12**, 59-65.

Kylli P, Nohynek L, Puupponen-Pimia R, Westerlund-Wikstrom B, McDougall G, Stewart D (2010) Rowanberry phenolics: Compositional analysis and bioactivities. *J Agric Food Chem* **58**, 11985–11992. doi:10.1021/jf102739v

Kovačec L (2020). Antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje eteričnih ulja i ekstrakata mediteranskog bilja (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kowalska G (2012) The Safety Assessment of Toxic Metals in Commonly Used Herbs, Spices, Tea, and Coffee in Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **18**, 5779. doi: 10.3390/ijerph18115779

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra, N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* **4**, 118–126. doi:10.4103/0973-7847.70902

Mihalić V (2013) Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) i brusnica (*Vaccinium macrocarpon* L.) kao potencijalni izvor antioksidansa (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Mlček J, Rop O, Jurikova T, Sochor J, Fiserá M, Balla S, Baron M, Hrabe J (2014) Bioactive compounds in sweet rowanberry fruits of interspecific Rowan crosses. *Cent Eur J Biol* **9**, 1078-1086. doi: 10.2478/s11535-014-0336-8

Mullen W, Stewart AJ, Lean MEJ, Gardner P, Duthie GG, Crozier A (2002) Effect of freezing and storage on Phenolic, Ellagitannins, Flavonoids, and Antioxidant Capacity of Red Raspberries. *J Agric Food Chem* **50**, 5197-5201. doi:10.1021/jf020141f

Nielsen SS (2010) Determination of Moisture Content. In: Nielsen S.S. (eds) Food Analysis Laboratory Manual. Food Science Texts Series. Springer, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4419-1463-7_3

Nile, SH, Park SW (2014) Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* **30**: 134-144. doi: 10.1016/j.nut.2013.04.007.

Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta S K, Levine M (2003) Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* **22**, 18–35. doi: 10.1080/07315724.2003.10719272

Poljak I, Vahčić N, Liber Z, Tumpa K, Pintar V, Zegnal I, Vidaković A, Valković B, Kajba D, Idžojtić M (2021) Morphological and Chemical Diversity and Antioxidant Capacity of the Service Tree (*Sorbus domestica* L.) Fruits from Two Eco-Geographical Regions. *Plants* **10**, 1691. doi: 10.3390/plants10081691

Pregiban K (2017) Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti (završni rad), Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

- Preston CD, Hill MO (1997) The geographical relationships of British and Irish vascular plants. *Bot J Linn Soc* **124**, 1-120. doi:10.1111/j.1095-8339.1997.tb01785.x
- Rameau JC, Mansion D, Dumé G (1989) Flore Forestière Française. Guide écologique illustré. Institut pour le développement forestier, Paris, France.
- Raspe O, Findlay C, Jacquemart A (2000) *Sorbus aucuparia* L. *J Ecol* **88**, 910-930. <http://www.jstor.org/stable/2648347>. Preuzeto 24.5.2021.
- Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**, 233–241. doi:10.1016/S0140-6736(00)02490-9
- Regnell M, Gaillard MJ, Bartholin TS, Karsten P (1995) Reconstruction of environment and history of plant use during the late Mesolithic (Ertebølle culture) at the inland settlement of Bökeberg III, southern Sweden. *Vegetation History and Archaeobotany* **4**:67–91.
- Rop O, Miček J, Jurikova T, Valsikova M (2012) Antioxidant properties of interspecific crosses of rowan (*Sorbus*). Sborník z mezinárodní vědecké konference „Horticulture Nitra 2012“, SPU Nitra, 13. – 14. 11. 2012, str. 193-197.
- Sarv V, Venskutonis PR, Bhat R (2020) The *Sorbus* spp. - Underutilised Plants for Foods and Nutraceuticals: Review on Polyphenolic Phytochemicals and Antioxidant Potential. *Antioxidant*. **9**, 813. doi:10.3390/antiox9090813
- Shabanaj K (2014) Određivanje parametara kvalitete, udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti sokova od aronije (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Shakeri A, Soheili V, Karimi M, Hosseininia SA, Bazzaz BSF (2018) Biological activities of three natural plant pigments and their health benefits. *J. Food Meas. Charact.* **12**, 356–361. doi:10.1007/s11694-017-9647-6
- Shotyk W (2020) Trace elements in wild berries from reclaimed lands: Biomonitoring of contamination by atmospheric dust. *Ecol Indic* **110**, 105960. doi:10.1016/j.ecolind.2019.105960

Sołtys A, Galanty A, Podolak I (2020) Ethnopharmacologically important but underestimated genus *Sorbus*: a comprehensive review. *Phytochem Rev* **19**, 491–526. doi:10.1007/s11101-020-09674-9

Soče M (2019) Antioksidacijska aktivnost divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) (diplomski rad) Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Szajdek A, Borowska EJ (2008) Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods Hum Nutr* **63**, 147–156. doi:10.1007/s11130-008-0097-5

Šavikin KP, Zdunić GM, Krstić-Milošević DB, Šircelj HJ, Stešević DD, Pljevljakušić DS (2017) *Sorbus aucuparia* and *Sorbus aria* as a Source of Antioxidant Phenolics, Tocopherols, and Pigments. *Chem Biodivers* **14**. doi:10.1002/cbdv.201700329

Termentzi A, Alexiou P, Demopoulos VJ, Kokkalou E. (2008) The aldose reductase inhibitory capacity of *Sorbus domestica* fruit extracts depends on their phenolic content and may be useful for the control of diabetic complications. *Pharmazie* **63**, 693-696.

Yang CS, Ho CT, Zhang J, Wan X, Zhang K, Lim J (2018) Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. *J Agric Food Chem* **66**, 3063–3068. doi:10.1021/acs.jafc.7b05830

Vahčić N, Hruškar M, Marković K (2008) Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane (interna skripta), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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. doi: 10.3390/molecules23102593.

7. PRILOZI

Prilog 1. Oznake uzoraka i metode određivanja za pojedini uzorak

Tablica 20. Princip označavanja uzoraka i popis metoda određivanja za svaki uzorak.

Regija	Lokalitet	Oznaka	Osnovni kemijski sastav						Antioksidativni kapacitet			Sadržaj minerala
			Voda	Pepeo	Proteini	Masti	Šećeri	Celuloza	Fenoli	DPPH	FRAP	
VELEBIT	Duliba 1	D1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Duliba 2	D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
	Duliba 3	D3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
	Duliba 4	D4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Jelovac 1	JE1	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/
	Jelovac 2	JE2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
	Jelovac 3	JE3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
	Mali Alan 1	MA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mali Alan 2	MA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mali Alan 3	MA3	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/
	Mali Alan 4	MA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mali Alan 5	MA5	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+
Mali Alan 6	MA6	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	

Tablica 20. Princip označavanja uzoraka i popis metoda određivanja za svaki uzorak – nastavak II.

Crni Lug 4	CL4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crni Lug 5	CL5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crni Lug 6	CL6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jasenak 1	JA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Jasenak 2	JA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Jasenak 3	JA3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Jasenak 4	JA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jasenak 5	JA5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Mala Javornica 1	MJ1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Mala Javornica 2	MJ2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Mala Javornica 3	MJ3	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/
Mala Javornica 4	MJ4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mala Javornica 5	MJ5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Mala Javornica 6	MJ6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Miškovica 1	M1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Miškovica 2	M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Miškovica 3	M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Mrzla Vodica 7	MV7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mrzla Vodica 8	MV8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mrzla Vodica 9	MV9	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/

Prilog 2. Temperaturni program razgradnje uzoraka te uvjeti rada ICP-MS

Tablica 21. Temperaturni program za razgradnju bioloških uzoraka u mikrovalnom visokotlačnom reaktoru UltraCLAVE IV (Milestone, S.r.l., Italija).

	T (min:s)	E (W)	T1 (°C)	T2 (°C)	p (bar)
1.	3:30	700	70	70	100
2.	15	1000	180	70	100
3.	10	1000	250	70	140
4.	30	1000	250	70	140
5.	40	0	30	70	20

Tablica 22. Uvjeti rada ICP-MS uređaja Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Japan).

RF snaga	1550 W		
RF faktor	1.68 V		
Dubina uzorkovanja u plazmi plamenika	7,5 mm		
Horizontalni položaj plazma plamenika	0,3 mm		
Vertikalni položaj plazma plamenika	-0,4 mm		
Brzina pumpe raspršivača	0,08 rps		
Protok plazma plina	15 L/min		
Protok plina za razrjeđenje	0,1 L/min		
Protok plina nosioca	1,03 L/min		
Tip raspršivača	<i>MicroMist</i> , kvarc		
Tip komore za raspršivanje	<i>Scott</i> (kvarc), hladena na 2°C		
Konusi od Ni, promjer otvora	1 mm <i>Sampler cone</i> ; 0,4 mm <i>Skimmer cone</i>		
Dvostruko nabijeni ioni i oksidi	$^{140}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^+ < 1,5\%$; $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+/^{140}\text{Ce}^+ < 1,5\%$		
Kolizijski / reakcijski plin	bez plina	helij	vodik
Protok plina	/	4,1 mL/min	4,2 mL/min
Napon ekstrakcijske leće 1	0 V	0,5 V	0,7 V
Napon ekstrakcijske leće 2	-150 V	-140 V	-130 V
Mjereni izotopi analita	^{202}Hg	^{11}B , ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{31}P , ^{39}K , ^{43}Ca , ^{51}V , ^{55}Mn , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{68}Zn , ^{75}As , ^{88}Sr , ^{95}Mo , ^{114}Cd , ^{121}Sb , ^{133}Cs , ^{138}Ba , ^{208}Pb	^{54}Fe , ^{78}Se

Prilog 3. Nadzor kakvoće mjerenja za ICP-MS uređaj.

Tablica 23. Granice detekcije metode (MDLs) za elemente određivane u razorenim uzorcima bobica jarebike metodom ICP-MS na uređaju Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Japan) i usporedba vrijednosti certificiranih i dobivenih vrijednosti koncentracija elemenata (izraženo u mg/kg) u analiziranim standardnim referentnim materijalima SRM-1570a i SRM-1573a (NIST, SAD).

Element (mg/kg)	MDL	SRM 1570a lišće špinata		SRM 1573a lišće rajčice	
		Certificirana vrijednost	Dobivena vrijednost	Certificirana vrijednost	Dobivena vrijednost
As	0,001	0,068 ± 0,012	0,064 ± 0,003	0,1126 ± 0,0024	0,131 ± 0,006
B	0,52	37,7 ± 1,2	38,8 ± 0,2	33,13 ± 0,42	30,55 ± 1,35
Ba	0,002	/	7,649 ± 0,347	63 ^a	63,424 ± 2,700
Ca	2,99	15270 ± 410	14544 ± 564	50450 ± 550	50770 ± 2029
Cd	0,0002	2,89 ± 0,07	2,884 ± 0,093	1,517 ± 0,027	1,553 ± 0,062
Co	0,0003	0,39 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,5773 ± 0,0071	0,5929 ± 0,0248
Cr	0,005	/	1,77 ± 0,07	1,988 ± 0,034	1,997 ± 0,109
Cs	0,0005	/	0,022 ± 0,002	0,053 ^a	0,053 ± 0,002
Cu	0,04	12,2 ± 0,6	12,3 ± 0,5	4,7 ± 0,14	4,7 ± 0,20
Fe	0,44	/	324 ± 9,7	367,5 ± 4,3	461,5 ± 14,2
K	12,8	29030 ± 520	28528 ± 935	26760 ± 480	27681 ± 1124
Mg	0,12	8900 ^a	9154 ± 424	12000 ^a	11910 ± 499
Mn	0,004	75,9 ± 1,9	76,5 ± 3,3	246,3 ± 7,1	248,0 ± 10,3
Mo	0,002	/	0,37 ± 0,02	0,46 ^a	0,44 ± 0,03
Na	6,12	18210 ± 230	18318 ± 826	136,1 ± 3,7	138,9 ± 5,0
Ni	0,009	2,14 ± 0,10	2,19 ± 0,09	1,582 ± 0,041	1,711 ± 0,078
P	3,80	5180 ± 11	5185 ± 179	2161 ± 28	2248 ± 65
Pb	0,0014	0,2 ^a	0,200 ± 0,006	/	0,637 ± 0,019
Sb	0,0002	/	0,0107 ± 0,0004	0,0619 ± 0,0032	0,062 ± 0,002
Se	0,002	0,117 ± 0,009	0,111 ± 0,003	0,0543 ± 0,0020	0,0568 ± 0,0056
Sr	0,001	55,54 ± 0,50	55,25 ± 1,73	85 ^a	86 ± 3
V	0,002	0,568 ± 0,017	0,595 ± 0,027	0,835 ± 0,034	0,830 ± 0,038
Zn	0,05	82 ± 3	82 ± 2	30,94 ± 0,55	35,59 ± 0,22

Rezultati su prikazani kao $x \pm U_{95\%}(x)$ za certificiranu vrijednost i $x \pm SD$ za dobivenu vrijednost, gdje x označava srednju vrijednost, $U_{95\%}(x)$ proširenu nesigurnost za certificiranu vrijednost (95% interval) i SD standardnu devijaciju ($n = 3$).

^a Informativna vrijednost

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, KARLA KRAGIĆ, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kragić', is written above a horizontal line.

Vlastoručni potpis