Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća

Jakobek, Lidija

Doctoral thesis / Disertacija

2007

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:469665

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠTA J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

Lidija Jakobek

KARAKTERIZACIJA POLIFENOLA U VOĆU I NJIHOV UTJECAJ NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST VOĆA

Doktorski rad

Osijek, 19. prosinac 2007.

UDK (univerzalna decimalna klasifikacija):

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Institucija: Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Voditelj: dr. sc. Marijan Šeruga, red. prof.

Broj stranica: 126

Broj slika: 41

Broj tablica: 15

Broj priloga: 9

Broj literaturnih referenci: 173

Datum obrane: 19. prosinac 2007.

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Akademkinja Vlasta Piližota	predsjednik
2. Dr. sc. Marijan Šeruga, red. prof.	član-voditelj
3. Dr. sc. Nada Vahčić, red. prof.	član
4. Dr. sc. Drago Šubarić, red. prof.	zamjena člana

Rad je pohranjen u:

Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku, Kuhačeva 18

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb,

Sveučilištu u Rijeci, Riječke revolucije 7,

Sveučilištu u Splitu, Livanjska 5

Tema rada prihvaćena je na IX (devetoj) redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku održanoj 17. srpnja 2007. godine.

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA POLIFENOLA U VOĆU I NJIHOV UTJECAJ NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST VOĆA

U ovom radu je, primjenom HPLC i spektroskopskih metoda, provedena karakterizacija polifenolnih spojeva: *antocijanina, flavonola (kvercetin, miricetin, kemferol), flavanola ((+)-katehin, (-)-epikatehin), hidroksibenzojevih (p-hidroksibenzojeva, elaginska), hidroksicimetnih kiselina (p-kumarinska, kafeinska, ferulična);* koji su prisutni u borovnici, bobicama bazge, kupini, malini, višnji, trešnji, crnom i crvenom ribizu, jagodi i aroniji. Antioksidacijska aktivnost voća određena je primjenom DPPH i ABTS metode, a utjecaj polifenola na antioksidacijsku aktivnost voća ispitan je traženjem korelacije između količine polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća.

Rezultati analiza pokazali su da se u ispitivanom voću nalaze vrlo velike količine ukupnih polifenola (od 1763 mg kg^{-1} u malini do 7194 mg kg^{-1} u aroniji) od kojih su najznačajniji antocijanini (od 169 mg kg^{-1}u jagodi do 4069 mg kg^{-1} u borovnici). Sadržaj flavonola (od 4 mg kg^{-1} u malinama do 183 mg kg^{-1} u borovnici), flavanola (0-256 mg kg^{-1}) hidroksicimetnih (12-92 mg kg^{-1}) te hidroksibenzojevih kiselina (0-121 mg kg^{-1}) znatno je manji. Iako se voće značajno razlikuje po količini, vrsti i rasprostranjenosti polifenola, aronija, borovnica, bobice bazge i crni ribiz mogu se izdvojiti po vrlo velikoj količini polifenolnih spojeva i vrlo visokoj antioksidacijskoj aktivnosti te bi ove vrste voća mogle poslužiti kao dobra sirovina u proizvodnji funkcionalne hrane. Visoke korelacije između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih antocijanina, ukupnih flavonola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina te pojedinih polifenolnih spojeva (kafeinska kiselina, derivati cijanidina, *p*-kumarinska kiselina i kvercetin) pokazuju da ovi polifenolni spojevi imaju snažan utjecaj na ukupnu antioksidacijsku aktivnost voća, dok ostali istraživani polifenoli nisu značajni za ukupnu antioksidacijsku aktivnost. Ovi rezultati pridonose boljem objašnjenju antioksidacijske aktivnosti polifenola iz voća koji su bitni za pozitivno djelovanje voća u ljudskom organizmu.

Ključne riječi: polifenoli, antocijanini, flavonoli, fenolne kiseline, flavanoli, voće, antioksidacijska aktivnost, HPLC

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLS IN FRUITS AND THEIR INFLUENCE ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FRUITS

In this study, the characterization of polyphenolic compounds: *anthocyanins, flavonols (quercetin myricetin, kaempferol), flavanols ((+)-catechin, (-)-epicatechin), hydroxybenzoic acids (p-hydroxybenzoic, ellagic) and hydroxycinnamic acids (p-coumaric, caffeic, ferulic;* which are present in blueberry, elderberry, blackberry, red raspberry, sour cherry, sweet cherry, black currant, red currant, strawberry and chokeberry was carried out by using HPLC and spectroscopic methods. DPPH and ABTS assays were used to determine antioxidant activity of fruits. The correlation between the amount of polyphenols and antioxidant activity of fruits was investigated in order to examine the influence of polyphenols on antioxidant activity.

The results showed that investigated fruits contained high amounts of polyphenols (from 1763 mg kg^{-1} in red raspberry to 7194 mg kg^{-1} in chokeberry) among which anthocyanins were the most important ones (from 169 mg kg^{-1} in strawberry to 4069 mg kg^{-1} in blueberry). The amount of flavonols (from 4 mg kg^{-1} in red raspberries to 183 mg kg^{-1} in blueberries), flavanols (0-256 mg kg^{-1}), hydroxycinnamic (12-92 mg kg^{-1}) and hydroxybenzoic acids (0-121 mg kg^{-1}) was considerably lower. Fruits differ greatly in the amount, species and distribution of polyphenols but chokeberry, blueberry, elderberry and black currant stand out in high amounts of polyphenolic compounds and in strong antioxidant activity and could be used as a good raw material in production of functional foods. High correlations between antioxidant activity and amount of total polyphenols, total anthocyanins, total flavonols, total hydroxycinnamic acids, or the amount of individual polyphenolic compounds (caffeic acid, cyanidin derivatives, *p*-coumaric acid and quercetin) showed that these polyphenols have strong influence on total antioxidant activity of fruits whereas other investigated polyphenols were not significant for total antioxidant activity of fruits. Overall results are a contribution to better understanding of antioxidant activity of fruit's polyphenols, the compounds that are important for positive action of fruits in human organism.

Key words: polyphenols, anthocyanins, flavonols, phenolic acids, flavanols, fruits, antioxidant activity, HPLC

Zahvaljujem se dr. sc. Marijanu Šerugi, red. prof. na stručnoj pomoći i vodstvu pri izradi doktorskog rada. Posebno se zahvaljujem roditeljima na beskrajnoj podršci i pomoći koju su mi pružali tijekom cijelog života.

SADRŽAJ:

1. **UVOD**…… 1

2. TEORIJSKI DIO……..... 3

2.1. Biljni polifenoli…….. 3

2.2. Kemijska struktura flavonoida i fenolnih kiselina…….. 4

2.2.1. Flavonoidi..... 4

2.2.1.1. Antocijanini……..... 6

2.2.1.2. Flavonoli……..... 8

2.2.1.3. Flavanoli……..... 8

2.2.2. Fenolne kiseline…….....…. 9

2.2.2.1. Hidroksibenzojeve kiseline…….. 9

2.2.2.2. Hidroksicimetne kiseline……. 10

2.3. Uloga polifenola u biljkama…….. 11

2.4. Značaj i upotreba polifenola……. 11

2.5. Izolacija flavonoida i fenolnih kiselina iz biljnih materijala……. 12

2.6. Metode analize flavonoida i fenolnih kiselina…….. 14

2.6.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)..... 15

2.6.2. Određivanje polifenola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)…….. 17

2.7. Voće kao izvor polifenola…….. 17

2.7.1. Tamno obojeno voće…..…… 17

2.7.2. Rasprostranjenost antocijanina, flavonola, flavanola i fenolnih kiselina u voću.....…… 22

2.8. Antioksidansi u hrani i njihovo antioksidacijsko djelovanje..... 26

2.8.1. Nastajanje slobodnih radikala i oštećenje tkiva djelovanjem slobodnih radikala……..... 26

2.8.2. Antioksidativni obrambeni sustav i antioksidansi……. 28

2.8.3. Interakcije između pojedinih antioksidansa…..…… 30

2.8.4. Posljedice oksidativnih oštećenja……... 31

2.8.5. Oksidativni stres i bolesti……. 31

2.8.6. Glavne reakcije autooksidacije lipida……. 32

2.9. Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti……... 33

2.9.1. Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti i njihovi reakcijski mehanizmi…… 34

2.9.2. Metode hvatanja slobodnih radikala (engl. radical scavenging methods 35
2.9.2.1.DPPH metoda…… 36
2.9.2.2.TEAC (ABTS) metoda…… 37
2.10. Polifenolni spojevi kao antioksidansi…….. 37
2.11. Antioksidacijska aktivnost voća…… 39
2.12. Apsorpcija polifenola iz voća u ljudskom organizmu…… 41
2.13. Osobine voća bitne za zdravlje ljudi……. 43
3. EKSPERIMENTALNI DIO…… 45
3.1. Zadatak…… 45
3.2. Materijal i metode…… 46
3.2.1. Uzorci voća……. 46
3.2.2. Kemikalije…… 46
3.2.3. Priprema ekstrakata voća za analizu ukupnih antocijanina, ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti……... 47
3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola…….. 47
3.2.5. Određivanje ukupnih antocijanina pH-diferencijalnom metodom.. 48
3.2.6. Određivanje polifenola HPLC metodom…… 48
3.2.6.1. Priprema voća za analizu antocijanina pomoću HPLC metode……. 49
3.2.6.2. Ekstrakcija i hidroliza flavonola…….. 49
3.2.6.3. Ekstrakcija i hidroliza flavanola i fenolnih kiselina…….. 50
3.2.6.4. HPLC analitički sustav……. 50
3.2.6.5. HPLC metoda za analizu antocijanina…….. 51
3.2.6.6. HPLC metode za analizu flavonola, flavanola i fenolnih kiselina……. 51
3.2.6.7. Validacija HPLC metoda……. 52
3.2.6.8. Identifikacija i kvantifikacija polifenola…….. 54
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti……. 55
3.2.7.1. DPPH metoda……... 55
3.2.7.2. ABTS metoda……. 56
3.3. Statistička analiza…… 57
4. REZULTATI…… 58
4.1. Ukupni polifenoli i ukupni antocijanini u voću…… 58

4.2. Antocijanini, flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću……... 58
4.2.1. Validacija HPLC metoda i identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva u voću……. 58
4.2.2. Antocijanini u voću…… 65
4.2.3. Flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću……. 69
4.3. Rasprostranjenost pojedinih polifenola u voću…….. 77
4.4. Antioksidacijska aktivnost voća…….. 80
4.5. Korelacija između sadržaja i vrste polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća……. 82
5. RASPRAVA…… 88
5.1. Ukupni polifenoli i ukupni antocijanini u voću…… 88
5.2. Antocijanini, flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću……... 89
5.2.1. Validacija HPLC metoda i identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva u voću……. 89
5.2.2. Antocijanini u voću…… 90
5.2.3. Flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću……. 93
5.3. Rasprostranjenost pojedinih polifenola u voću…….. 95
5.3.1. Sličnosti i razlike u rasprostranjenosti polifenolnih spojeva u voću……..... 96
5.4. Voće kao funkcionalna hrana……..……. 97
5.5. Antioksidacijska aktivnost voća……. 98
5.6. Korelacija između sadržaja i vrste polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća…… 99
5.5.1. Voće s najvećom antioksidacijskom aktivnošću i najvećom količinom polifenola……..…….. 104
6. ZAKLJUČCI…… 105
7. LITERATURA……..……. 108
8. PRILOZI 122

Popis oznaka, kratica i simbola:

HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High-Performance Liquid Chromatography)
RP-HPLC	Reverzno fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography)
PDA	PDA detektor (engl. Photo Dioda Array Detector)
LC	Tekućinska kromatografija (engl. Liquid Chromatography)
GC	Plinska kromatografija (engl. Gas Chromatography)
UV/Vis	Ultra ljubičasta / vidljiva spektroskopija (engl. Ultra Violet / Visible Spectroscopy)
FTIR	FTIR spektroskopija (engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
MS	Masena spektrometrija (engl. Mass Spectrometry)
NMR	Nuklearna magnetska rezonancija (engl. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
CE	Kapilarna elektroforeza (engl. Capillary Electrophoresis)
CV	Ciklička voltametrija (engl. Cyclic Voltammetry)
SWV	Pravokutno-valna voltametrija (engl. Square-Wave Voltammetry)
FIA	(engl. Flow Injection Analysis)
TEAC	(engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
FRAP	(engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)
ORAC	(engl. Oxygen Radical Apsorbance Capacity)
TOSC	(engl. Total Oxidant Scavenging Capacity)
TRAP	(engl. Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)
AAPH	2,2'-azinobis(2-amidinopropan) hidroklorid
UP	Količina ukupnih polifenola
GAE	Ekvivalent galne kiseline (engl. Galic Acid Equivalent)
UA	Količina ukupnih antocijanina
CGE	Ekvivalent cijanidin-3-glukozida (engl. Cyanidin-3-glucoside Equivalent)
FW	Količina izražena na masu svježeg voća (engl. Fresh Weight)
LDL	Lipoprotein niske gustoće (engl. Low Density Lipoprotein)
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (engl. Deoxyribonucleic Acid)
MW	Molekularna težina (engl. Molecular Weight)

1. UVOD

Dosadašnja istraživanja pokazala su da se u voću nalaze brojni esencijalni mikronutrienti kao što su vitamini i minerali. Osim ovih spojeva, voće predstavlja bogat izvor spojeva koji nisu esencijalni za ljudsko zdravlje, ali pokazuju određeno biološko djelovanje u ljudskom organizmu. U takve spojeve spadaju različiti polifenolni spojevi (flavonoidi, fenolne kiseline) (1-5). Količinom polifenola se između različitih vrsta voća posebno ističe tamno obojeno bobičasto, jagodasto i koštuničavo voće (4,6-10), a redovita konzumacija tog voća i njihovih proizvoda povezana je sa znatnim smanjenjem rizika od nastanka različitih bolesti krvožilnog sustava i malignih bolesti (11-16). Takav pozitivan utjecaj voća na ljudsko zdravlje pripisuje se, između ostalog, sadržaju polifenolnih spojeva prisutnih u voću (12-14).

Polifenoli su spojevi koji imaju snažnu antioksidacijsku aktivnost *in vitro*, ali i *in vivo* djelujući kao hvatači slobodnih radikala (17-19) te vezujući metalne ione koji su prekursori slobodnih radikala., a osim toga, pokazuju razna fiziološka djelovanja - antiupalno, antialergijsko te antikancerogeno djelovanje (20-25). Pretpostavlja se da je za pozitivno djelovanje polifenola odgovorna njihova antioksidacijska aktivnost (26,27). Poznato je i da se polifenoli apsorbiraju u ljudskom organizmu, ali mehanizmi apsorpcije nisu do kraja razjašnjeni. Antocijanini se apsorbiraju u formi glikozida, ali u znatno manjoj količini od unesene (28-31). Pojedini flavonoli se apsorbiraju u formi glikozida i u formi aglikona (32-36), a dokazana je i apsorpcija fenolnih kiselina (37-39). No do sada još nije potpuno razjašnjena njihova biološka raspoloživost (*engl. bioavailability*), način djelovanja u ljudskom organizmu kao ni mehanizam antioksidacijskog djelovanja te moguće sinergističko ili prooksidativno djelovanje. Stoga postoji veliki interes za istraživanja polifenolnih spojeva.

U voću su polifenoli prisutni u velikim količinama, a značajno pridonose antioksidacijskoj aktivnosti voća (18,40-42). Podaci o količini i vrsti polifenola u voću do sada objavljeni u literaturi, nepotpuni su i nedovoljni, a ključni su za istraživanja utjecaja unosa polifenola prehranom i za objašnjenje veze između unosa polifenola i smanjenja rizika od nastanka nekih bolesti. Ovakva istraživanja pomogla bi da se razjasni uloga polifenola u ljudskom organizmu, a omogućila bi proizvodnju funkcionalne hrane ili dodataka prehrani koji bi imali veće biološko djelovanje (17, 43-47). Istraživanja utjecaja polifenola na antioksidacijsku aktivnost voća pomogla bi da se objasni mehanizam antioksidacijskog djelovanja polifenola unutar kompleksnog okruženja kao što je voće.

U ovom radu provedena su istraživanja kojima se dodatno može razjasniti polifenolni profil voća te je istraženo kakav utjecaj imaju polifenoli voća na antioksidacijsku aktivnost voća. Zbog toga su validirane dvije HPLC metode za određivanje antioksidativnih polifenolnih spojeva

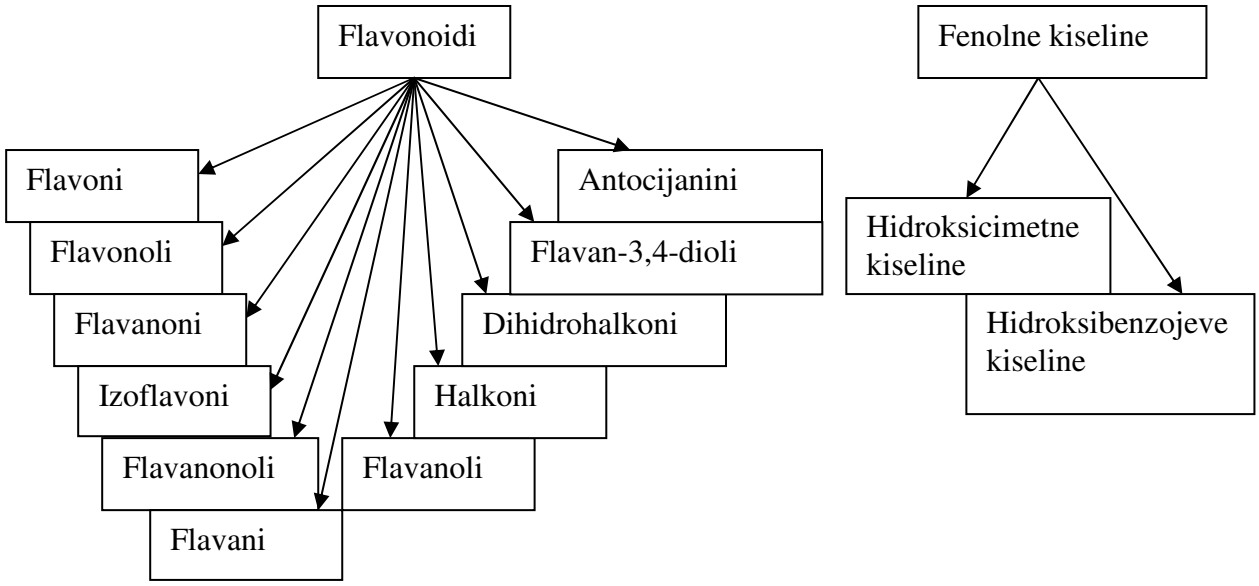
[antocijanina, flavonola (kvercetin, miricetin, kemferol), flavanola [(+)-katehin, (-)-epikatehin], hidroksibenzojevih (*p*-hidroksibenzojeva, elaginska), hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinska, kafeinska, ferulična)] te je određena količina i vrsta polifenola prisutnih u deset vrsta tamno obojenog voća (borovnica, aronija, kupina, jagoda, malina, trešnja, višnja, plodovi bazge, crni i crveni ribiz). Dodatno je količina polifenola određena primjenom spektroskopskih metoda, a antioksidacijska aktivnost voća procijenjena je hvatanjem sintetičkih slobodnih $DPPH^{\bullet}$ i $ABTS^{\bullet+}$ radikala. Korelacijom između antioksidacijske aktivnosti voća i količine pojedinih polifenola utvrđeno je koji polifenoli imaju utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ispitivanog voća. Ovi rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju antioksidacijske aktivnosti voća i utjecaja polifenolnih spojeva na antioksidacijsku aktivnost. Osim toga, podaci o sadržaju i distribuciji polifenola u voću trebali bi omogućiti odabir voća koje bi moglo poslužiti kao sirovina za proizvodnju funkcionalne hrane obogaćene polifenolnim antioksidansima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biljni polifenoli

Polifenolne tvari čine jednu od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina spojeva u biljkama, kojoj pripada više od 8000 različitih spojeva. Oni su proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka te ih se smatra tvarima koje nisu esencijalne za ljudski organizam, suprotno od npr. vitamina koji su esencijalni spojevi. Neki polifenoli kao što su jednostavni fenoli, benzokinoni, kumarini, kromoni, naftokinoni, ksantoni, fenolne kiseline (hidroksicimetne, hidroksibenzojeve), stilbeni ili flavonoidi jednostavne su molekule, no u polifenole se ubrajaju i neke puno kompleksnije molekule s velikom molekularnom masom kao što su npr. tanini ili lignini (20,48,49).

Najvažnija i najveća skupina polifenola su f**lavonoidi** s više od 5000 do sada poznatih spojeva (43,44). Oni su podijeljeni na nekoliko podgrupa koje prikazuje slika 1. Pojavljuju se u skoro svim dijelovima biljaka, ali su po količini različito rasprostranjeni u različitim dijelovima biljnih organa. Ovu raznovrsnost uglavnom kontroliraju geni biljke, ali na nju imaju utjecaj i drugi čimbenici kao što su stadij zrelosti biljke, klima i način uzgoja (20). U biljkama su široko rasprostranjene i dominantne tri podgrupe flavonoida. To su flavonoli, antocijanini i flavan-3-oli (flavanoli) (20). Osim flavonoida, važna skupina biljnih polifenola su i **fenolne kiseline**, posebno derivati cimetne i benzojeve kiseline (slika 1) (49).

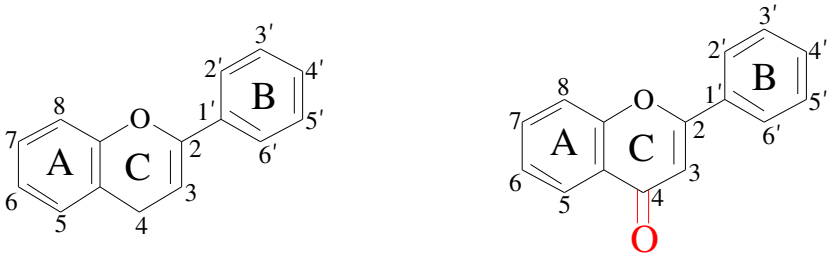


Slika 1. Glavne skupine biljnih flavonoida i fenolnih kiselina (20,49)

2.2. Kemijska struktura flavonoida i fenolnih kiselina

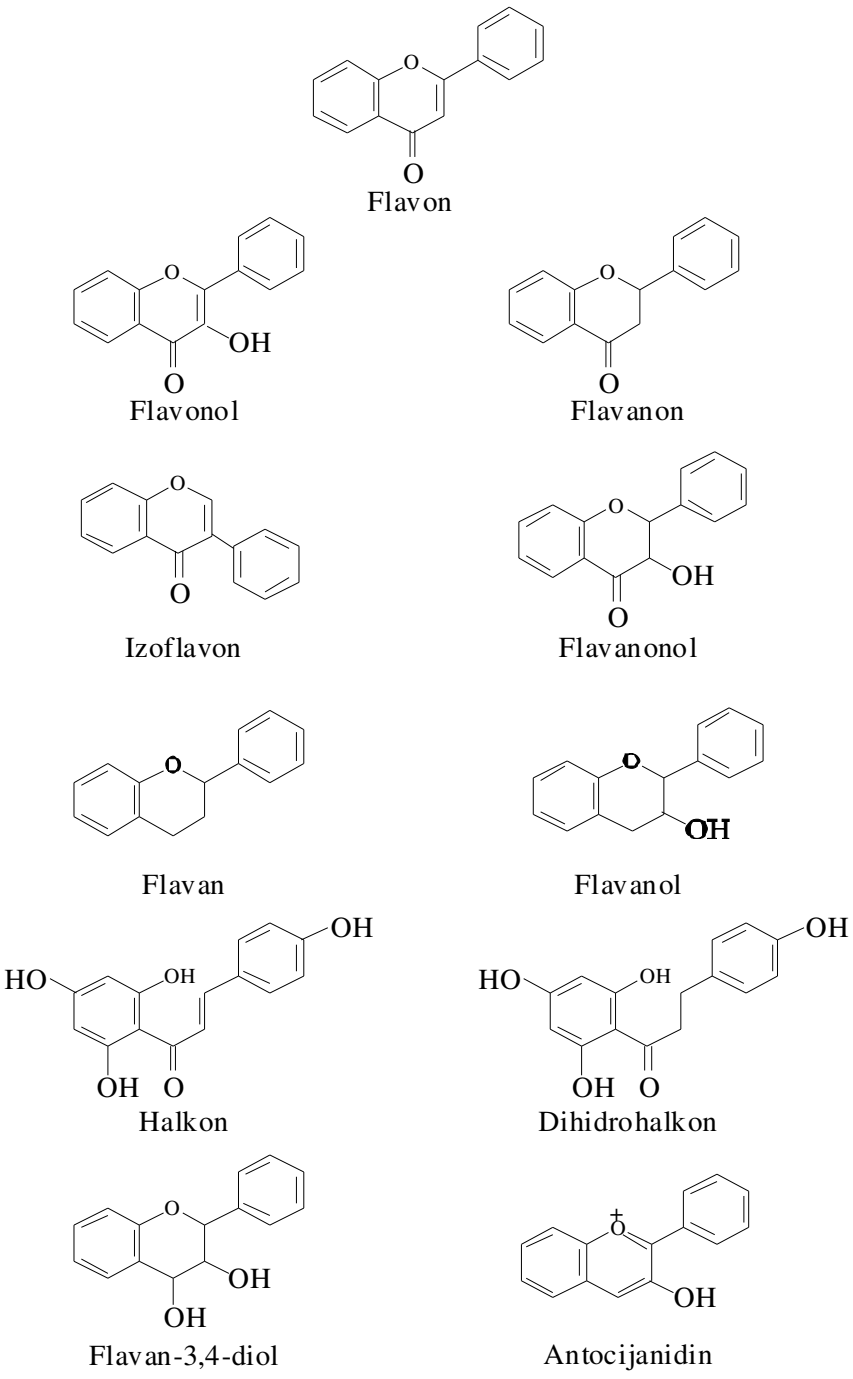
2.2.1. Flavonoidi

Struktura flavonoida temelji se na flavonoidnoj jezgri (slika 2) koja se sastoji od tri fenolna prstena (A, B i C prsten). Benzenski prsten A kondenziran je s tročlanim alifatskim nizom koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B. Za flavonoide koji imaju vezanu karbonilnu skupinu na C-4 atomu prstena C često se koristi izraz 4-okso-flavonoidi (slika 2). U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s molekulama šećera što pridonosi velikoj raznolikosti i velikom broju tih spojeva. Vezanje šećera na flavonoide povećava polarnost molekule što je potrebno za pohranjivanje tih spojeva u vakuolama biljnih stanica. Glikozilacija se najčešće događa na poziciji C-3, ili rijeđe na poziciji C-7. Šećer koji se najčešće nalazi vezan na molekulama flavonoida je glukoza, ali glikozilacija se događa i s arabinozom, galaktozom, glukoramnozom, ramnozom i ksilozom. Ovisno o stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije prstena C, nastaju različite podgrupe flavonoida: flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoli, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli i antocijanidini, koje prikazuje slika 3. Velika raznolikost flavonoida može se, također, uočiti unutar navedenih podgrupa flavonoida jer se za osnovnu jezgru mogu vezati različite skupine i u različitom broju što dovodi do mogućnosti nastanka velikog broja različitih spojeva. Supstitucijske skupine koje se nalaze na osnovnoj jezgri su različiti šećeri, hidroksilna skupina, metoksi skupina. (20,50).



Flavan jezgra 4-okso-flavonoid jezgra

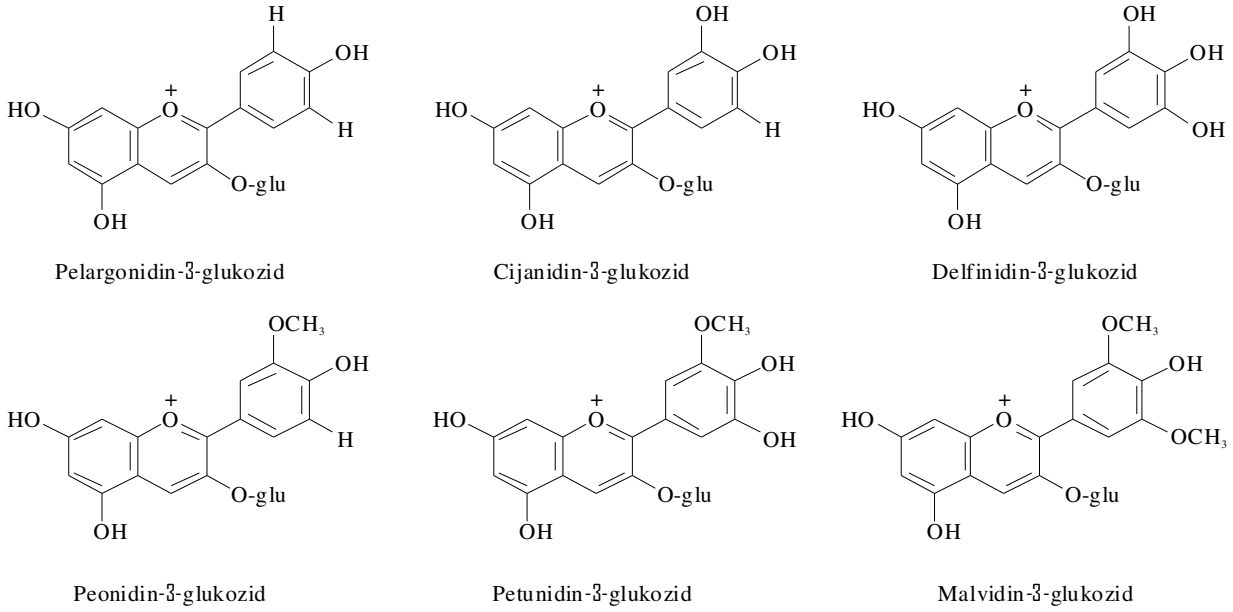
Slika 2. Osnovna kemijska struktura flavonoida (50)



Slika 3. Osnovna struktura glavnih podgrupa flavonoida (20)

2.2.1.1. Antocijanini

Antocijanini (*grčki: anthos-cvijeće, kyanos-plav*) pripadaju skupini flavonoida. Oni su biljni pigmenti topivi u vodi, a cvijeću, voću i povrću daju plavu, purpurnu i crvenu boju. Prvi ih je izolirao Marguart 1835. godine (51), a po svom kemijskom sastavu su glikozidi antocijanidina s karakterističnom kemijskom strukturom flavonoida C_6-C_3-C_6. Postoji šest osnovnih antocijanidina: cijanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin i malvidin, a vezanjem šećera na ove osnovne antocijanidine nastaju molekule antocijanina. Najčešći šećeri vezani za molekulu antocijanidina su glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza, rutinoza, soforoza, sambubioza i dr. Antocijanini mogu biti acilirani s raznim hidroksicimetnim (kafeinska, *p*-kumarinska, ferulična kiselina) ili alifatskim kiselinama (octena, jabučna, oksalna) (52). Na slici 4 prikazani su najčešći glukozidi antocijanina.



Slika 4. Kemijska struktura 6 osnovnih glukozida antocijanina (52)

Jedna od najvažnijih karakteristika antocijanina je pozitivan naboj na kisiku u heterocikličnom prstenu C. Zahvaljujući toj kemijskoj strukturi antocijanini se u kiseloj sredini ponašaju kao kationi i grade soli s kiselinama, a u alkalnoj sredini kao anioni i grade soli s bazama (51). U vakuoli biljne stanice antocijanini su prisutni u četiri molekularne forme koje su međusobno u ravnoteži.

i-obojena forma flavilijevog kationa

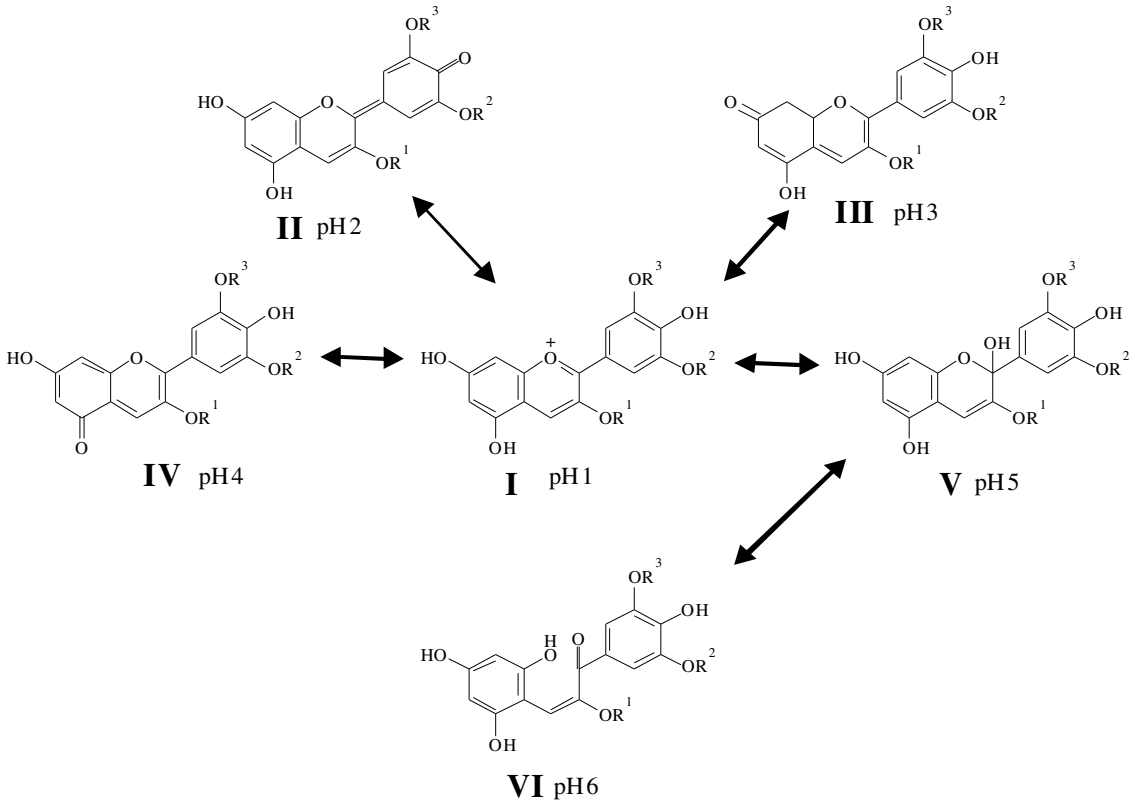
ii-kinoidna forma

iii-karbinol pseudobaza

iiii-halkon pseudobaza (52).

Ove različite kemijske forme antocijanina pokazuju različitu boju u ovisnosti o pH otopine u kojoj se nalaze (slika 5). Pri pH 1 prevladava flavilijev kation koji je crveno obojen. Između pH 2 i 4 prevladava plava boja kinoidne forme antocijanina (strukture II-IV). Kod pH vrijednosti 5 i 6 stvaraju se dvije bezbojne forme koje imaju karbinol pseudobazu (struktura V) i halkon bazu (struktura VI). Pri višim pH vrijednostima (višim od 7), molekula antocijanina se raspada (53).

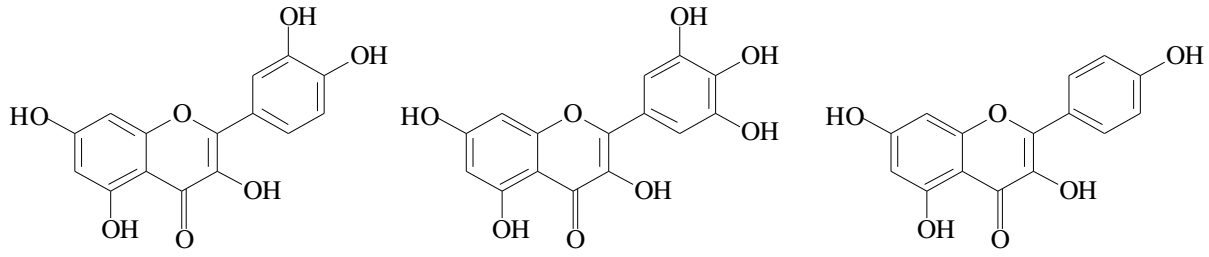
Prvi interes za istraživanje antocijanina pojavio se zbog njihovog doprinosa boji raznih prehrambenih proizvoda kao što su džemovi i sokovi od voća. Na početku antocijanini nisu bili često korišteni kao aditivi u prehrambenoj industriji zbog svoje nestabilnosti uzrokovane različitim fizikalnim ili kemijskim čimbenicima kao što su svjetlost ili pH te zbog teškoće pri pročišćavanju i zbog komercijalne nedostupnosti na tržištu. No otkriće stabilnijih aciliranih antocijanina pridonosi korištenju antocijanina kao sigurnih dodatka hrani (20).



Slika 5. Ravnotežna raspodjela antocijanina u ovisnosti o pH vodene otopine (53)

2.2.1.2. Flavonoli

Flavonole karakterizira osnovna C_6-C_3-C_6 struktura (slika 6). U stanicama se pojavljuju gotovo isključivo kao glikozidi u kojima je šećerna jedinica vezana na C3 atom, a manje uobičajeno je vezanje na poziciji C7. Najčešći šećer vezan za molekulu aglikona flavonola je glukoza, ali se vezati mogu i galaktoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza. Slično kao i antocijanini, i flavonoli mogu biti acilirani s različitim cimetnim ili nekim drugim fenolnim kiselinama (32, 49, 54). Pojavljuju se u nadzemnim dijelovima biljaka, dok su u biljnim dijelovima koji se razvijaju ispod površine zemlje nađeni samo u tragovima. Do sada je identificirano više od 200 aglikona flavonola, a za voće su uobičajeni kvercetin, miricetin i kemferol (slika 6) (20,54). Ovi flavonoli slabo su topivi u vodi i žute su boje. Aglikoni flavonola nisu prisutni u biljkama, ali ako su prisutni, vjerojatno su rezultat nekog procesa obrade hrane kao što je smrzavanje, sterilizacija ili fermentacija.

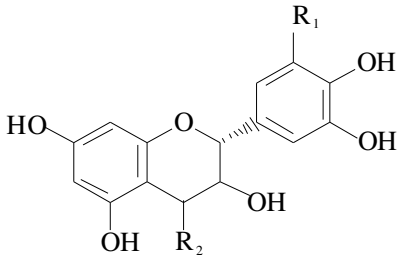


Slika 6. Kemijska struktura osnovnih flavonola (54)

2.2.1.3. Flavanoli

Flavanole (ili flavan-3 ole ili katehine) karakterizira osnovna C_6-C_3-C_6 flavonoidna struktura. Na poziciji 4 na heterocikličkom C prstenu ne nalazi se atom kisika te im je ta strukturna osobina zajednička s antocijanidima. Najdominantniji flavanoli su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin te slijedeći esteri galne kiseline: (-)-epikatehin galat i (-)-epigalokatehin galat. Monomerne molekule flavanola mogu se povezivati u oligo ili polimerne spojeve koji se nazivaju proantocijanidini i tanini. Ova polimerizacija događa se kao rezultat autooksidacije, ali češće su te reakcije katalizirane nekim enzimima (polifenoloksidaza), koji se nalaze u većini biljnih tkiva (32).

U voću se flavanoli najčešće nalaze u obliku oligomernih ili polimernih formi tj. u obliku proantocijanidina ili tanina, no moguće je pronaći i slobodne monomere flavanola. Tako se monomeri (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin nalaze u voću češće u slobodnoj formi, a rijeđe u formi glikozida što ih razlikuje od ostalih flavonoida (44). Slika 7 prikazuje najčešće forme flavanola (4).



Flavanoli i proantocijanidini
(+)-katehin (2R, 3S) $R_1 = R_2 = H$
(-)-epikatehin (2R, 3R) $R_1 = R_2 = H$
galokatehin $R_1 = OH$, $R_2 = H$
Dimerni ili polimerni proantocijanidini
$R_1 = OH/H$ $R_2 = [(galo)katehin]^n$

Slika 7. Kemijska struktura flavanola i proantocijanidina (4)

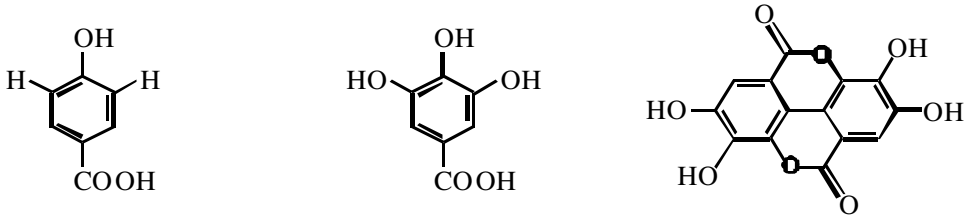
2.2.2. Fenolne kiseline

Važna skupina polifenola su i fenolne kiseline. One mogu biti derivati benzojeve ili cimetne kiseline. Rijetko su prisutne u slobodnom obliku, a najčešće se pojavljuju esterificirane s vinskom kiselinom ili kina kiselinom. Vjerojatno je jedinstvena distribucija i velika količina fenolnih kiselina u voću rezultat njihove ključne uloge u biosintezi ostalih kompliciranijih polifenola (49).

2.2.2.1. Hidroksibenzojeve kiseline

Hidroksibenzojeve kiseline imaju općenitu C_6-C_1 strukturu koja potječe direktno od benzojeve kiseline. Različite strukture u pojedinim hidroksibenzojevim kiselinama javljaju se zbog hidroksilacije ili metilacije na aromatskom prstenu. Samo u nekim vrstama voća se te kiseline pojavljuju u slobodnoj formi, a inače su uglavnom prisutne kao konjugati, i oslobađaju se samo tijekom procesiranja voća i povrća. Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina. One mogu biti konjugirane sa šećerima ili organskim kiselinama te vezane na dijelove stanične stijenke, npr. lignine. Osim ovih spomenutih kiselina, i galna i elaginska kiselina također pripadaju skupini

hidroksibenzojevih kiselina. Galna kiselina je trihidroksi derivat koji sudjeluje u stvaranju galotanina, a elaginska kiselina koja je također uobičajena za biljke, obično je prisutna u obliku elagitanina (54,55). Na slici 8 prikazana je kemijska struktura uobičajenih hidroksibenzojevih kiselina.

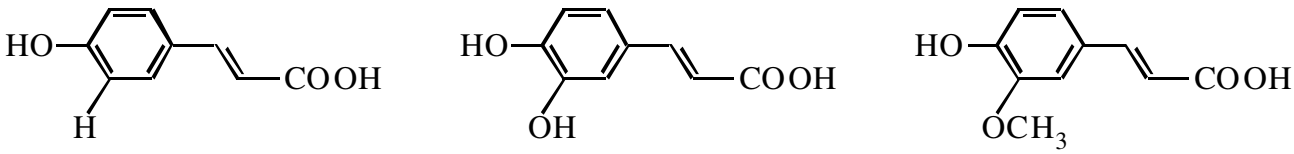


p-hidroksibenzojeva kiselina galna kiselina elaginska kiselina

Slika 8. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (54)

2.2.2.2. Hidroksicimetne kiseline

Hidroksicimetne kiseline češće se nalaze u prirodi nego hidroksibenzojeve i sastavni su dijelovi staničnih stijenki biljnih stanica. Četiri najrasprostranjenije hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska, kafeinska, ferulična i sinapična kiselina (slika 9). One se u biljnim stanicama nalaze u različitim konjugiranim formama kao što su esteri hidroksicimetnih kiselina s hidroksilnim kiselinama (šikiminska, vinska kiselina), a prisutnost njihovih slobodnih oblika ukazuje na enzimsku ili kemijsku hidrolizu (54,56).



p-kumarinska kiselina kafeinska kiselina ferulična kiselina

Slika 9. Kemijska struktura tri najčešće hidroksicimetne kiseline (54)

Hidroksicimetne kiseline se nalaze u svim dijelovima voća, iako se najveće koncentracije nalaze u vanjskim dijelovima zrelog voća. Njihova koncentracija smanjuje se tijekom dozrijevanja ploda, a ukupna se količina povećava zbog povećanja veličine ploda. Kafeinska kiselina, slobodna ili esterificirana, je najrasprostranjenija fenolna kiselina u prirodi i predstavlja 75-100% ukupnog sadržaja hidroksicimetnih kiselina u voću. Ferulična kiselina je rasprostranjenija u žitaricama, nalazi se i u voću, ali u manjim količinama (57).

2.3. Uloga polifenola u biljkama

Polifenoli u biljkama imaju višestruku ulogu. Oni pridonose kvaliteti voća i povrća doprinoseći senzorskim karakteristikama kao što su boja, aroma ili trpki okus (9). Neki polifenoli, npr. lignini sudjeluju u izgradnji integralnog dijela biljne stanične stijenke te služe kao mehanička potpora i barijera protiv invazije mikroorganizama. Antocijanini, te flavoni i flavonoli kao ko-pigmenti, daju boju cvijeću i voću što je važno za privlačenje insekata i ptica koje pomažu kod rasprostranjivanja sjemena i oprašivanja (54). Neki polifenoli mogu indirektno utjecati na rast biljke. Flavonoidi štite ranjivije stanične dijelove od štetnog zračenja jer imaju sposobnost snažne apsorpcije UV zračenja (20).

Osim ovih spomenutih osnovnih uloga, polifenolima se pripisuje i jedna puno važnija uloga. Naime, oni mogu biti uključeni u povećanje otpornosti biljke prema bolestima. Tako je utvrđena povezanost između povećane sinteze endogenih flavonoida i ranih faza infekcije u biljci (20). Uvjeti stresa kao što su pojačano UV zračenje, ozlijeđivanje ili infekcija, potiču biosintezu polifenola u biljci te oni doprinose otpornosti biljke prema bolestima (54).

Daljnja istraživanja uloge ovih spojeva usmjerena su na interakcije koje se mogu dogoditi između biljke i mikroorganizama koji mogu inficirati biljku (20). Kao rezultat napada mikroorganizama, polifenoli se mogu nakupljati u biljci kao spojevi male molekularne mase koji se zovu fitoaleksini. Iako se fitoaleksini mogu nalaziti u maloj količini u biljci, utvrđeno je da se oni ubrzano nakupljaju za vrijeme napada mikroorganizama (54).

2.4. Značaj i upotreba polifenola

Količina polifenola koja nastaje u biljkama tijekom jedne godine je znatna. To se vidi iz činjenice da se oko 2 % cjelokupne količine ugljika koji nastaje fotosintezom u biljkama (1×10^9 t po godini) pretvara u flavonoide i njima srodne spojeve. Ovi spojevi imaju razne pozitivne

funkcije u biljkama, a zbog velike količine i raznolikosti mogu se primijeniti u različitim područjima djelovanja ljudskog života. Neki se flavonoidi upotrebljavaju u medicini za kontrolu raznih bolesti zbog svojih farmakoloških osobina i pozitivnog djelovanja na zdravlje ljudi, dok su drugi važni za industrijsku primjenu. Npr. naringenin i neohesperidin, koji su po kemijskoj strukturi flavanoni, mogu se prevesti u odgovarajuće dihidrohalkone koji imaju snažan kapacitet zaslađivanja. Njihova eksploatacija ovisit će o mogućnosti povećanja količine tih spojeva u biljkama (20).

Podaci o količini i vrsti polifenola koji se nalaze u biljkama mogu se upotrijebiti za utvrđivanje razlika koje postoje unutar različitih biljaka ili unutar različitih sorti jedne vrste biljke. Naime, flavonoidi su prikladni za tu ulogu jer su kemijski stabilni, raznolike su strukturalne građe, a razvojem tehnika kao što je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, postalo je moguće odrediti polifenole prisutne u biljkama čak i u vrlo maloj količini. Dobiveni podaci o polifenolnom profilu biljaka mogu se tada primjeniti za određivanje razlika koje postoje između biljaka, ali i za provjeru autentičnosti nekih proizvoda kao što su sokovi i džemovi (20). Npr. nedopušten dodatak pirea buče u džemove od marelice može se dokazati pomoću polifenolnog profila ovih biljaka. Siringinska kiselina je spoj marker karakterističan za buču i ne nalazi se u polifenolima marelice. Njena prisutnost u džemu od marelice dokaz je nedopuštenog dodavanja pirea od buče u proizvode od marelice (58).

2.5. Izolacija flavonoida i fenolnih kiselina iz biljnih materijala

Prije analize polifenolnih spojeva nekom instrumentalnom tehnikom, potrebno je izolirati polifenolne spojeve iz uzorka da bi se dobio ekstrakt uzorka koji je obogaćen polifenolima, a u kojem se ne nalaze interferirajuće komponente. Tijekom pripreme uzorka potrebno je spriječiti kemijske promjene polifenola koje se mogu dogoditi uslijed enzimske aktivnosti ili oksidacije te se zbog toga, u toku ekstrakcije, u ekstrakt dodaje antioksidans ili se ekstrakcija izvodi pri uvjetima inertne atmosfere. Uvjeti ekstrakcije trebaju biti blagi koliko je to moguće da bi se izbjegla termička degradacija, oksidacija te ostale kemijske i biokemijske promjene u uzorku. Izolacija polifenolnih spojeva iz voća dodatno je zakomplicirana jer se polifenoli nalaze u voću u različitim formama te je potrebno provesti ponekad i nekoliko uzastopnih koraka ekstrakcije da bi se izolirali svi spojevi od interesa. Ako je tehnika kojom se analiziraju polifenoli u ekstraktu dovoljno selektivna i precizna, smanjuje se potreba za manipuliranjem s uzorkom (59).

Izolacija flavonoida iz osušenih, samljevenih biljnih materijala provodi se hladnim ili toplim otapalima (etanol, metanol, aceton, dimetilformamid s različitim udjelima vode). Iz

svježeg voća ekstrakcija se provodi primjenom istih otapala za ekstrakciju, no, u tom slučaju, potreban je manji udio vode (20). Za ekstrakciju antocijanina i manje polarnih flavanona, flavona, izoflavona i flavonola prikladnija su otapala kao što je kloroform ili mješavina etil acetata i metanola, iako se flavonoli uspješno ekstrahiraju i pomoću mješavine vode i etilnog alkohola. Antocijanini se obično ekstrahiraju s metanolom koji sadrži klorovodičnu kiselinu jer pri tim uvjetima antocijanini prelaze u flavilijevu formu. Acilirani antocijanini su nestabilni u otopinama koje sadrže mineralne kiseline, pa se za ekstrakciju takvih spojeva umjesto klorovodične kiseline koriste slabije kiseline kao što su mravlja i octena (20). Antocijanini se po mogućnosti trebaju ekstrahirati na temperaturi iznad 70 ºC jer se na tim temperaturama denaturiraju prisutni enzimi, ali previsoke temperature treba izbjegavati zbog hidrolize antocijanina. Ekstrakti bi se trebali pripremati najmanje 1 sat prije analize čime se omogućava dovoljno vremena za prelazak bezbojnih halkona u obojenu flavilijevu formu (52).

Pošto se polifenolni spojevi nalaze u voću uglavnom u obliku glikozida, često se kao pomoć pri analizi polifenolnih spojeva, uz ekstrakciju, primjenjuje postupak hidrolize kojim se polifenolni spojevi razgrađuju na svoje aglikone i molekule šećera (60,61). Hidroliza olakšava kromatografsku analizu koja slijedi nakon ekstrakcije, jer pojednostavljuje kromatografske podatke posebno u slučajevima kada komercijalni standardi nisu dostupni. Nakon hidrolize smanjuje se broj podataka jer će svi glikozidi jednog aglikona i slobodni aglikon dati jedan pik (59). Tako se flavonoli i fenolne kiseline (npr. iz sitnog bobičastog i jagodastog voća) mogu odrediti u voću nakon ekstrakcije i hidrolize pomoću otopine koja se sastoji od vode i metanola te sadrži klorovodičnu kiselinu i *terc*-butilhidrokinon kao antioksidans. U ovakvom ekstraktu mogu se kvantitativno odrediti flavonoli i fenolne kiseline u formi aglikona, no ova metoda nije prikladna za ekstrakciju antocijanina (60,61). Da bi se ekstrahirali antocijanini iz voća (npr. iz trešanja) i pojedine fenolne kiseline koje se već nalaze u slobodnom stanju, voće se ekstrahira s otopinom vode i metanola. Smjesa se centrifugira, te evaporira. Ostatak nakon evaporacije se razrijedi u metanolu i skladišti u hladnjaku. Prije analize, tako pripremljen ekstrakt se ispari do suhog, te se razrijedi u mobilnoj fazi koja u sebi sadrži mravlju kiselinu. Analiza antocijanina i fenolnih kiselina provodi se HPLC metodom (62).

Pošto se u voću nalaze različite grupe polifenolnih spojeva različite kemijske strukture i različite osjetljivosti na uvjete ekstrakcije i hidrolize, nije jednostavno pronaći samo jednu metodu ekstrakcije polifenola. Često se mora primjeniti više koraka izolacije da bi se ekstrahirale pojedine grupe polifenola iz jednog uzorka te da bi se, nakon ekstrakcije, moglo provesti detaljno kvantitativno određivanje pojedinih polifenolnih spojeva koje bi dalo kompletnu sliku i polifenolni profil nekog uzorka (4,10). Tako se polifenoli iz raznog sitnog voća mogu

ekstrahirati s etil acetatom. U ovom ekstraktu nalaze se slobodne i konjugirane hidroksicimetne kiseline, galna kiselina, elaginska kiselina, flavonoli, flavanoli i proantocijanidini male molekularne mase. Jedan dio tog ekstrakta ispari se do suhog ostatka koji se otopi u metanolu i analizira HPLC metodom. Drugi dio ekstrakta ponovo se ekstrahira s puferom natrijevog acetata pH vrijednosti 7.0 te s vodom da se uklone fenolne kiseline u vodenu fazu. Nakon tog koraka pročišćavanja, ekstrakt se ispari do suhog i otopi u metanolu te se u njemu analiziraju flavanoli i proantocijanidini. Ostatak voća zakiseli se otopinom HCl-a i antocijanini se ekstrahiraju s metanolom. Alikvot ovog ekstrakta otpari se do suhog ostatka, otopi u metanolu i antocijanini se analiziraju HPLC metodom (19).

2.6. Metode analize flavonoida i fenolnih kiselina

Flavonoidi i fenolne kiseline su vrlo dobro definirane skupine spojeva s ustanovljenim fizikalnim i kemijskim osobinama te se za njihovu analizu mogu koristiti razne spektroskopske, elektroforetske, elektrokemijske i kromatografske tehnike. Jedna od najčešće korištenih tehnika u njihovoj karakterizaciji je UV/Vis spektroskopija jer je UV/Vis spektar ovih spojeva vrlo karakterističan (tablica 1). Flavonoidi pokazuju dvije glavne apsorpcijske vrpce: prva vrpca (300-380 nm) nastaje zbog apsorpcije prstena B dok je druga vrpca (240-280 nm) rezultat apsorpcije prstena A. Pozicija tih vrpci daje informaciju o vrsti flavonoida i supstitucijskim skupinama vezanim za molekulu flavonoida (63). Veliki broj tradicionalnih metoda za određivanje ukupne količine polifenolnih spojeva bazirane su na primjeni spektroskopije. Tako se jednostavnim kolorimetrijskim postupcima može odrediti količina ukupnih polifenolnih spojeva (2,3,64), ukupnih flavonoida (64), ukupnih antocijanina (2,3,65) ili ukupnih hidroksicimetnih kiselina (64). Od ostalih spektroskopskih tehnika u analizi flavonoida i fenolnih kiselina koriste se još FTIR spektroskopija (66), masena spektrometrija (MS) (67) te nuklearna magnetska rezonancija (NMR) (68,69). Nešto se rijeđe koriste elektroforetske tehnike, no razvijena je primjena kapilarne elektroforeze (CE) za određivanje polifenolnih spojeva (70-72). Od novijih tehnika treba spomenuti i elektrokemijske metode kao što su ciklička voltametrija (CV) (*engl. Cyclic Voltammetry*) (73), pravokutno-valna voltametrija (SWV) (*engl Square-Wave Voltammetry*) (74) te elektrokemijske metode u tzv. protočnim uvjetima mjerenja (FIA-amperometrija i FIA-kulometrija) (75).

Potreba za detaljnim određivanjem pojedinih polifenolnih spojeva dovela je do upotrebe kromatografskih tehnika: tekućinske (LC) (*engl. Liquid Chromatography*) (76,77) i plinske kromatografije (GC) (*engl. gas chromatography*) (77). Plinska kromatografija (GC) se ne koristi

tako često za razdvajanje i određivanje polifenolnih spojeva kao tekućinska, no s prikladnim metodama derivatizacije i ova metoda može biti prikladna za određivanje polifenola (8,63). Metoda izbora za razdvajanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje flavonoida i fenolnih kiselina u kompleksnim uzorcima svakako je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. High-PerformanceLiquid Chromatography*) (HPLC) (4, 6-10,18,19).

Tablica 1. Apsorpcijski spektri različitih grupa polifenola (49)

Grupa spojeva	UV vrpca II[a]	UV vrpca I[a]	Vidljivo područje
Benzojeve kiseline	270-280		
Cimetne kiseline	(290-300)[b]	305-330	
Antocijanini	240-280	(315-325)[c]	450-560
Flavonoli	250-270	(300)[b] 350-380	
Flavanoli	270-280		
Kumarini	220-230	310-350	
Flavoni	250-270	330-350	
Flavanoni,	270-295	(300-330)[b]	
Flavanonoli	220-270	(300-320)[b] 340-390	
Halkoni	240-270		340-370
Auroni	245-270	300-340	

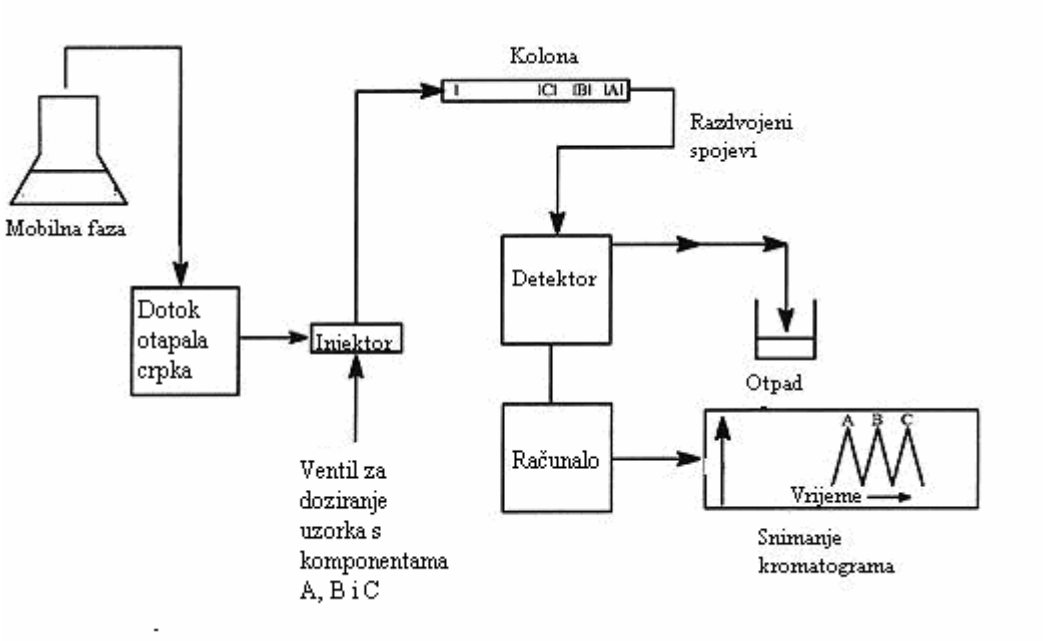
[a] uobičajeno otapalo je metanol, osim metanol-HCl za antocijanine; promjene u sastavu mobilne faze uzrokovat će pomak u spektru
[b] shoulder (rame)
[c] u slučaju aciliranja s cimetnim kiselinama

2.6.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Svim kromatografskim postupcima zajedničko je postojanje stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze. Kod tekućinske kromatografije mobilna faza je tekućina i ona nosi sastojke uzorka kroz stacionarnu fazu koja se nalazi u koloni, a odjeljivanje sastojaka uzorka u koloni temelji se na njihovim različitim brzinama kretanja kroz stacionarnu fazu. Razvojem punila za stacionarnu kolonu koja su imala promjer 10 μm ili manji, razvijena je kasnih 60-tih godina tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. High Performance Liquid Chromatography*). Postoji nekoliko vrsta tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti-razdjelna kromatografija, adsorpcijska kromatografija, kromatografija ionske izmjene, kromatografija na gelu - ali se najviše upotrebljava razdjelna kromatografija. Kod ove vrste tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, stacionarna faza u koloni je najčešće silikagel

na koji su vezane različite organske grupe kao što su C_8 (oktil) ili C_{18} (oktadecil) grupe. One stvaraju monomolekularni sloj stacionarne faze na silikagelu, te se na taj način može dobiti veliki broj manje ili više polarnih stacionarnih faza. Ovisno o polarnosti stacionarne i mobilne faze razlikujemo normalnu kromatografiju i reverznu kromatografiju. Kod normalne kromatografije stacionarna faza je polarna (CN, NH_2), a mobilna nepolarna. Kod reverzne kromatografije (RP-HPLC) stacionarna faza je nepolarna (ugljikovodici C_2-C_{22}), a mobilna faza je polarno otapalo poput vode, metanola, acetonitrila. Polarna mobilna faza nosi sastojke uzorka preko nepolarne stacionarne faze koja se nalazi u koloni te, onaj sastojak uzorka koji je najpolarniji, izlazi prvi jer najmanje reagira s nepolarnom stacionarnom fazom. Procjenjuje se da se danas oko 75 % HPLC analiza odvija reverzno-faznom tehnikom (78).

Uređaj za tekućinsku kormatografiju visoke djelotvornosti (slika 10) sastoji se od spremnika u kojima se nalazi tekuća mobilna faza, ventila za doziranje uzorka, crpke koja pumpa mobilnu fazu kroz sistem, kolone u kojoj se nalazi stacionarna faza (na njoj se razdvajaju komponente iz uzorka ovisno o brzini kretanja kroz kolonu), detektora, te kompjuterskog sustava koji prikuplja podatke i prikazuje razdvojene komponente iz uzorka u obliku kromatograma (78). Detektori koji se najčešće upotrebljavaju u tekućinskoj kromatografiji su UV/Vis detektori (namijenjeni komponentama koje apsorbiraju UV ili Vis zračenje), PDA detektori (snimaju cijeli spektar aposrpcije neke komponente), RI detektori (mjere indeks loma komponente), MS detektori (detektori masene spektrometrije) te različiti elektrokemijski detektori (EC) (78).



Slika 10. Shematski prikaz HPLC analitičkog sustava

2.6.2. Određivanje polifenola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Polifenolni spojevi se najčešće analiziraju reverzno-faznom tekućinskom kromatografijom (RP-HPLC). Izbor kolone koja će se upotrijebiti za analizu flavonoida i fenolnih kiselina u kromatografiji ovisi o grupi flavonoida koji se žele razdvojiti i o karakteristikama stacionarne faze koja je sposobna omogućiti zadovoljavajuću retenciju, selektivnost i oblik pika. Najpopularnije su kolone dugačke 150 ili 250 mm, s veličinom čestica punjenja 5 μm. Sistem otopina koje se upotrebljavaju za mobilnu fazu kod razdvajanja flavonoida pomoću reverzno-fazne HPLC metode su najčešće metanol-voda ili acetonitril-voda. Obično se u mobilnu fazu dodaje octena ili mravlja kiselina, a ponekad fosfatna ili perklorna jer one omogućavaju poboljšano razdvajanje i spriječavaju dijeljenje pika. Obično najbolje rezultate daje gradijentna eluacija, s linearnim gradijentom u kombinaciji s izokratičnim korakom (6,10,61,63,79,80). Identifikacija flavonoida razdvojenih na HPLC-u obično se izvodi uspoređujući retencijska vremena s retencijskim vremenima standarda, kao i analiziranjem karakteristika razdvojenih flavonoida koje je skupio detektor. Jedno od ograničenja kod analiza flavonoida u biljnim materijalima je činjenica da mnogi spojevi, posebice glikozidi, nisu komercijalno dostupni što otežava pravilnu identifikaciju i kvantifikaciju. Jedno od mogućih rješenja ovog problema je hidroliza flavonoid glikozida u procesu ekstrakcije (63). Detektori koji se najčešće upotrebljavaju u analizi polifenola su UV/Vis ili PDA detektor (4,9,18,61), ali u zadnje vrijeme sve je učestalija upotreba detektora masene spektrometrije (MS) (6) koji s velikom sigurnošću može identificirati razne polifenolne spojeve. Prednost upotrebe MS detektora je mogućnost identifikacije polifenolnih spojeva u obliku glikozida te identifikacija spojeva koji se nalaze u uzorcima u vrlo malim količinama. Često se kombinira upotreba PDA i MS detektora (10).

2.7. Voće kao izvor polifenola

2.7.1. Tamno obojeno voće

Jagodasto, bobičasto i koštuničavo voće ukusna je niskoenergetska namirnica bogata polifenolnim spojevima. Mnogobrojnim je istraživanjima utvrđeno da sitno tamno obojeno voće koje pripada porodicama *Rosaceae* (višnja, kupina, jagoda, malina), *Ericaceae* (borovnice), *Saxifragaceae* (ribiz) sadrži veće količine polifenolnih spojeva od povrća, žitarica i nekih drugih vrsta voća (81). Zbog velike količine polifenola, ovo voće pokazuje i jaku antioksidacijsku aktivnost. Tako je bobičasto voće pokazalo najjaču antioksidacijsku aktivnost između različitih vrsta voća bez obzira na metodu određivanja antioksidacijske aktivnosti (TEAC-Trolox

Equivalent Antioxidant Capacity, TRAP-Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter, FRAP-Ferric Reducing-Antioxidant Power) (82), Oxygen Radical Absorbing Capacity) (83). Između različitih vrsta bobičastog voća posebno se po količini polifenola i antioksidacijskoj aktivnosti ističe aronija. Ovo voće sadrži veče količine polifenola i ima snažniju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostalim vrstama voća, začinskim biljkama, povrćem, žitaricama, sjemenkama i sl. (43,84). Klasifikacija najznačajnijeg sitnog voća prikazana je u tablici 2 (85).

Tablica 2. Klasifikacija sitnog, tamno obojenog voća

Porodica, rod, latinski naziv voća	Hrvatski naziv voća
Porodica Saxifragaceae Rod Ribes- *Ribes sativum* *-Ribes nigrum*	 Crveni ribiz Crni ribiz
Porodica Rosaceae Rod Rubus-*Rubus fruticosus* *-Rubus idaeus* Rod Prunus-*Prunus avium* *-Prunus cerasus* Rod Fragaria-*Fragaria anannassa* *Rod Aronia-Aronia melanocarpa*	 Kupina Malina Trešnja Višnja Jagoda Aronija
Porodica Ericaceae Rod Vaccinium-*Vaccinium myrtillus*	Borovnica
Porodica Caprifoliaceae *Rod Sambucus - Sambucus nigra*	Bazga





Crveni i crni ribiz pripadaju porodici *Saxifragaceae*, rodu *Ribes* (85). Crveni ribiz ima sitne, sočne plodove crvene boje, ugodnog kiselkastog okusa. Plodovi crnog ribiza su tamno ljubičastocrne boje, a sasvim zrele bobe crne su boje, jakog mirisa. I crni i crveni ribiz od davnina su poznati kao voćne vrste. Već u XV. stoljeću ribiz se uzgajao u Nizozemskoj da bi se poslije proširio u Dansku, Njemačku i zemlje Baltika, a zatim dalje po Europi i svijetu. U SAD-u se uzgaja od sredine XIX. stoljeća. O značenju ribiza u to vrijeme najbolje govori podatak o prvoj monografiji cijelog roda *Ribes* objavljenoj 1907. godine no u intenzivnom uzgoju ribiz se pojavio znatno kasnije (86).

Danas se u uzgoju uobičajeno pojavljuju 4 vrste ribiza: crveni, crni, bijeli i žuti. U plantažnom uzgoju najviše se uzgaja

crni ribiz jer je neusporedivo bogatiji prehrambenim visokovrijednim sastojcima i rodi dvostruko više po jedinici površine od crvenih sorata. U zapadnoeuropskim zemljama sve se više podižu plantaže crvenog ribiza. Bijeli i žuti su interesantni samo zbog svoje dekorativnosti. Zanimljiv je podatak da je crni ribiz bogatiji vitaminom C od svih voćnih vrsta. On sadrži vitamina C 4-8 puta više od limuna i naranče, 10-20 puta više od jabuke, trešnje ili višanja te do 100 puta više od grožđa. U sastavu se još nalaze visokovrijedni spojevi kao što su: vitamini, minerali, bjelančevine, pektini, celuloza, vlaknaste tvari i voćne kiseline. Za crni ribiz je specifično još i to da vitaminima nije bogat samo plod, nego svi zeleni dijelovi (list, pupovi, mladice). Ljekovita svojstva ribiza poznata su još od davnina u borbi protiv anemije (plod), a napici dobiveni od lišća i ostalih biljnih dijelova koristili su se kao diuretici, kod problema probavnog sustava i u borbi protiv kroničnog reumatizma (86). Crni ribiz se prerađuje u sokove, sirupe, vino, voćne kaše, a nešto se ribiza potroši i u svježem stanju. Crveni ribiz se koristi za pripremu slastica i želea (86, 87).



Kupina pripada porodici *Rosaceae*, rod *Rubus.* Latinsko ime kupine je *Rubus fruticosus* (85). To je sočno voće sa sjajnom, tankom kožicom, bogato mineralima, posebno magnezijem i kalijem, prehrambenim vlaknima i vitaminom C, a dobar je izvor antioksidansa. Od nje se proizvode sokovi, vino, kolači, džemovi (88). Današnje plemenite sorte kupina uglavnom su proizašle iz divljih europskih i američkih sorti. Prvo je uvedena kao voćna kultura u Americi početkom XIX stoljeća, a u Europi se uzgaja od kraja XIX stoljeća. Kupinu se u prirodi nalazi uz putove, u živicama, na rubovima šuma kao vrlo neugodan korov. Za razliku od divlje kupine, koje kod nas ima oduvijek, plemenita kupina počela se uzgajati vrlo kasno, prije tridesetak godina (86).



Malina (*Rubus idaeus*) pripada porodici *Rosaceae*, rod *Rubus* (85). Ona se, kao voćna vrsta, u novije vrijeme sve češće spominje u našim planovima obnove individualnoga gospodarstva. To je zahvalna kultura koju nije teško uzgojiti, ali u berbi zahtjeva mnogo ljudskoga rada pa je zbog toga pogodna za obiteljska gospodarstva. Malina se uzgaja za prodaju kao svježi plod ili, još češće, za preradu i zamrzavanje, što oplemenjuje proizvod i podiže mu cijenu, pa je financijski učinak znatno veći. Plodovi malina sadrže mnogo kiselina, šećera i vitamina pa su, uz lijepu boju soka i ugodnu aromu, osobito traženi na tržištu svježeg voća, a još više za preradu (86).



Jagoda pripada porodici *Rosaceae*, rod *Fragaria* (85). Gotovo da i nema voćne vrste koja ima toliko široku rasprostranjenost i toliko načina uzgoja kao jagoda. Zauzima središnje mjesto u skupini jagodičastog voća jer, s gospodarskog stajališta, u suvremenom hrvatskom poljodjelstvu počinje dobivati sve veću važnost. Razlozi su za tu tvrdnju višestruki. Jagoda je prvo rano voće u godini, privlačna izgleda, troši se kao svježe voće, konzervirano ili zamrznuto. Od svih voćnih vrsta koje se uzgajaju, najbrže vraća uloženi kapital i omogućuje dobru zaradu na relativno malenim površinama. Dobro je prilagođena različitim tlima i klimatskim čimbenicima, brže se i lakše razmnožava od ostalih voćnih vrsta i donosi plod odmah u godini sadnje. Općenito govoreći, jagoda je danas u hrvatskom poljodjelstvu neopravdano slabo zastupljena, a ponuda na tržnicama i u prodavaonicama nije dovoljna (86). Jagoda je voće kojim se čovjek među prvima koristio u svojoj prehrani. Narodna medicina pripisuje joj ljekovitu vrijednost, a zbog sadržaja raznih organskih i anorganskih sastojaka, plodovi jagode imaju veliku hranjivu vrijednost. Plod jagode značajan je izvor vitamina C, ima malu kaloričnu vrijednost i koristan je u dijetalnoj prehrani. Uz potrošnju u svježem stanju, jagoda se mnogo primjenjuju u kulinarstvu za spremanje raznih slastica i prerađevina (kompota, džemova, soka, slatkoga, likera) i za popravak kakvoće drugih proizvoda (86).



Aronija (*Aronia Melanocarpa*) pripada porodici *Rosaceae*. Njezina domovina je sjeverna Amerika, ali je kao voćna vrsta najraširenija u državama bivšeg Sovjetskog Saveza. Raste kao bujan grm visok 1,5 – 3 m koji cvate u svibnju bijelim cvjetovima. Otporna je na zimske niske temperature i kasne proljetne mrazove, a uspijeva i na manje plodnim tlima. Dobro podnosi sušu, otporna je na bolesti i štetnike. Plodovi aronije uvrštavaju se u skupinu jagodičastog voća, rastu u grozdovima, dozrijevaju u kolovozu kada postaju crno obojeni i slatko – trpkoga su okusa. Upotreba plodova aronije je svestrana. Plodovi aronije prerađuju se u sokove, kompote, marmelade, džemove, a mogu se koristiti i svježi, sušeni ili se zamrzavaju. Poznati su ljekoviti učinci zrelih plodova, koji pored prirodne boje – koja potječe od antocijana, sadrže i vitamine A, B, C, te minerale (89).



Trešnje (*Prunus avium*) pripadaju porodici *Rosaceae*, rodu *Prunus* (85). To je malo voće srcolikog oblika, glatke, tanke kože. Boja kože i mesa može biti različita, od tamno crvene do žute, što ovisi o sorti trešnje. (87,88). Sve sorte trešanja koje se danas uzgajaju u svijetu potječu od

Prunus avium odnosno *Cerasus avium*. Trešnja je u Rim donesena iz Grčke, a u Grčku iz Male Azije. Pouzdano se može tvrditi da je gencentar trešanja Mala Azija i Transkavkasko gorje, gdje divlja trešnja raste po rubovima šuma do 1800 m nadmorske visine. Danas se u svijetu uzgaja oko 1500 različitih sorata trešanja, među kojima je veći broj namijenjen za potrošnju u svježem stanju, manji broj uzgaja se samo za prerađevine (kompoti, slatko, džemovi, marmelade, likeri) (86). Trešnje su dobar izvor vitamina A i vitamina C, bogate su i antioksidansima i kalijem te stoga povoljno djeluje na izlučivanje vode iz organizma. Energetska vrijednost trešnje je niska, te je pogodna za međuobrok ili kao zamjena za obrok kod ljudi s povećanom tjelesnom težinom (87,88). Zbog izrazito vrijednih hranjivih sastojaka i dijetoterapijskih vrijednosti, kao oplemenjivač raznih voćnih i drugih prerađevina, plodovi trešnje sve više se troše na našem i u svjetskom tržištu (86).



Višnju (*Prunus cerasus*) (85) se s pravom naziva plemenitim voćem zbog unutarnjih svojstava ploda. Upravo zbog takvih svojstava ploda, višnja se ubraja u red najzanimljivijih voćnih vrsta za preradu. Kolika je važnost višnje u prerađivačkoj industriji vidi se i po tome što je svjetska proizvodnja trešanja i višanja oko 2 000 000 tona od čega je barem 1 000 000 tona višanja godišnje. U Hrvatskoj se višnja uzgaja u dva proizvodna područja: u sjevernom kontinentalnom dijelu i u sredozemnom dijelu, odnosno u Dalmaciji. U Dalmaciji se uzgaja višnja Maraska, koja se odlikuje posebnom kakvoćom (86).



Borovnica pripada porodici *Ericaceae,* rod *Vaccinium*, a njeno latinsko ime je *Vaccinium myrtillus* (85). To je malo, okruglo ili ovalno voće s plavom, glatkom kožicom, slatkog okusa. Bogate su antioksidansima i vitaminom C. To voće može pomoći kod upala urinarnog trakta i kod poboljšanja vida (88). Veoma su cijenjeni ugodna aroma, miris i okus borovnice te se ovo kvalitetno voće troši u svježem stanju i u obliku različitih prerađevina. Osobito su cijenjeni džemovi, sokovi, slatko itd. (86). Uzgoj borovnice počeo je u SAD-u još 1893. godine, te su danas u toj zemlji pod nasadima borovnica velike površine, a kultura borovnice iz dana u dan poprima sve veće značenje. Uzgoj u Europi počeo je nešto kasnije nego u SAD-u. (90).



Bobice bazge pripadaju porodici *Caprifoliaceae*, rodu *Sambucus* (85). Prirodno je rasprostranjena u Europi, sjeverozapadnoj Africi i jugozapadnoj Aziji. Raste na raznim

područjima, uključujući suha i vlažna tla. Bazga je biljka šumskih čistina, rubova šuma i putova uz naselja. Drvo naraste 4-6 m visine, lišće je raspoređeno u parovima, dugo je 10-30 cm, cvate u lipnju, a bijeli cvjetovi skupljeni su u velike cvatove i imaju jak i intenzivan miris. Plodovi su na početku zelene, zatim smeđe-crvene boje te na kraju sazrijevaju u sjajnocrne male, sočne bobe. Ljekovita svojstva bazge sadržana su u svim dijelovima biljke: cvijetu, plodu, listu, kori i korijenu. Djelovanja bazge i njezina upotreba u narodnoj medicini idu u korak s kamilicom te se njeni cvjetovi i plodovi koriste za pripremanje čajeva, sokova, pekmeza, vina i sl (91).

2.7.2. Rasprostranjenost antocijanina, flavonola, flavanola i fenolnih kiselina u voću

Glavne podgrupe flavonoida prisutne u bobičastom i jagodastom voću su antocijanini, flavonoli i katehini. Fenolne kiseline prisutne u ovom voću su derivati benzojeve i cimetne kiseline (1) i u literaturi se mogu naći brojni podaci o količini tih spojeva u voću. Međutim, postoje velike razlike u objavljenim količinama tih spojeva, što ovisi o vrsti voća koja se istražuje, o vremenu berbe voća, razini zrelosti, zemljopisnom podrijetlu itd. Na rezultate snažno utječu i metode upotrijebljene za ekstrakciju i analizu te se stoga pojavljuju neke nedosljednosti u objavljenim količinama tih spojeva (92). Zbog svih navedenih razloga potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se utvrdilo koji su vrste polifenola prisutne u voću i u kojoj količini. U tablici 3 prikazane su količine antocijanina u različitim vrstama sitnog tamnoobojenog voća, koje su do sada objavljene u literaturi. Tablica 4 prikazuje količine flavonola i fenolnih kiselina u voću iz različitih literaturnih izvora.

Tablica 3. Literaturni podaci o količini pojedinih grupa antocijanina u voću (mg/kg svježeg voća)

Cijanidin (mg/kg)	Delfinidin (mg/kg)	Peonidin (mg/kg)	Petunidin (mg/kg)	Pelargonidin (mg/kg)	Malvidin (mg/kg)	Literatura
Crni ribiz						
1494	1518					6
1452	2440					4
1055	1288	12	1			19
Crveni ribiz						
177						6
213						4
127						79
Kupina						
703-2010						93
2386						40
1144-2415						94
Jagoda						
34				82		10
6-27				246-380		95
Malina						
721-883				6-9		10
311-1068	0-28			0-130	0-36	96
143-858						40
Borovnica						
214	502		196		270	4
105	394		344		379	18
82-1150	506-2273	20-370	349-1671		123-925	96
58-1271	10-763	<10-138	<10-174		<10-161	97
Višnja						
1089-2621						80
278-804		0-18				98
Trešnja						
290-868		8-58				80
785-2758		17-177		3-39		99
Aronija						
8421						4
14781						79
3167						18
4810						100
Bazga						
3316						4
13727				18		79

Tablica 4. Literaturni podaci o količini hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina te flavonola u različitim vrstama voća (mg/kg svježeg voća).

Hidroksibenzojeve kiseline		Hidroksicimetne kiseline			Flavonoli			Literatura
***p*-Hidroksi benzojeva kiselina (mg/kg)**	**Elaginska kiselina (mg/kg)**	**Kafeinska kiselina (mg/kg)**	***p*-Kumarinska kiselina (mg/kg)**	**Ferulična kiselina (mg/kg)**	**Miricetin (mg/kg)**	**Kvercetin (mg/kg)**	**Kemferol (mg/kg)**	
Borovnica (*Vaccinium myrtillus*)								
nd	na	95-106	61-81	11-12	na	na	na	44
na	na		65	111a	31	81	tr	4
Kupina								
na	na	na	na	na	na	2-35	0.1-2.6	101
nd	300-338	14-36	4-21	30-35	Nd-100	nd	nd	45
Aronija								
na	na	na	na	na	nd	89	nd	102
na	na		60	832a	nd	348	tr	4
nd	na	750	69	27	na	na	na	44
Jagoda								
na	na	na	na	na	nd	7	5-8	102
na	na	na	na	na	na	7.7-10	7-16	103
44-63	NA	1.4-4.2	29-49	Nd-3.2	NA	NA	NA	44
218b	na	nd	23b	nd	na	11b	6b	10
1-6	1.1-12	na	4.2-58.3	na	3.1-36	5-9.4	nd	104
Malina								
na	na	na	na	na	nd	6-8	nd	102
16.4-20	NA	6.9-10.8	9.8-18	7.6-9.4	NA	NA	NA	44
1012-1745b	Na	1-3b	8-15b	nd	na	1-7b	nd	10
Trešnja								
8.8	na	171	51	4.6	na	na	na	44
na	na	na	na	na	na	15	<2	103
na	na	na	10-68b	na	na	13-54.8b	3-14b	80
Višnja								
na	na	na	15-49b	na	na	12-48b	Nd-13b	80

Nastavak Tablice 4. Literaturni podaci o količini hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina te flavonola u različitim vrstama voća (mg/kg svježeg voća).

Hidroksibenzojeve kiseline		Hidroksicimetne kiseline			Flavonoli			Literatura
p-Hidroksi benzojeva kiselina (mg/kg)	Elaginska kiselina (mg/kg)	Kafeinska kiselina (mg/kg)	*p*-Kumarinska kiselina (mg/kg)	Ferulična kiselina (mg/kg)	Miricetin (mg/kg)	Kvercetin (mg/kg)	Kemferol (mg/kg)	
Bazga								
na	na		18	179a	nd	331	Tr	4
Crni ribiz								
na	na	na	na	na	71	44	nd	102
na	na		39	27a	93	50	13	4
na	na	26b	48b	10b	40b	47b	15b	6
14	na	35	47	13.3	na	na	na	44
Crveni ribiz								
na	na	na	na	na	nd	9	nd	102
na	na		11	5a	tr	4	Tr	4
na	na	na	na	na	na	13	<2	103
na	na	nd	5b	3b	0.8b	7b	0.4b	6
12.1	na	14	26	nd	na	na	na	44

a (kafeinska + ferulična kiselina), b (ukupni derivati određenog spoja), NA-nije analizirano, ND-nije idenificirano (not detected)

2.8. Antioksidansi i njihovo antioksidacijsko djelovanje

Antioksidansi su spojevi koji značajno inhibiraju ili odgađaju oksidaciju nekog supstrata iako su prisutni u koncentraciji manjoj od supstrata. Oni neutraliziraju slobodne radikale dajući im svoj elektron ili inhibiraju stvaranje slobodnih radikala. Njihovo djelovanje osobito je značajno kod:

a) raznih procesa u ljudskom organizmu, jer antioksidansi mogu u znatnoj mjeri spriječiti rizik od nastanka nekih bolesti kao što su maligne ili krvožilne bolesti

b) u prehrambenoj industriji, jer antioksidansi spriječavaju različite štetne oksidacijske procese u hrani kao što su razgradnja arome, boje, stvaranje užeglosti, kvarenje hrane i sl.

Fiziološka uloga antioksidansa temelji se na spriječavanju oštećenja staničnih komponenata koja nastaju kao posljedica kemijskih reakcija u koje su uključeni slobodni radikali. Zadnjih godina pronađeno je dosta dokaza koji podupiru pretpostavku o ključnoj ulozi slobodnih radikala u mnogim fundamentalnim reakcijama u stanicama, a antioksidansi koji mogu spriječiti štetno djelovanje slobodnih radikala važni su u obrani organizma od bolesti (ateroskleroze, različitih tipova dijabetesa i sl.). Voće i povrće bogati su izvori prirodnih antioksidansa (vitamini A, B, C, tokoferoli, kalcij, selen, prehrambena vlakna, flavonoidi, fenolne kiseline i sl.), među kojima je potrebno istaknuti polifenolne spojeve. Oni su odgovorni za veliki dio antioksidacijskog kapaciteta voća i povrća, a redoviti unos voća i povrća bogatih polifenolima ima pozitivan utjecaj na zdravstveno stanje ljudi te na smanjeni rizik od nastanka nekih bolesti. Zbog toga se danas voće i povrće te prirodni antioksidansi prisutni u voću i povrću, posebno polifenoli, sve više istražuju (1,27).

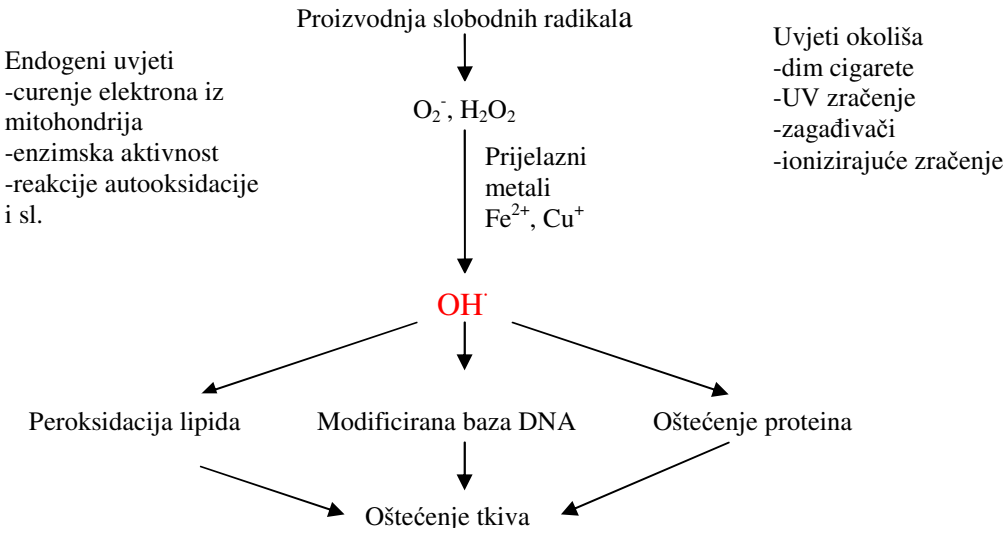
2.8.1. Nastajanje slobodnih radikala i oštećenje tkiva djelovanjem slobodnih radikala

Slobodni radikali su nestabilne, visokoreaktivne molekule s puno energije, koje u vanjskoj elektronskoj ljusci imaju nespareni elektron te mogu ili donirati elektron ili ga uzeti od druge molekule da bi ostvarili stabilnost i, prema tome, mogu se ponašati kao oksidansi ili reducensi. Zbog svoje visoke reaktivnosti većinom imaju vrlo kratko vrijeme poluživota (10^{-6} sekunde ili kraće) u biološkim sustavima iako neki mogu preživjeti i duže (27). Slobodni radikali kisika su superoksidni (O_2^-), hidroksilni (OH^-), hidroperoksilni (HOO^-), peroksilni (ROO^-), aloksilni (RO^-) radikali. Ti radikali reagiraju brzo s ostalim spojevima pokušavajući uhvatiti njihove elektrone da bi postigli stabilnost. Kada molekula koja je napadnuta izgubi svoje

elektrone, ona i sama postaje slobodni radikal i započinje lančanu reakciju u kojoj nastaju neželjeni spojevi (1).

Najvažniji slobodni radikali koji mogu utjecati na razvoj mnogih bolesti su derivati kisika, posebice superoksidni i hidroksilni radikal. Stvaranje slobodnih radikala u organizmu odvija se putem nekoliko mehanizama na koje utječu **endogeni faktori** kao i ***faktori okoline*** (slika 11) (27). **Superoksidni anion** (O_2^-) nastaje dodatkom elektrona kisiku, a *in vivo* se ovaj radikal stvara pomoću nekoliko mehanizama. Neke molekule kao što su adrenalin, flavin nukleotid i glukoza mogu se oksidirati (**autooksidacija**) u prisutnosti kisika pri čemu se oslobođeni elektron veže na molekulu kisika te nastaje superoksidni anion. Te su reakcije *ubrzane prisutnošću prijelaznih metala* kao što su željezo i bakar. Superoksidni anion može nastati i u mitohondrijima. Mitohondriji su tvornice energije u ljudskom organizmu, a kisik se na kraju respiratornog lanca, u mitohondrijima pretvara u vodu. Redukcija kisika u vodu izvodi se pomoću lanca transporta elektrona u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Za vrijeme tog procesa proizvode se intermedijari slobodnih radikala koji su obično čvrsto vezani za komponente transportnog lanca. No konstantno se događa **curenje slobodnih elektrona u matriks mitohondrija** što utječe na stvaranje superoksidnog aniona. Osim u mitohodrijima, superoksidni radikal može nastati i **kao posljedica djelovanja imunološkog sustava** organizma, preciznije leukocita koji u okruženju mikroorganizama započinju proizvodnju velikog broja superoksida. Nadalje, a**ktivnost nekih enzima** također uzrokuje curenje nekoliko elektrona u okolnu citoplazmu što također utječe na nastanak superoksida. Svaki biološki sustav koji proizvodi superoksidni anion, također može proizvesti **vodikov peroksid** kao rezultat spontanih dismutacijskih reakcija. Uz to, neke enzimske reakcije mogu direktno proizvesti vodikov peroksid. Vodikov peroksid nije sam po sebi slobodni radikal, ali ga se ubraja u reaktivne oblike kisika (*engl. reactive oxygen species*). On je slab oksidans koji može direktno oštetiti proteine i enzime koji sadrže tiolne skupine. No njegova najvažnija osobina je mogućnost slobodnog prelaska kroz stanične membrane, što superoksidni anion općenito ne može. Prema tome, vodikov peroksid stvoren na jednoj lokaciji u organizmu može se raširiti daleko prije razgradnje u kojoj nastaje reaktivni **hidroksilni radikal**. Hidroksilni radikal najvjerojatnije je posrednik u većini toksičnih efekata koji se pripisuju vodikovom peroksidu. Dakle, hidroksilni radikal je konačni posrednik kod većine oštećenja koja nastaju na tkivima, a koja uzrokuju slobodni radikali. Većina reaktivnih kisikovih oblika uzrokuje patološke efekte povećavajući stvaranje hidroksilnog radikala. Iako hidroksilni radikal može nastati na nekoliko načina, daleko najvažniji mehanizam nastanka hidroksilnog radikala *in vivo* je dekompozicija superoksida i vodikovog peroksida koja je katalizirana prijelaznim metalima (27).

Opisani procesi nastanka slobodnih radikala su normalni procesi metabolizma, a nastali slobodni radikali služe neutraliziranju virusa i bakterija. Neki **uvjeti okoline** kao što su zagađenje okoline, radijacija, dim cigarete ili herbicidi koji dospiju u organizam utječu na dodatno stvaranje slobodnih radikala (1) te nastaje neravnoteža između količine tih reaktivnih molekula i štete koju mogu uzrokovati te mehanizama obrane i popravka (49). Lančane reakcije uzrokovane slobodnim radikalima mogu uzrokovati **peroksidaciju lipida** što rezultira u destabilizaciji staničnih membrana ili oksidaciju ostalih staničnih komponenti kao što su **proteini i DNA**, što dovodi do promjena u stanici i **oštećenja tkiva** (1).



Slika 11. Glavni izvori slobodnih radikala u organizmu i posljedice njihova djelovanja (27)

2.8.2. Antioksidativni obrambeni sustav i antioksidansi

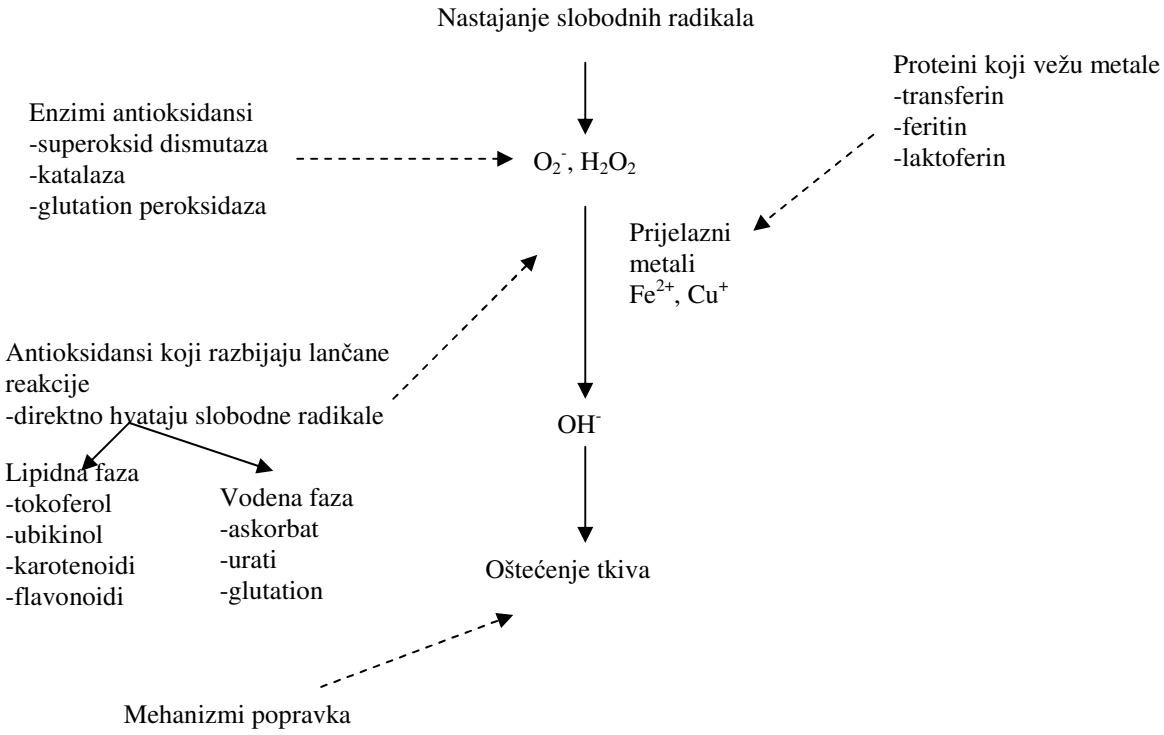
Ljudski organizam je razvio antioksidativnu obranu kao zaštitu od napada slobodnih radikala koja je prikazana na slici 12 (27). **Prvu liniju obrane** u borbi protiv slobodnih radikala čine tvari koje inhibiraju stvaranje aktivnih oblika kisika i slobodnih radikala tako što vežu metalne ione koji su katalizatori u reakcijama oksidacije, reduciraju hidroperokside i hvataju pojedinačne molekule kisika. U spojeve prve linije obrane ubrajaju se različiti enzimi te proteini koji vežu prijelazne metale (26). Osim njih, neki prirodni antioksidansi, posebno polifenoli, posjeduju potencijalna mjesta na koja se mogu vezati metali. Dio antioksidacijske aktivnosti polifenola može se, prema tome, povezati s reakcijama helacije metala. Pokazalo se da je helacija jedan od mehanizama u antioksidacijskom djelovanju antocijanina (105).

Drugu liniju obrane čine antioksidansi koji hvataju slobodne radikale (*engl. radical-scavenging antioxidants*) te na taj način sprečavaju početak lančanih reakcija koje bi inače započeli slobodni radikali (26, 27). Takvi antioksidansi (AH) doniraju jedan od svojih elektrona te tako neutraliziraju slobodne radikale (LOO·,LO·) i ometaju fazu propagacije.

$$LOO^{\bullet} + AH \longrightarrow LOOH + A^{\bullet}$$
$$LO^{\bullet} + AH \longrightarrow LOH + A^{\bullet}$$

U tim procesima sami antioksidansi postaju slobodni radikali (A·), ali oni ne iniciraju i ne potiću daljnje reakcije oksidacije jer imaju malu reaktivnost i stabilni su i u ovoj formi. Oni djeluju zapravo kao „hvatači" slobodnih radikala i mogu se definirati kao tvari koje mogu stabilizirati slobodne radikale. Polifenoli su vrlo reaktivni hvatači radikala (1,26).

Antioksidansi koji hvataju slobodne radikale mogu se podijeliti na antioksidanse vodene faze i antioksidanse lipidne faze. Antioksidansi koji djeluju u lipidnoj fazi hvataju radikale u membranama i lipoproteinima i ključni su u spriječavanju lipidne peroksidacije. Najvažniji antioksidans koji djeluje u lipidnoj fazi je vitamin E, ali to su i karotenoidi i flavonoidi. Antioksidansi koji djeluju u vodenoj fazi direktno hvataju slobodne radikale u vodenim dijelovima stanica. Najvažniji antioksidans ovog tipa je vitamin C (27).



Slika 12. Antioksidativna obrana protiv napada slobodnih radikala (27)

Treća linija obrane organizma od djelovanja slobodnih radikala je popravak oksidativnih oštećenja koja su nastala na lipidima, proteinima i molekulama DNA. U ovoj obrani sudjeluju razni enzimi kao lipaze, proteaze i enzimi za popravak DNA molekula. Postoji još jedan obrambeni mehanizam po kojem se u organizmu proizvode odgovarajući antioksidansi te transportiraju na točno određena mjesta, u točno određeno vrijeme i u točno određenoj količini. Neki antioksidansi potrebni za obranu organizma od napada slobodnih radikala, među kojima su i polifenolni spojevi, unose se u organizam hranom (26).

2.8.3. Interakcije između pojedinih antioksidansa

Između antioksidansa se, *in vivo,* mogu dogoditi različite kompleksne interakcije koje utječu na njihovo djelovanje. Npr. vitamin C može obnoviti djelovanje tokoferola kao antioksidansa. Kada tokoferol, spriječavajući peroksidaciju masti, prijeđe u formu radikala tokoferila, vitamin C predaje mu jedan elektron i vraća ga u formu tokoferola te tako obnavlja djelovanje tokoferola kao antioksidansa. Taj proces može biti vrlo važan u održavanju koncentracije tokoferola u lipoproteinima i membranama. Na sličan način glutation može regenerirati askorbat iz dehidroaskorbata te tako obnoviti djelovanje askorbata (vitamina C). (27). Neki antioksidansi mogu imati pojačano antioksidacijsko djelovanje u prisutnosti drugih antioksidansa (sinergističko djelovanje). Opažen je sinergistički efekat između α-tokoferola i nekih polifenolnih spojeva (106).

Antioksidansi mogu ulaziti i u kemijske reakcije s drugim spojevima stvarajući kompleksne spojeve što može imati utjecaj na mehanizam antioksidacijskog djelovanja. Tako antocijanini mogu stvarati stabilne kompleksne spojeve ulazeći u reakcije s drugim spojevima koje nazivamo kopigmenti ili s metalima u procesu nazvanom kopigmentacija. Kopigmenti s kojima antocijanini stvaraju komplekse su bezbojne ili slabo žuto obojene tvari koje se nalaze u biljnim materijalima uz antocijanine (flavonoidi (rutin, kvercetin), fenolne kiseline (klorogenska kiselina, ferulična kiselina), organske kiseline). Najvažniji mehanizmi kopigmentacije su intermolekularna i intramolekularna kopigmentacija. Intermolekularna kopigmentacija odnosi se na interakciju između antocijanina i kopigmenta, koji se za molekulu antocijanina ne veže kovalentnim vezama. Suprotno tome, intramolekularna kopigmentacija odnosi se na interakciju u kojoj je molekula kopigmenta dio molekule antocijanina (kovalentna veza). Antocijanini mogu stvarati komplekse i s metalima (Sn, Cu, Fe, Al, Mg, K) što je vrlo važan mehanizam djelovanja antocijanina kao antioksidansa (107,108). Naime zbog reakcije antocijanina s metalnim ionima, smanjuje se koncentracija metalnih iona koji su prekursori u reakcijama nastajanja slobodnih radikala te se proces nastajanja slobodnih radikala usporava.

Neki antioksidansi mogu djelovati i prooksidativno. Naime, u određenim uvjetima, prisutnost antioksidansa može dovesti do povećanog oksidativnog oštećenja tkiva, a takvo djelovanje nazivamo prooksidativno djelovanje. Npr. vitamin C koji inače djeluje kao antioksidans, može ponekad povećati oksidativno oštećenje, osobito ako se uz vitamin C u organizam unosi i željezo. Slično tome, jasno je dokazano *in vitro* da antioksidans tokoferol može promovirati oksidaciju LDL-a (lipoprotein niske gustoće) u odsutnosti antioksidansa koji djeluje u vodenoj fazi kao što je vitamin C. Do sada nije razjašnjeno jesu li ove reakcije važne *in vivo*, no pri interpretaciji rezultata kliničkih ispitivanja antioksidativnih dodataka prehrani, treba uzeti u obzir da antioksidansi mogu djelovati poooksidativno *in vivo* (27). Istraživano je i prooksidativno djelovanje ekstrakta voća bogatih određenim polifenolnim spojevima. Tako ekstrakt bazge koji je bogat antocijaninima pokazuje prooksidativan utjecaj na oksidaciju LDL-a u kojoj kao katalizatori posreduju ioni bakra (109). Prema tome, između antioksidansa vjerojatno postoje kompleksni međuodnosi što otežava predviđanje funkcije antioksidansa *in vivo,* a djelovanje antioksidansa ovisit će o okolnostima koje postoje u određenoj mikrookolini (27).

2.8.4. Posljedice oksidativnih oštećenja

Oksidativni stres u ljudskom organizmu, koji je posljedica neravnoteže između nastajanja slobodnih radikala i antioksidativne obrane organizma, povezan je s oštećenjem različitih molekula uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline. Čestice **lipoproteina** ili membrane prolaze proces lipidne peroksidacije pri čemu nastaju različiti produkti kao što su kratkolančani *aldehidi, alkani i alkeni, konjugirani dieni i različiti hidroksidi i hidroperoksidi*. Mnogi od ovih produkata mogu biti markeri kod mjerenja lipidne peroksidacije. Oksidativno oštećenje **proteina i nukleinskih kiselina** dovodi do modifikacije amino kiselina i nukleotida te do nastanka određenih produkata oštećenja. Sva ova oksidativna oštećenja mogu dovesti do disfunkcije stanice te time pridonijeti patofiziologiji različitih bolesti (27).

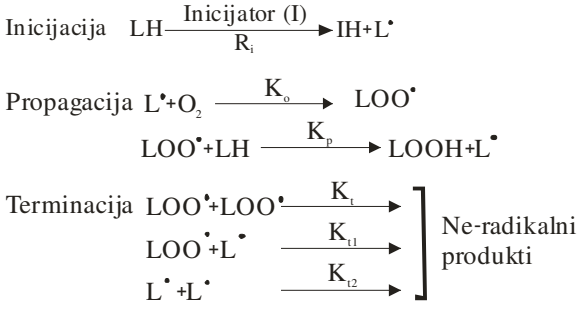
2.8.5. Oksidativni stres i bolesti

Oksidativni stres ima ulogu kod mnogih bolesti, uključujući aterosklerozu, upalna stanja, različite karcinogene bolesti i procese starenja. Kod takvih se stanja u tjelesnim tekućinama može pronaći povećana količina produkata koji nastaju nakon oštećenja molekula slobodnim radikalima. To su posebice markeri lipidne peroksidacije koji su ranije spomenuti, što nas dovodi do zaključka da su se u organizmu dogodili štetni procesi izazvani slobodnim radikalima. Ateroskleroza se može uzeti kao primjer procesa za koji postoje značajni dokazi o štetnom utjecaju oksidativnog stresa. To je proces suženja i otvrdnuća krvnih žila, a najčešći je i

najvažniji čimbenik rizika za nastanak i razvoj krvožilnih poremećaja i bolesti. Na nastanak ateroskleroze tj. suženja krvnih žila utječe povećana količina kolesterola u krvi-hiperkolesterolemija. Povećana količina kolesterola niske gustoće (*LDL, engl. low density lipoprotein*) ili tzv. „lošeg" kolesterola, uz smanjenu količinu kolesterola visoke gustoće (*HDL, engl.high density lipoprotein*, „dobri" kolesterol) glavni je uzrok stvaranja plaka koji se taloži u krvnim žilama, sužuje krvne žile te spriječava protok krvi. Na razvoj aterosklerozno plaka osim povećane količine LDL-kolesterola utječe i oksidativna modifikacija tog kolesterola, a taj proces je iniciran i propagiran slobodnim radikalima, a inhibiraju ga antioksidansi. Prema tome, manjak antioksidansa može biti rizičan faktor za razvoj ateroskleroze koja je ujedno najčešći i najvažniji čimbenik rizika za nastanak i razvoj krvožilnih bolesti. (27, 110).

2.8.6. Glavne reakcije autooksidacije lipida

Glavne reakcije koje dovode do oksidativnih oštećenja molekula najbolje se vide u primjeru procesa autooksidacije lipida. Autooksidacija lipida je spontana reakcija atmosferskog kisika s lipidima, a odvija se u tri glavne faze: inicijacija, propagacija i terminacija:



(26)

Prevladavajući inicijacijski mehanizam lipidne peroksidacije je oksidacija katalizirana metalima bakra i željeza. Pri tome razlikujemo dva tipa reakcije:

1. Prijelazni metal u visoko valentnom stanju ($Me^{(z+1)+}$) direktno apsorbira vodik iz lipidnog supstrata (LH) pri čemu nastaje radikal lipida (L·):

$$LH + Me^{(z+1)+} \longrightarrow L\cdot + H^+ + Me^{z+}$$

2. Metalni ioni kataliziraju proizvodnju radikala pomoću dekompozicije lipidnog hidroperoksida (LOOH)

$$LOOH + Me^{z+} \longrightarrow LO\cdot + OH^- + Me^{(z+1)+} \quad (103)$$

Osim metala u tragovima, na fazu inicijacije imaju utjecaj i neki dodatni čimbenici, kao što su ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje, pri čemu se stvaraju alkilni radikali (L·). Alkilni radikali

stupaju u reakciju s molekulama kisika te se, u periodu propagacije (rasta), stvaraju hidroperoksidi (LOOH) i peroksilni radikali (LOO·). Terminacija se nastavlja putem asocijacije dva radikala pri čemu se stvaraju stabilni ne-radikalni produkti. Toksične tvari koje nastaju u procesu autooksidacije lipida kvare hranu i smanjuju njenu nutritivnu vrijednost, a nakon unosa u organizam, mogu utjecati na razvoj karcinoma, mutagene promjena na molekulama DNA (1,26).

2.9. Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti

Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti nekog spoja ili ekstrakta može se izvoditi direktnim mjerenjem proizvodnje slobodnih radikala u nekom supstratu i njihove inhibicije pomoću antioksidansa. Elektron spin rezonantna spektroskopija (ESR) je jedina analitička tehnika koja direktno mjeri hvatanje slobodnih radikala (49,111).

No uobičajeniji pristup u mjerenju antioksidacijske aktivnosti čistih spojeva ili različitih ekstrakata je upotreba indirektnih mjerenja. Takve metode koje su opisane u literaturi ulaze u dvije grupe. Jedna grupa metoda mjeri antioksidacijsku aktivnost hrane (voća i sl.), a druga grupa mjeri bioaktivnost antioksidansa u ljudskom organizmu. U slučaju prehrambenih sustava mjeri se efikasnost antioksidansa u zaštiti hrane od oksidativnog kvarenja. U ljudskom organizmu oksidativni stres proizlazi iz neravnoteže između štete uzrokovane slobodnim radikalima i reaktivnim oblicima kisika te mehanizama obrane i popravka. Antioksidansi koji se unose prehranom pridonose antioksidativnom kapacitetu bioloških sistema, a analitičke metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti određuju sposobnost tih konzumiranih antioksidansa da pridonesu antioksidativnom kapacitetu bioloških sustava (49).

U svakoj metodi određivanja antioksidacijske aktivnosti bitno je imati odgovarajući supstrat, inicijatora oksidacije i pravilno mjeriti krajnju točku oksidacije. Antioksidacijska aktivnost se mjeri praćenjem inhibicije oksidacije odgovarajućeg supstrata. Nakon što supstrat oksidira pod standardnim uvjetima, doseg oksidacije (krajnja točka) mjeri se kemijskim, instrumentalnim ili senzorskim metodama. Prisutnost antioksidansa u reakcijskom sustavu mijenja krajnju točku oksidacije (49). Većina metoda kao *supstrat* (prehrambeni sustav) koristi ulja ili emulzije ulje-voda. Neke metode koriste različite sintetičke slobodne radikale u organskim otapalima. *Inicijatori oksidacije* su povišena temperatura ili povećana opskrba kisikom, a na brzinu oksidacije mogu utjecati i metalni ioni u uzorku. Oksidacija se mjeri praćenjem stvaranja oksidacijskih produkata (hidroperoksida ili drugih proizvoda degradacije) ili mjerenjem potrošnje kisika (1).

2.9.1. Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti i njihovi reakcijski mehanizmi

Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti razlikuju se po načinu deaktiviranja slobodnog radikala. Antioksidans može deaktivirati slobodni radikal pomoću dva glavna mehanizma:

- tzv. **HAT mehanizma** (*engl. hydrogen atom transfer*) tj. prijenosa vodikovog atoma te
- -pomoću **SET mehanizma** tj. prijenosa elektrona (*engl. single electron transfer*).

Krajni rezultat je isti bez obzira na mehanizam koji se odvija, ali su kinetika i potencijal za prateće reakcije drugačiji. Prijenos elektrona praćen prijenosom protona te prijenos vodika mogu se, isto tako, dogoditi paralelno, a koji će mehanizam dominirati ovisi o antioksidansu, njegovoj strukturi, osobinama, o njegovoj topivosti te o otapalu (112).

Metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti koje se baziraju na HAT mehanizmu mjere klasičnu sposobnost antioksidansa da hvata slobodne radikale donirajući vodikov atom:

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$$

HAT reakcije su neovisne o otapalu i pH vrijednosti, obično su vrlo brze i završavaju se nakon nekoliko sekundi do minute. Najuobičajenije metode koje se zasnivaju na prijenosu vodikovog atoma su:

- ORAC metoda, koja mjeri sposobnost antioksidansa da inhibira oksidaciju izazvanu peroksil radikalom. Time zapravo mjeri klasičnu aktivnost antioksidansa u raskidanju lančane reakcije pomoću prijenosa vodikovog atoma.
- TRAP metoda (*engl. Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*), koja mjeri sposobnost antioksidansa da sudjeluje u reakcijama između peroksil radikala kojeg stvara organski spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorid) i supstrata.
- -TOSC metoda (*engl. Total Oxidant Scavenging Capacity*), kojom se može kvantificirati kapacitet apsorpcije kojom antioksidans apsorbira tri moguća oksidansa- hidroksil radikal, peroksil radikal te peroksinitrit.
- -Kemiluminiscencija, koja se bazira na reakciji radikala s nekim markerom pri čemu se proizvodi spoj koji je u pobuđenom stanju te emitira kemiluminiscenciju (kemijski inducirano svjetlo). Svaki spoj (npr. neki antioksidans) koji reagira s početnim radikalom inhibira proizvodnju svjetla.
- -metoda izbjeljivanja ß-karotena pomoću radikala $LOO^{\cdot}$. Karotenoidi se izbjeljuju autooksidacijom, oksidacijom koja je izazvana svjetlom ili toplinom te oksidacijom izazvanom peroksil radikalima, a obezbojenje se može spriječiti antioksidansima koji doniraju vodikov atom te time hvataju slobodne radikale.
- -oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL). LDL se izolira iz uzoraka krvi te se njegova oksidacija izaziva pomoću Cu(II) iona ili pomoću spoja AAPH (2,2'-azobis(2-

amidinopropan) hidroklorid), a oksidacija LDL-a prati se na 234 nm praćenjem stvaranja konjugiranih diena ili praćenjem peroksidne vrijednosti. Svaki antioksidans dodan u taj sistem inhibira oksidaciju LDL-a (112).

Metode bazirane na SET mehanizmu mjere sposobnost potencijalnog antioksidansa da donira jedan elektron čime reducira neki spoj, uključujući metale, karbonile i radikale:

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow X^{-} + AH^{\bullet+}$$

$$AH^{\bullet+} \xrightarrow{H_2O} A^{\bullet} + H_3O^{+}$$

$$X^{-} + H_3O^{+} \rightarrow XH + H_2O$$

$$M(III) + AH \rightarrow AH^{+} + M(II) \quad (112)$$

Najuobičajenije metode u kojima se odvija mehanizam prijenosa elektrona su:

- -FRAP metoda (*engl. Ferric Reducing Antioxidant Power*) u kojoj se mjeri redukcija željeznog 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u obojeni produkt.

SET reakcije su obično spore i ponekad treba dosta vremena da bi se reakcija završila, pa se računanje antioksidacijskog kapaciteta uglavnom zasniva na postotku smanjenja nastalog produkta, a ne na kinetici. Kada $AH^{\cdot+}$ ima dovoljno dug vijek trajanja, sekundarne reakcije koje se mogu dogoditi postaju značajna smetnja u metodi, a mogu čak dovesti do toksičnosti ili mutagenosti *in vivo* (112).

SET i HAT mehanizmi se gotovo uvijek događaju zajedno u svim uzorcima, a ravnotežu između ova dva mehanizma određuje struktura antioksidansa i pH vrijednost.

Neke metode u kojima se odvijaju oba mehanizma, HAT i SET mehanizam, su:

- TEAC metoda tj. sve ABTS metode, koje se baziraju na sposobnosti antioksidansa da hvata $ABTS^{\bullet+}$ radikal kation
- -DPPH metoda (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), koja se bazira na sposobnosti antioksidansa da reducira (hvata) radikal $DPPH^{\bullet}$ (112).

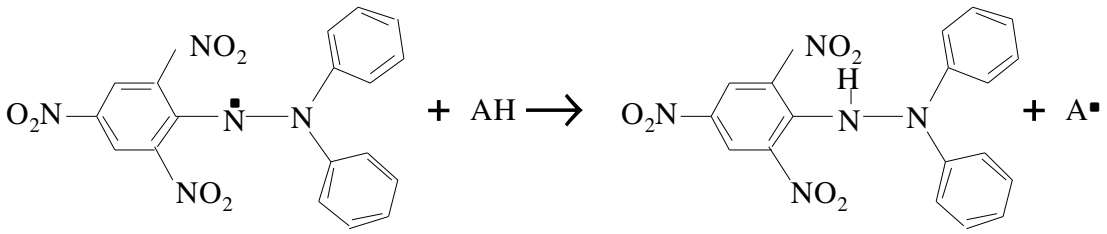
2.9.2. Metode hvatanja slobodnih radikala (*engl. radical-scavenging methods*)

Hvatanje radikala je važan mehanizam po kojem mnogi antioksidansi djeluju u hrani te se u mjerenju antioksidacijske aktivnosti često upotrebljavaju metode koje se zasnivaju na procjenjivanju hvatanja sintetičkih radikala (DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) u polarnim organskim otapalima (npr. metanol) na sobnoj temperaturi (26). Metode hvatanja slobodnih radikala ne opisuju uvijek dovoljno dobro kompleksan multifunkcionalni antioksidativni mehanizam prirodnih antioksidansa jer je zanemaren važan antioksidativni mehanizam prirodnih antioksidansa i polifenola kao što je npr.

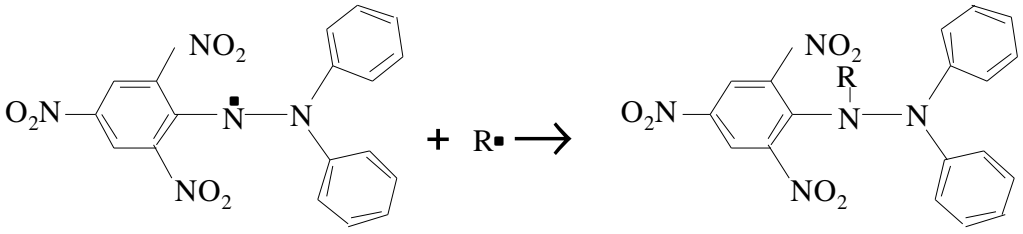
helacija s metalima, inhibicija oksidativnih enzima. Uz to, u obzir nisu uzeti ni mogući utjecaji faktora kao što su topljivost antioksidansa, ionski naboj, kompleksiranje/interakcija s ostalim spojevima, tip inicijacije, pH vrijednost sustava i sl (92). No metode hvatanja slobodnih radikala mogu biti korisne za snimanje antioksidacijske aktivnosti nekog prehrambenog sustava kao što je npr. voće (26).

2.9.2.1. DPPH metoda

U ovoj metodi redukcija $DPPH^{\bullet}$ radikala prati se spektrofotometrijski. U formi radikala $DPPH^{\bullet}$ je tamno obojen te apsorbira na 515 nm, ali za vrijeme reakcije s antioksidansom (AH) ili nekim radikalom ($R^{\bullet}$) apsorpcija se smanjuje jer se smanjuje koncentracija $DPPH^{\bullet}$ radikala (113). Prema tome, hvatanje $DPPH^{\bullet}$ radikala praćeno je bilježenjem smanjenja apsorbancije na 515 nm.



DPPH▪ DPPH-H



DPPH▪ DPPH-R

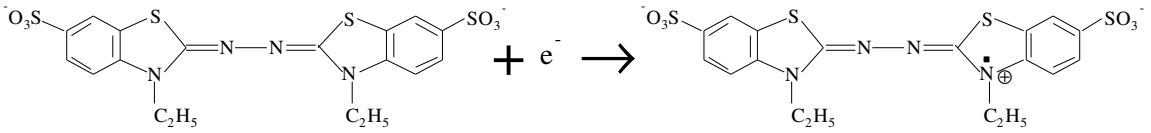
Većina radova na kojima je primjenjena DPPH metoda mjeri apsorbanciju nakon 15 ili 30 minuta reakcije. Obično se objavljuje EC_{50} vrijednost koja označava koncentraciju antioksidansa potrebnog za hvatanje 50 % DPPH radikala u određenom vremenu (26). Vrijeme potrebno za postizanje EC_{50} definira se kao T_{EC50}, a na osnovu EC_{50} i T_{EC50} razvijen je i novi parametar koji se naziva „efikasnost antioksidansa“ (AE)

$$AE = 1/EC_{50}T_{EC50} \quad (112)$$

DPPH metoda se uglavnom bazira na reakcijama prijenosa elektrona, a doniranje vodikovog atoma je marginalna reakcija (112).

2.9.2.2. TEAC (ABTS) metoda

Jedna od popularnijih metoda po kojima se mjeri sposobnost antioksidansa da hvata slobodne radikale je TEAC metoda (*engl. Trolox equivalent antioxidant capacity*) tj. metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta prema Trolox ekvivalentu (topljivom ekvivalentu vitamina E). To je metoda obezbojenja stabilnog plavo zelenog $ABTS^{\bullet+}$ radikal kationa (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)). $ABTS^{\bullet+}$ radikal kation stvara se ili kemijskom ili enzimatskom oksidacijom ABTS-a nekoliko sati prije analize.



ABTS ABTS radikal kation

Kada se u otopinu koja sadrži kation $ABTS^{\bullet+}$ radikala dodaje uzorak, količina $ABTS^{\bullet+}$ radikala kojeg su uhvatili antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije kationa $ABTS^{\bullet+}$ radikala i uspoređuje se sa smanjenjem apsorbancije uzrokovanog dodatkom poznatih količina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (114). Ova metoda često se koristi za procjenu antioksidacijskog kapaciteta čistih spojeva (17), mješavine antioksidansa i kompleksnijih uzoraka kao što su biljke (45), krvna plazma, piće (114,115). Kation $ABTS^{\bullet+}$ radikala je reaktivniji nego $DPPH^{\bullet}$ radikal te se reakcija $ABTS^{\bullet+}$ radikala s antioksidansima prati u vremenu od jedne minute. Aktivnost hvatanja radikala određena ABTS metodom izražava se kao TEAC vrijednost (engl. Trolox equivalent antioxidant capacity) (26).

2.10. Polifenolni spojevi kao antioksidansi

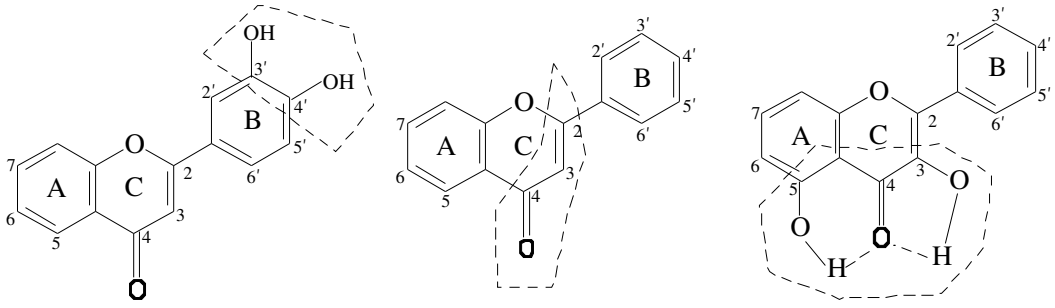
Polifenoli mogu pokazati antioksidacijsku aktivnost djelujući različitim mehanizmima. Oni mogu hvatati slobodne radikale te time razbijati lančane reakcije uzrokovane slobodnim radikalima ili mogu reagirati s metalnim ionima koji su prekursori slobodnih radikala te time ometati nastajanje slobodnih radikala. No veliki dio antioksidacijske aktivnosti polifenola temelji se upravo na njihovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala koja se još naziva i antiradikalna aktivnost, a ovakav mehanizam djelovanja temelji se na redoks osobinama polifenola. Naime, polifenoli djeluju kao reducensi tj. mogu donirati elektron slobodnom radikalu, a radikali polifenola koji pri tome nastaju stabilne su molekule (1). Kemijska struktura i orijentacija različitih grupa koje su povezane na osnovnu flavonoidnu molekulu imaju značajan utjecaj na antiradikalnu reaktivnost polifenola (50) što je prikazano na slici 13. Reaktivnost polifenola kao antioksidansa povećava se ako je prisutna:

(a) orto 3',4'-dihidroksi struktura na B prstenu

(b) 2,3-dvostruka veza u povezanosti s 4-keto grupom na C prstenu

(c) prisutnost hidroksilnih grupa na 3 i 5 pozicijama (26)

Osim ovih strukturnih osobina, za antioksidacijsku aktivnost polifenola važan je i povećan broj slobodnih hidroksilnih skupina, posebno na B prstenu (26,116).



Slika 13. Veza između antioksidacijske aktivnosti i strukture flavonoida (26)

Za određivanje antioksidacijske (antiradikalne) aktivnosti polifenolnih spojeva najčešće upotrebljavaju metode hvatanja slobodnih radikala. Tako najjaču antioksidacijsku aktivnost određenu TEAC i FRAP metodama kojima se mjeri sposobnost hvatanja sintetičkih slobodnih radikala, posjeduju procijanidini, a slijede ih flavanoli>flavonoli>hidroksicimetne kiseline>jednostavne fenolne kiseline. Između aglikona flavonola najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje kvercetin, a slijede ga miricetin i kemferol. Galna kiselina je najjači antioksidans između jednostavnih fenolnih kiselina i hidroksicimetnih kiselina. Antioksidacijska aktivnost hidroksicimetnih kiselina opada redoslijedom: klorogenska kiselina>kafeinska kiselina>ferulična kiselina>kumarinska kiselina (17). Antioksidacijska aktivnost antocijanina i antocijanidina ispitivana je DPPH metodom kojom se također mjeri sposobnost hvatanja sintetičkog slobodnog radikala. Između različitih aglikona antocijanidina, najjaču antioksidacijsku aktivnost pokazao je delfinidin, a slijedili su ga cijanidin i peonidin, pelargonidin, malvidin i petunidin. Monoglukozidi cijanidina, delfinidina i malvidina pokazali su gotovo istu antioksidacijsku aktivnost kao i njihovi aglikoni dok je aktivnost glukozida peonidina i pelargonidina bila niža od aktivnosti njihovih aglikona. 3,5-diglukozidi cijanidina i malvinidina pokazuju značajno nižu antioksidacijsku aktivnost nego njihovi monoglukozidi. Isto tako rutinozidi pokazuju manju antioksidacijsku aktivnost nego monoglukozidi (117). Različite forme antocijanina koje ovise o pH vrijednosti sredine zadržavaju svoju antioksidacijsku

aktivnost (118). Antioksidacijska aktivnost kvercetina, miricetina, (+)-katehina i rutina određena praćenjem oksidacije metil linoleata pokazala je da miricetin i kvercetin posjeduju najjača antioksidacijska svojstva jer su najbolje inhibirali stvaranje vodikovog peroksida u metil linoleatu (119). Osim toga miricetin, kvercetin i rutin mogu zaštiti α-tokoferol od razgradnje, a u ovoj zaštiti najaktivniji je miricetin (119).

Iz dosadašnjih istraživanja može se vidjeti da mehanizam antioksidacijskog djelovanja polienola još uvijek nije u potpunosti razjašnjen te je zbog toga interes za istraživanjima ovih spojeva još uvijek vrlo velik.

2.11. Antioksidacijska aktivnost voća

Antioksidacijska aktivnost voća je vrlo kompleksna. U voću se nalaze različiti prirodni antioksidansi koji mogu djelovati različitim mehanizmima, a mnogi prirodni antioksidansi su multifunkcionalni i mogu imati antioksidacijsku aktivnost zbog više različitih mehanizama. Koji će tip antioksidacijskog mehanizma prevladavati, ovisi o kemijskoj strukturi antioksidansa kao i o brojnim fizikalno-kemijskim faktorima voća. Stoga se glavni mehanizam prirodnog antioksidansa razlikuje ovisno o sastavu voća, kao i o izloženosti voća akceleratorima oksidacije kao što su kisik, toplina, svjetlo i prijelazni metali. Antioksidacijsko djelovanje voća ovisi, dakle, o kemijskoj strukturi prisutnih antioksidanasa, o njihovoj polarnosti, pH vrijednosti te heterogenosti sustava, i svi ovi faktori utječu na efikasnost antioksidansa koji se nalaze u voću. Trenutno se glavnim antioksidacijskim mehanizmom prirodnih antioksidansa, smatraju reakcije helacije antioksidansa s metalima (preventivni inhibitori) te prekidanje lanca radikala preko presretanja primarnih radikala (105).

Zbog upotrebe različitih oksidacijskih sustava i metoda, vrijednosti antioksidacijske aktivnosti voća objavljene u literaturi bitno se razlikuju. U ispitivanjima se upotrebljavaju ekstrakti ili sokovi voća i bobica što daje različit sastav antioksidansa te dodatno doprinosi razlici u rezultatima. Za pripremu uzoraka se upotrebljavaju različite ekstrakcijske otopine koje ne moraju biti efikasne za ekstrakciju svih antioksidansa jer različiti antioksidansi imaju različite fizikalno-kemijske osobine (neki su antioksidansi topivi u vodi, a neki u mastima). U toku ekstrakcije mogu se primjenjivati neki postupci kao npr. filtracija što može dovesti do daljnjeg gubitka antioksidacijskih spojeva i do varijacije u objavljenim rezultatima (92).

Kolike su razlike u objavljenim antioksidacijskim aktivnostima voća određenoj različitim metodama, vidi se iz istraživanja koje je provedeno na crnom ribizlu (*Ribes nigrum*), divljoj borovnici (*Vaccinium myrtillus*) i europskoj brusnici (*Vaccinium vitis-idaea*). Tako ekstrakti

ovog bobičastog voća pokazuju različito antioksidacijsko djelovanje primjenom različitih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti. U DPPH testu, kao hvatači slobodnih radikala vrlo su dobri crni ribiz i divlja borovnica, dok je aktivnost europske brusnice nešto manja. No ekstrakti sve tri vrste voća snažni su antioksidansi u emulziji metil linoleata i u lipoproteinu niske gustoće (LDL). Divlja borovnica je najučinkovitija u spriječavanju stvaranja hidroperoksida u emulziji metil linoleata, ali u lipoproteinu niske gustoće sva tri izolata pokazuju visoku aktivnost. Usprkos tome što europska brusnica pokazuje manju aktivnost kao hvatač slobodnih radikala, ona je jak antioksidans u modelima koji sadrže lipide (19). Razlike u antioksidacijskoj aktivnosti voća određenoj različitim metodama vide se i iz sljedećeg istraživanja. Ekstrakti kupine su značajno aktivniji u inhibiciji oksidacije LDL-a od ekstrakata maline>trešnje>borovnice>jagode. Za razliku od inhibiranja oksidacije LDL-a, u inhibiranju oksidacije liposoma najaktivniji su ekstrakti trešnje, a i ostalo voće pokazuje drugačiji poredak. Nakon ekstrakta trešnje u inhibiranju oksidacije liposoma slijede ekstrakti borovnice>maline>kupine>jagode. U oba oksidacijska sustava jagoda je pokazala najnižu antioksidacijsku aktivnost (42).

No, usprkos tim poteškoćama u određivanju antioksidacijske aktivnosti, ipak se može vidjeti da je antioksidacijska aktivnost bobičastog i jagodastog voća veća od antioksidacijske aktivnosti koju pokazuju različiti biljni ekstrakti (voće, povrće, žitarice) (43), a naročito visoku antioksidacijsku aktivnost pokazuju divlje bobice (5), kao što su aronija, oskoruša, ogrozd te različite sorte borovnica (43).

Jedne od najčešće upotrebljavanih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti voća su ORAC metoda (oxygen radical absorbing capacity), DPPH i ABTS metoda. Antioksidacijski kapacitet aronije određen ORAC metodom (160 μmolTE/g) daleko je veći od antioksidacijskog kapaciteta borovnica (29 μmolTE/g) i brusnica (19 μmolTE/g) koje pripadaju u rod *Vaccinium* (18). Antioksidacijski kapaciteti različitog bobičastog voća iz roda *Vaccinium* određenog ORAC metodom, ali pri različitim uvjetima analize iznose 14-38 μmol TE/g (41), od 7-41 μmol TE/g (97), od 52-139 μmol TE/g (94). Bobice roda *Vaccinium* pokazuju veći antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom (19-131 μmol TE/g) od različitih sorti crnog ribiza (37-93 μmol TE/g), kupine (42-79 μmol TE/g) i maline (13-45 μmol TE/g) (2). Trešnje pokazuju nešto niži antioksidacijski kapacitet (5-15 μmol TE/g) (120).

Prema ABTS metodi, između 28 vrsta voća, najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala ima kupina, a slijede ju borovnica, jagoda, malina, višnja, crveni ribiz (121). Borovnica ima nešto veću antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom od crnog ribizla, aronije i bazge (122).

Ispitivana je i sposobnost voća tj. antioksidansa prisutnih u voću u hvatanju (*engl. „scavenging"*) različitih vrsta slobodnih radikala kao što su superoksidni radikali ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikali ($OH^{\cdot}$). Različite vrste voća pokazale su različitu aktivnost prema različitim aktivnim oblicima kisika. Između svih vrsta i sorti ispitivanog voća, kupine, borovnice, brusnice, maline i jagode, najveću sposobnost inhibiranja stvaranja aktivnih oblika kisika ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, $OH^{\cdot}$) pokazali su ekstrakti kupine i jagode (123).

Osim što je antioksidacijski kapacitet različit za različite vrste voća i različite sorte voća, razlike se mogu vidjeti i kod antioksidacijske aktivnosti voća različitog stupnja zrelosti. Tako kupine i jagode pokazuju najveći antioksidacijski kapacitet kao nezrelo voće, dok je antioksidacijski kapacitet maline najveći u punoj zrelosti voća (124).

Iz dosadašnjih istraživanja antioksidacijske aktivnosti voća, vidljivo je da je potrebno provesti daljnja istraživanja da bi se bolje razjasnila visoka antioksidacijska aktivnost voća. Potrebno je objasniti koji spojevi voća pridonose antioksidacijskoj aktivnosti voća, koja je uloga polifenola u antioksidacijskoj aktivnosti, koji je njihov prevladavajući mehanizam, koje su međusobne interakcije antioksidansa te kakav utjecaj imaju ostale tvari voća (proteini i sl.) na antioksidacijsku aktivnost voća i njihovih polifenola.

2.12. Apsorpcija polifenola iz voća u ljudskom organizmu

Iako antioksidativni bioaktivni spojevi koje se nalaze u voću mogu pokazati razna pozitivna djelovanja *in vitro*, oni se moraju apsorbirati u probavnom traktu da bi pokazali slične efekte u stanicama i u tkivima ljudskog organizma. Ta apsorpcija ovisi o brojnim faktorima kao što su molekularna struktura bioaktivnih spojeva, količina koja je konzumirana, matriks voća, stupanj biokonverzije u probavi i tkivima te statusu i genetskom faktoru (125). Povećan unos voća ili voćnih ekstrakata prehranom povećava antioksidativni kapacitet krvne plazme (28) što se može objasniti činjenicom da su neki spojevi s antioksidativnim svojstvima apsorbirani. No taj zaključak se u zadnje vrijeme dovodi u pitanje jer svako povećanje u antioksidativnom kapacitetu plazme nakon konzumacije voća može biti uzrokovano povećanjem urinske kiseline, a ne apsorbiranim antioksidansima. Iz ovih činjenica je vidljivo da su potrebna daljnja istraživanja kojima će se objasniti apsorpcija različitih polifenola iz voća (125).

Većina polifenola je vjerojatno previše hidrofilna da bi prošli stijenku crijeva pomoću pasivne difuzije, a transporteri kroz membrane koji su možda uključeni u apsorpciju polifenola još nisu identificirani. U hrani se svi flavonoidi, osim flavanola, nalaze u obliku glikozida, a glikozilacija utječe na apsorpciju. Sudbina glikozida u želucu nije još potpuno poznata. U želucu

je moguća apsorpcija nekih flavonoida kao što su kvercetin i daidzein, ali ne i njihovih glikozida. Većina glikozida vjerojatno preživi kiselinsku hidrolizu u želucu i stigne netaknuta do tankog crijeva. U tankom crijevu se mogu apsorbirati aglikoni i neki glukozidi, ali polifenoli vezani za ramnozu moraju doći do debelog crijeva gdje se, prije apsorpcije, moraju hidrolizirati pomoću ramnozidaze iz mikroflore. Isto vjerojatno vrijedi i za polifenole vezane za arabinozu i ksilozu. Pošto je apsorpcija slabija u debelom crijevu nego u tankom crijevu, zbog manje površine izmjene i manje gustoće transportnih mehanizama, glikozidi s ramnozom manje se i sporije apsorbiraju nego aglikoni i glukozidi. Ovo se jasno pokazalo u ispitivanjima provedenima na ljudima za kvercetin glikozide (57). Tako je apsorpcija kvercetin glukozida iz luka (52 %) bolja od apsorpcije čistog aglikona (24 %). Apsorpcija rutina (kvercetin-3-O-ramnozilglukozid) iznosi samo 17 % (33). Važan je zaključak da se glikozidi mogu apsorbirati u ljudskom organizmu bez prethodne hidrolize mikroorganizmima, a šećerni dio molekule kvercetin glikozida je važan u apsorpciji i biološkoj raspoloživosti (32). Osim kvercetina, dokazana je aposrpcija kemferola i izoramnetina (34).

Antocijanini se apsorbiraju u ljudskom organizmu u obliku glikozida (28-31,126), ali u vrlo maloj koncentraciji, obično 0,1 % (ili manje) od probavljene doze (28,29,127). Oni se pojavljuju u urinu nakon konzumacije bobičastog voća ili njihovih ekstrakata (28,29,31,127), a pronađeni su i u ljudskoj plazmi u vrlo maloj koncentraciji 0.5-1 sat nakon konzumacije, a njihova koncentracija se vraća na baznu unutar 6-8 sati (28,30,31,127). Apsorpcija antocijanina u obliku glikozida može se objasniti činjenicom da se glikozidi antocijanina ne hidroliziraju ß-glukozidazom koja se nalazi u tankom crijevu. Istraživanja na štakorima pokazuju da se apsorpcija antocijanina događa i u želucu kao i u tankom crijevu (125).

Istraživanja o biološkoj raspoloživosti hidroksicinamata u ljudskom organizmu su rijetka, ali preliminarni rezultati ukazuju na apsorpciju tih molekula. Prehrambeni hidroskicinamati sastoje se uglavnom od ferulične i kafeinske kiseline. Ferulična kiselina je kovalentno vezana za biljnu staničnu stijenku i posebno je rasprostranjena u netopivoj formi u žitaricama. Kafeinska kiselina je esterskom vezom vezana za kina kiselinu (topljiva klorogenska kiselina) i nalazi se u vrlo visokim razinama u kavi, ali i u voću (56). Kada se ove kiseline uzimaju u slobodnoj formi, apsorbiraju se brzo u tankom crijevu, no, apsorpcija esterificiranih oblika ovih kiselina je znatno smanjena u usporedbi s apsorpcijom slobodnih oblika. Tako se kafeinska kiselina puno bolje aposrbira nego klorogenska: 11 % unesene doze kafeinske kiseline izluči se urinom dok je razina izlučene klorogenske kiseline 0.3 %. Ferulična kiselina se isto slabije apsorbira u esterificiranom obliku, u usporedbi s apsorpcijom slobodnih oblika te kiseline (38,39,56).

Izomeri 3-hidroskibenzojeva kiselina i 4-hidroksibenzojeva kiselina su malo istraživani. Obje ove kiseline poznate su kao metaboliti mnogih prehrambenih fenola, a 4-hidroksibenzojeva kiselina i kao prirodni sastojak voća. Smatra se da se esteri 4-hidroksibenzojeve kiseline dobro apsorbiraju, ali da vrlo malo estera ulazi u plazmu. Takva istraživanja temeljena su isključivo na istraživanjima apsorpcije na životinjama (55).

Na apsorpciju polifenola mogu utjecati i ostali polifenolni spojevi prisutni u namirnici. Tako se pokazalo da apsorpciju cijanidin-3-glukozida inhibira prisutnost kvercetin-3-glukozid (128).

Na apsorpciju polifenola značajan utjecaj može imati i matriks voća, što do sada nije dovoljno istraženo. U voću se može dogoditi direktna interakcija između polifenola i nekih komponenata voća kao što su proteini i polisaharidi, a te interakcije mogu utjecati na apsorpciju. Osim toga, indirektan utjecaj voća na razne parametre u želucu (pH, intestinalna fermentacija itd.) mogu isto tako imati utjecaja na apsorpciju polifenola. Sastojci voća mogu, između ostalog, utjecati na enzime uključene u apsorpciju polifenola tj. mogu ih inhibirati ili inducirati. Do sada su izvršena neka istraživanja o utjecaju matriksa voćnih sokova, vina, čaja na apsorpciju polifenola. Pokazalo se da je apsorpcija kvercetina, katehina i resveratola u ljudima ekvivalentna kada se ti polifenoli unose u organizam u tri različita matriksa: soku od grožđa, bijelom vinu, te soku od povrća. Dodatak mlijeka u crni ili zeleni čaj ne utječe na biološku raspoloživost katehina, kvercetina ili kemferola u ljudima. Alkohol u vinu nema utjecaj na apsorpciju katehina, ali utječe na eliminaciju polifenola jer je pronađeno da se 20 % više metabolita katehina izluči urinom nakon konzumacije crvenog vina nego nakon konzumacije dealkoholiziranog vina (57).

2.13. Osobine voća bitne za zdravlje ljudi

Voće je bogat prehrambeni izvor vlakana, esencijalnih vitamina i minerala. Osim ovih visokovrijednih sastojaka, u voću se nalazi velika količina polifenolnih spojeva koji, iako nisu esencijalni za ljudsko zdravlje i ne razvijaju znakove nedostatka u prehrani, imaju značajnu fiziološku ulogu u ljudskom organizmu (125).

Utjecaj polifenolnih spojeva na smanjenje rizika od nastanka kroničnih srčanih bolesti prvi puta je istraživana u 7 zemalja u vremenskom periodu od 25 godina. Prva bazna mjerenja izvršena su 1960-te godine, a pronađeno je da je prosječan kombinirani unos flavonola i flavona iz različitih prehrambenih izvora, uključujući voće, suprotno povezan sa smanjenjem smrtnosti od srčanih bolesti tj. da povećan unos flavonoida može djelomično doprinositi smanjenu rizika od razvoja krvožilnih bolesti (129). Ovi zaključci potvrđeni su daljnjim istraživanjima. Pokazalo

se da unos flavonoida iz različitih prehrambenih izvora, uključujući i voće, utječe na smanjenje rizika od nastanka različitih kroničnih oboljenja (130), krvožilnih bolesti (131) i raka pluća (132).

Neka istraživanja usmjerena su samo na voće kao bogat izvor polifenola. Utvrđeno je da povećan unos voća bogatog flavonoidima pokazuje inverznu (suprotnu) vezu s rizikom od srčanih bolesti (11). Zaštitni utjecaj voća pokazao se i kod smanjenja rizika od nastanka raka želuca (12) i raka pluća (13), a flavonoidi prisutni u voću djelomično su odgovorni za ovakav pozitivan utjecaj. Mehanizmi prema kojima polifenolni spojevi iz voća djeluju u ljudskom organizmu još nisu do kraja poznati te su provedena neka istraživanja da bi se razjasnilo moguće djelovanje polifenola. Tako je utvrđeno da ekstrakti voća i fenolni spojevi u njima pokazuju antimikrobno djelovanje (133-135) te antimutageno djelovanje (15,24,136). Različite grupe fenolnih spojeva iz borovnice djeluju kemopreventivno u različitim stupnjevima razvoja raka (14). Antocijanini mogu smanjiti invazivnost stanica raka *in vitro* i zbog toga su bitni u razvijanju moguće terapije protiv raka (25). Nadalje, pronađeno je da se antocijanini iz bazge mogu uklopiti u endotelne stanice žila te ih zaštiti od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom (137). Voćni sok bogat polifenolima stimulira imunološki sustav, smanjuje štetu na DNA molekulama uzrokovanu oksidacijom i pojačava antioksidativni status. U dugom vremenskom periodu ovi biološki utjecaji vjerojatno mogu smanjiti rizik od bolesti kao što su rak ili bolesti krvožilnog sustava (16). Zbog ovakvih pozitivnih utjecaja na zdravlje, istraživanja na polifenolnim spojevima voća i dalje se nastavljaju. Cilj je objasniti kako polifenoli iz voća djeluju *in vivo*, u kojoj mjeri se apsorbiraju u ljudskom organizmu, koja je njihova uloga kao snažnih antioksidansa te koje su djelotvorne koncentracije polifenola. Istraživanjima u ovom radu cilje je razjasniti kakvo je antioksidacijsko djelovanje različitih polifenolnih tvari iz voća te objasniti koji polifenoli najviše pridonose ukupnom antioksidacijskom kapacitetu voća.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak u ovom radu bio je:

- provesti karakterizaciju polifenolnih spojeva koji su prisutni u deset vrsta tamno-obojenog sitnog voća (borovnica, bobice bazge, crni i crveni ribiz, aronija, malina, kupina, trešnja, višnja i jagoda) primjenom spektroskopskih i kromatografskih tehnika. Od spektroskopskih metoda upotrijebljena je Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola te pH-diferencijalna metoda za određivanje ukupnih antocijanina. Pojedinačni polifenolni spojevi voća određeni su primjenom HPLC metoda koje su validirane za kvantitativno i kvalitativno određivanje:
  - -antocijanina
  - -flavonola (miricetin, kvercetin, kemferol),
  - -flavanola ((+)-katehin i (-)-epikatehin)
  - -hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinska, kafeinska, ferulična)
  - -hidroksibenzojevih kiselina (*p*-hidroksibenzojeva, elaginska kiselina) u voću.
- odrediti antioksidacijsku aktivnost voća primjenom dvije različite metode: $DPPH^{\cdot}$ i $ABTS^{\cdot+}$ metode.
- istražiti kakav utjecaj imaju polifenolni spojevi na ukupnu antioksidacijsku aktivnost ispitivanog voća traženjem korelacije između sadržaja pojedinih polifenola u voću i antioksidacijske aktivnosti voća te između sadržaja određenih grupa polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Uzorci voća

Bobičasto, jagodasto i koštuničavo voće korišteno u ovom radu navedeno je u tablici 5. Voće je ubrano na području Slavonije u periodu 2003. i 2004. godine u stadiju konzumne zrelosti, zamrznuto je na -20°C i čuvano do analize. Uzorci voća su za sve analize pripremani u paralelama.

Tablica 5. Klasifikacija ispitivanog bobičastog, jagodastog i koštuničavog voća

Voće	Porodica	Rod	Vrsta
Crveni ribiz	*Saxifragaceae*	*Ribes*	*Ribes sativum*
Crni ribiz	*Saxifragaceae*	*Ribes*	*Ribes nigrum*
Aronija	*Rosaceae*	*Aronia*	*Aronia melanocarpa*
Kupina	*Rosaceae*	*Rubus*	*Rubus fruticosus*
Malina	*Rosaceae*	*Rubus*	*Rubus idaeus*
Trešnja	*Rosaceae*	*Prunus*	*Prunus avium*
Višnja	*Rosaceae*	*Prunus*	*Prunus cerasus*
Jagoda	*Rosaceae*	*Fragaria*	*Fragaria anannassa*
Borovnica	*Ericaceae*	*Vaccinium*	*Vaccinium myrtillus*
Bazga	*Caprifoliaceae*	*Sambucus*	*Sambucus nigra*

3.2.2. Kemikalije

U ovom radu korišteni su standardi antocijanina; cijanidin-3-*O*-glukozid klorid (kuromanin chloride 0915 S), cijanidin-3-*O*-rutinozid klorid (keracyanin chloride 0914 S), delfinidin-3-*O*-glukozid klorid (myrtillin chloride 0938), pelargonidin-3-*O*-glukozid klorid (callistephin chloride 0907S), peonidin-3-*O*-glukozid klorid 0929) i malvidin-3-*O*-glukozid klorid (Extrasynthese, Genay, Francuska). Standardi; 4-hidroksibenzojeva kiselina (H5376), elaginska kiselina (E2250), kafeinska kiselina (C0625), ferulična kiselina (F3500), *p*-kumarinska kiselina (C9008), miricetin (M6760), kvrcetin dihidrat (Q0125), kemferol (K0133), (-)-epikatehin, (+)-katehin, $DPPH^{\bullet}$ radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal-D9132), ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina-A1888) i Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina-56510) nabavljeni su u firmi Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), metanol (HPLC čistoće) u firmi Merck (Darmstadt, Njemačka), a orto-fosforna kiselina (85%, HPLC čistoće) kupljena je u firmi Fluka (Buchs, Švicarska). Kloridna kiselina (36.5 %), kalijev klorid, natrijev acetat trihidrat, natrijev karbonat, L-(+)-askorbinska kiselina i Folin- Ciocalteu reagens proizvedeni su u firmi Kemika (Zagreb, Hrvatska).

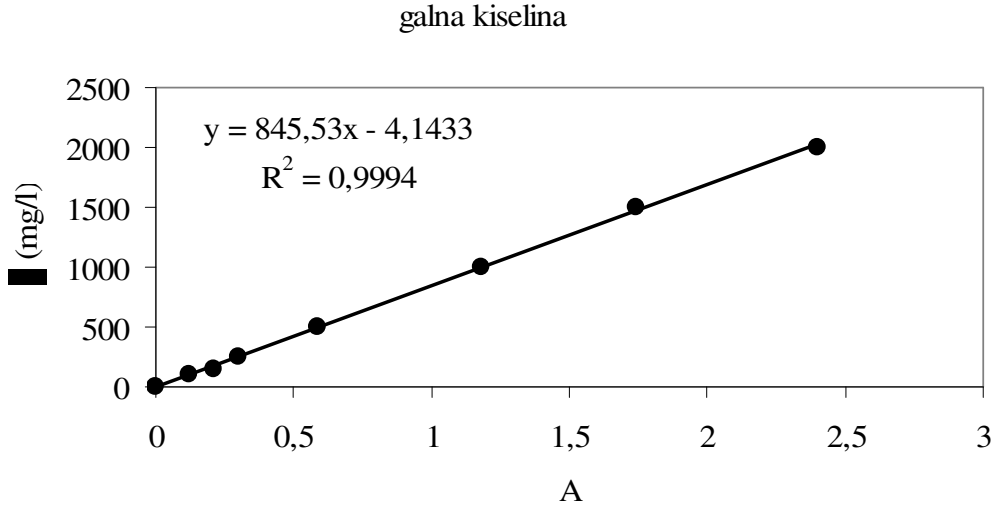
3.2.3. Priprema ekstrakta voća za analizu ukupnih antocijanina, ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje ukupnih antocijanina, ukupnih polifenola te antioksidacijske aktivnosti ekstrakti voća su pripremljeni po metodi koja je ranije opisana u literaturi (3).

Smrznuto voće ostavljeno je na sobnoj temperaturi u vremenu od 15 minuta da se odledi prije eksperimenta. Oko 50 g voća samljeveno je u mikseru da bi se dobio homogeni uzorak. 20 g homogenog uzorka voća ekstrahirano je s 20 ml otopine metanol / 2 % HCl (95:5 v/v). Otopina je ostavljena da stoji na tamnom 60 minuta te je nakon 60 minuta stajanja filtrirana vakuum filtracijom. Filtrat je sakupljen u odmjernu tikvicu volumena 50 ml. Ostatak je ekstrahiran još jednom istim postupkom. Dva ekstrakta su spojena u odmjernoj tikvici koja je nadopunjena do konačnog volumena od 50 ml s otopinom metanol / 2 % HCl (95:5 v/v).

3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli u ekstraktima voća određeni su Folin-Ciocalteu mikro metodom (138). Ekstrakti crnog ribizla, aronije, borovnice i bazge razrijeđeni su prije mjerenja s destiliranom vodom u omjeru 1:4 (v/v). Ostali ekstrakti voća analizirani se bez razrijeđenja. Alikvotu ekstrakta (20 µl) dodana je destilirana voda (1580 µl) i Folin-Ciocalteu reagens (100 µl). U tu otopinu dodano je 300 µl natrijevog karbonata (200 g l^{-1}). Nakon inkubacije na 40 °C u vodenoj kupelji, u vremenu od 30 minuta, očitana je apsorbancija (*A*) otopine nasuprot slijepoj probi na 765 nm. Rezultati su izraženi u mg galne kiseline (*GAE-gallic acid equivalents*) po kg svježeg voća, uz upotrebu kalibracijske krivulje galne kiseline (slika 14).



Slika 14. Kalibracijska krivulja galne kiseline za određivanje ukupnih polifenolnih spojeva u voću

3.2.5. Određivanje ukupnih antocijanina pH diferencijalnom metodom

Sadržaj ukupnih antocijanina u voću određen je pH diferencijalom metodom (65). Ekstrakti voća razrijeđeni su s otopinom pufera kalijevog klorida pH vrijednosti 1.0 (1.86 g KCl u 1 l destilirane vode, pH vrijednost namještena je na 1.0 s koncentriranom HCl) te s otopinom pufera natrijevog acetata pH vrijednosti 4.5 (54.43 g $CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$ u 1 l destilirane vode, pH vrijednost podešena je na 4.5 s koncentriranom HCl) prema prije određenom faktoru razrijeđenja (*DF*) (crveni ribiz, malina, jagoda 10; kupina, višnja, trešnja 20; crni ribiz, borovnica, aronija, bazga 100).

$$DF = \frac{V(ukupno)}{V(ekstraktavoca)} \qquad (1)$$

Nakon 15 min izmjerena je apsorbancija svakog razrijeđenja na valnoj duljini 510 i 700 nm (A_{510}, A_{700}) na spektrofotometru (UV 2005, Barcelona, Španjolska). Apsorbancija uzorka (*A*) izračunata je prema slijedećoj formuli:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}} \qquad (2)$$

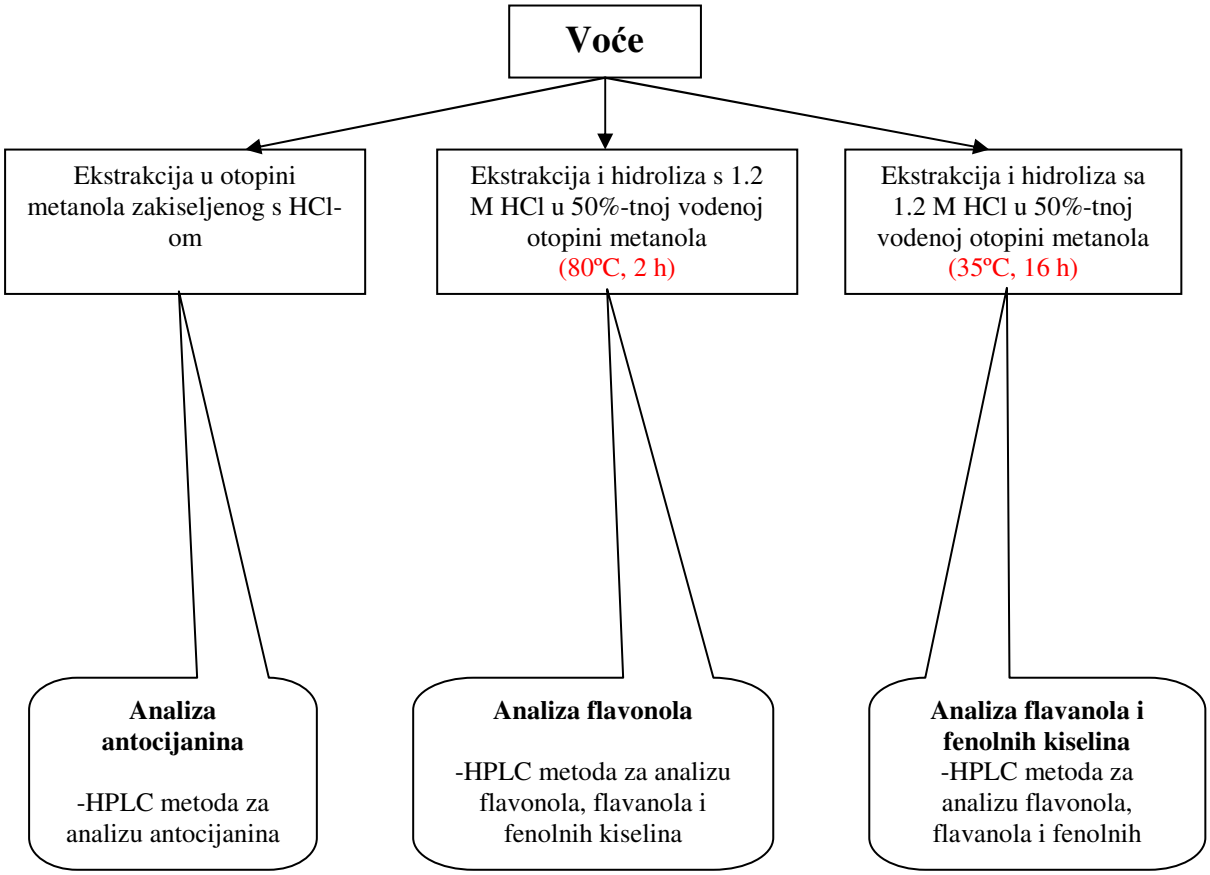
Količina antocijanina izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Ukupni antocijanini (mg/l)} = (A \times MW \times DF \times 1000)/(\varepsilon \times l) \qquad (3)$$

Rezultati su izraženi u mg cijanidin-3-glukozida po kilogramu svježeg voća upotrebljavajući molarni ekstinkcijski koeficijent (ε) cijanidin-3-glukozida (26 900 l mol^{-1} cm^{-1}) i relativnu molekularnu masu (*MW*) cijanidin-3-glukozida (449.2 g mol^{-1}) (65).

3.2.6. Određivanje polifenola HPLC metodom

Pripremljena su tri ekstrakta svakog voća, jedan za analizu antocijanina u kojem su antocijanini prevedeni u formu flavilijevog kationa, drugi za analizu flavonola u kojem su flavonoli hidrolizom s 1.2 M HCl prevedeni u formu aglikona, a treći za analizu flavanola i fenolnih kiselina u kojem su fenolne kiseline hidrolizom s 1.2 M HCl prevedene u odgovarajuće aglikone. U analizi pripremljenih ekstrakata korištene su dvije HPLC metode. Jedna je pogodna za analizu antocijanina, a druga za analizu flavonola, flavanola i fenolnih kiselina. Plan ekstrakcije polifenola iz voća te primjena dvije HPLC metode prikazan je na slici 15:



Slika 15. Plan ekstrakcije i analize polifenolnih spojeva iz voća

3.2.6.1. Priprema voća za analizu antocijanina pomoću HPLC metode

Smrznuto voće ostavljeno je na sobnoj temperaturi u vremenu od 15 min da se odledi prije eksperimenta. Oko 50 g voća samljeveno je u mikseru da bi se dobio homogeni uzorak. 20 g homogenog uzorka voća ekstrahirano je s 20 ml otopine metanol / 2 % HCl (95:5 v/v). Otopina je ostavljena da stoji na tamnom 60 min, te filtrirana vakuum filtracijom u odmjernu tikvicu volumena 50 ml. Ostatak je ekstrahiran još jednom istim postupkom. Dva ekstrakta su spojena u odmjernoj tikvici koja je nadopunjena do konačnog volumena 50 ml s otopinom metanol / 2 % HCl (95:5 v/v) (3).

3.2.6.2. Ekstrakcija i hidroliza flavonola

Metoda za ekstrakciju i hidrolizu flavonoida ranije razvijena (60) modificirana je za ekstrakciju i hidrolizu ne-antocijanidnih flavonoida (flavonola i katehina) i fenolnih kiselina (61) te je primjenjena u ovom radu s daljnjim promjenama.

Zaleđeno voće ostavljeno je stajati da se odmrzne na sobnoj temperaturi u vremenu od 15 minuta. Oko 50 g voća samljeveno je u mikseru da bi se dobio homogeni uzorak. Askorbinska kiselina (80 mg) otopljena je u 5 ml destilirane vode te joj je dodano 5 g homogenog uzorka voća, 25 ml metanola i 10 ml 6 M otopine HCl. Otopina je nadopunjena destiliranom vodom da bi se dobio konačni volumen od 50 ml i konačna koncentracija HCl 1.2 M. Refluks je proveden na vodenoj kupelji na 85˚C u vremenu od 2 sata. Dobiveni ekstrakt filtriran je vakuum filtracijom, a 20 ml filtrata ispareno je u rota-vaporu do suha na temperaturi 35˚C. Ostatak je otopljen u 2 ml metanola, filtriran kroz filter veličine pora 0.45 μm (VariSep PTFE, 0.45 μm, 25 mm-Varian) te analiziran HPLC metodom isti dan, odmah nakon pripreme.

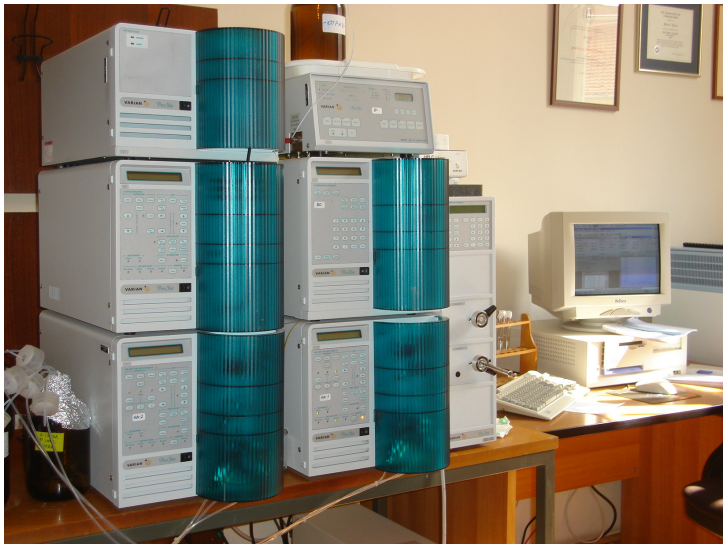
3.2.6.3. Ekstrakcija i hidroliza flavanola i fenolnih kiselina

Metoda za ekstrakciju i hidrolizu flavonola i fenolnih kiselina ranije razvijena (60,61) primjenjena je i u ovom radu.

Zamrznuto voće ostavljeno je stajati da se odmrzne na sobnoj temperaturi u vremenu od 15 minuta. Oko 50 g voća samljeveno je u mikseru da bi se dobio homogeni uzorak. Askorbinska kiselina (80 mg) otopljena je u 5 ml destilirane vode te joj je dodano 5 g homogenog uzorka voća, 25 ml metanola i 10 ml 6 M otopine HCl. Otopina je nadopunjena destiliranom vodom da bi se dobio konačni volumen od 50 ml i konačna koncentracija HCl 1.2 M. Proveden je refluks te otopine na vodenoj kupelji na 35˚C u vremenu od 16 sati. Dobiveni ekstrakt je filtriran vakuum filtracijom, a 20 ml filtrata ispareno na rota-vaporu do suha pri temperaturi 35˚C. Ostatak je otopljen u 2 ml metanola, filtriran kroz filter veličine pora 0.45 μm (VariSep PTFE, 0.45 μm, 25 mm-Varian) te analiziran HPLC metodom isti dan, odmah nakon pripreme.

3.2.6.4. HPLC analitički sustav

Analize antocijanina, flavonola, flavanola i fenolnih kiselina izvedena je na HPLC analitičkom sustavu (Varian, USA) (slika 16) koji se sastoji od ProStar 230 pumpe, ProStar 310 UV-Vis detektora i ProStar 330 PDA detektora. Separacija polifenolnih spojeva izvedena je na OmniSpher C18 koloni (unutrašnjeg promjera 250 x 4.6 mm, promjer čestica 5 μm, Varian, USA) koja je zaštićena pretkolonom (ChromSep 1 cm x 3 mm, Varian, USA). Podaci su prikupljeni i obrađeni na IBM kompjuterskom sustavu s instaliranim softwerom Star Chromatography Workstation (verzija 5.52).



Slika 16. HPLC analitički sustav

3.2.6.5. HPLC metoda za analizu antocijanina

Antocijanini su razdvojeni reverzno-faznom HPLC metodom primjenom 0.5 % fosforne kiseline kao mobilne faze A te 100 %-nog metanola kao mobilne faze B. Uvjeti analize prikazani su u tablici 6. Period re-ekvilibracije između pojedinih analiza bio je 10 minuta. Kromatogrami su snimani na sobnoj temperaturi. Antocijanini su karakterizirani na osnovi UV/Vis spektara snimanih unutar valnih duljina 190-600 nm. Valna duljina očitanja bila je 520 nm.

3.2.6.6. HPLC metoda za analizu flavonola, flavanola i fenolnih kiselina

Flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline razdvojeni su reverzno-faznom HPLC metodom primjenom 0.1 % fosforne kiseline kao mobilne faze A te 100 %-nog metanola kao mobilne faze B. Uvjeti analize prikazani su u tablici 6. Period re-ekvilibracije između pojedinih analiza bio je 10 minuta. Spektar je sniman u području valnih duljina od 190 do 600 nm. Elaginska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina detektirane su na valnoj duljini 260 nm, (+)-katehin i (-)-epikatehin na 280 nm, kafeinska, *p*-kumarinska i ferulična kiselina na 320 nm, a miricetin, kvercetin i kemferol na 360 nm.

Tablica 6 Uvjeti HPLC metoda za analizu antocijanina te flavonola, flavanola i fenolnih kiselina

	Uvjeti analize
HPLC metoda za analizu antocijanina	A=0.5 % H_3PO_4, B=100 % metanol 0 min 97%A 3%B 38 min 35%A 65%B 45 min 35%A 65%B Protok 1 ml/min 20°C Volumen injektiranja 10 µl
HPLC metoda za analizu flavonola, flavanola i fenolnih kiselina	A=0.1 % H_3PO_4, B=100 % metanol 0 min 95%A 5%B 30 min 20%A 80%B 33 min 20%A 80%B 35 min 95%A 5%B Protok 0.8 ml/min 20°C Volumen injektiranja 10 µl

3.2.6.7. Validacija HPLC metoda

Da bi se HPLC metode validirale te primjenile za kvalitativno i kvantitativno određivanje polifenola u voću, provedeni su slijedeći postupci:

-određivanje linearnosti metoda,

-određivanje granica detekcije (LOD) (*engl.Llimit of Detection*)

-određivanje granica kvantifikacije (LOQ) (*engl. Limit of Quantification*)

-određivanje preciznosti metoda,

-određivanje točnosti metoda,

-određivanje selektivnosti metoda

Linearnost metode definira se kao mogućnost metode da, unutar danog područja, daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. U ovom radu je linearnost HPLC metode za određivanje antocijanina te HPLC metode za određivanje flavonola, flavanola i fenolnih kiselina ispitana analiziranjem dvije paralele čistih standarda na pet koncentracijskih razina (cijanidin-3-glukozid 1-100 mg l^{-1}, delfinidin-3-glukozid 1-100 mg l^{-1} , cijanidin-3-rutinozid 0.5-200 mg l^{-1}, malvidin-3-glukozid 0.96-96 mg l^{-1}, peonidin-3-glukozid 5-100 mg l^{-1}, pelargonidin-3-glukozid 1-100 mg l^{-1}, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, kafeinska kiselina, miricetin, kaempferol 1-80 mg l^{-1}, elaginska ksielina, ferulična kiselina, kvercetin 1-250 mg l^{-1}, *p*-kumarinska kiselina 2-240 mg l^{-1}, (+)-katehin, (-)-epikatehin 1-100 mg l^{-1}). Rezultati ovih mjerenja obrađeni su linearnom regresijom da bi se dobila kalibracijska krivulja svakog polifenolnog spoja, a

prikazani su kao jednadžbe pravaca svake kalibracijske krivulje te u obliku koeficijenta determinacije (r^2).

Granica detekcije (LOD) definira se kao najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati primjenom HPLC metoda, a određena je na bazi standardne devijacije svake kalibracijske krivulje i nagiba kalibracijskog pravca.

$$LOD = 3{,}3 \cdot \sigma / a \qquad (4)$$

σ = standardna devijacija y-odsječaka kalibracijskog pravca

a = nagib kalibracijskog pravca

Granica kvantifikacije (LOQ) definira se kao najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost, a određena je na bazi standardne devijacije svake kalibracijske krivulje i nagiba kalibracijskog pravca.

$$LOQ = 10 \cdot \sigma / a \qquad (5)$$

σ = standardna devijacija y-odsječaka kalibracijskog pravca

a = nagib kalibracijskog pravca

Preciznost metode definira se kao slaganje između niza mjerenja izvedenih na istom homogenom uzorku pod propisanim uvjetima. Određena je preko parametra ponovljivosti (*engl. repeatability*) koji se još naziva i „intra-assay" preciznost tako što je isti uzorak voća analiziran tri ili šest puta u jednom danu. Površina pikova izražena je kao srednja vrijednost svih mjerenja, a preciznost je izražena preko koeficijenta varijacije površine pikova (KV).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (6)$$

σ = standardna devijacija

x_i = površina pika

$\bar{x}$ = srednja vrijednost površine pika iz svih mjerenja

n = broj mjerenja

$$KV = \frac{100 \cdot \sigma}{\bar{x}} \qquad (7)$$

KV = koeficijent varijacije

Granica prihvatljivosti za određivanje preciznosti bioloških ili prehrambenih uzoraka iznosi 2-20 % (KV)

Točnost metode definira se kao stupanj podudarnosti između stvarne, tj. referentne vrijednosti za količinu nekog analita i srednje vrijednosti količine dobivene HPLC metodom određeni broj puta. U ovom slučaju obje HPLC metode ispitane su dodavanjem standarda (*engl.*

spiking) polifenola u uzorke voća u rasponu od 50-150 % od već pronađene količine. Uspoređena je količina dodanog i količina nađenog spoja nakon analize. Rezultati su prikazani kao postotak iskorištenja (*engl. recovery*).

$$Iskorištenje = \frac{(m_s - m_u)}{m_d} * 100 \qquad (8)$$

m_s=masa spoja u uzorku u koji je dodan standard / mg kg^{-1}

m_u=masa spoja u uzorku / mg kg^{-1}

m_d=masa dodanog spoja / mg kg^{-1}

Općenito se može reći da je selektivna metoda ona kojom se može odrediti više analita. To je mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti komponenti koje se mogu očekivati u matriksu uzorka (onečišćenja). Identifikacija je jedan od načina određivanja selektivnosti metode te se selektivnost prikazuje u obliku kromatograma uzorka, usporedbe spektara uzorka i spektara standarda te prikazom čistoće spektara pojedinih pikova iz uzorka. U ovom radu prikazani su kromatogrami uzoraka voća, a čistoća pojedinih pikova tj. njihovi spektri dani su u prilogu doktorskog rada.

3.2.6.8. Identifikacija i kvantifikacija polifenola

Antocijanini su identificirani na valnoj duljini 520 nm, flavonoli na 360 nm, flavanoli na 280 nm, hidroksibenzojeve kiseline na 260 nm te hidroksicimetne kiseline na 320 nm. Identifikacija antocijanina provedena je dodavanjem standarda antocijanina (cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid, peonidin-3-glukozid, malvidin-3-glukozid, delfinidin-3-glukozid, pelargonidin-3-glukozid) u uzorke voća, usporedbom spektara antocijanina iz voća sa spektrima čistih standarda u području od 190 do 600 nm te usporedbom retencijskih vremena. Dodatni podatci za identifikaciju dobiveni su slaganjem profila antocijanina određenog voća s profilima antocijanina već objavljenima u literaturi. Kvantifikacija antocijanina provedena je na osnovi kalibracijske krivulje cijanidin-3-glukozida te su količine svakog pojedinog antocijanina izražene u mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida po kg svježeg voća. Ukupna količina antocijanina dobivena je zbrajanjem količine svakog pojedinog antocijanina.

Identifikacija flavonola, flavanola i fenolnih kiselina provedena je dodavanjem standarda (*p*-hidroksibenzojeva, elaginska, kafeinska, *p*-kumarinska, ferulična kiselina; (+)-katehin, (-)-epikatehin; kvercetin, miricetin, kaempferol) u uzorke voća, usporedbom spektara polifenola iz voća sa spektrima čistih standarda u području od 190 do 600 nm te usporedbom retencijskih vremena. Kvantifikacija je provedena na osnovi kalibracijskih krivulja standardnih spojeva.

Zbrajanjem količina pojedinih flavonola, flavanola ili fenolnih kiselina, dobivene su količine ukupnih flavonola, ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih hidroksibenzojevih kiselina te ukupnih flavanola.

3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost voćnih ekstrakata određena je spektrofotometrijski na UV-Vis spektrofotometru (UV2005, Barcelona, Španjolska) upotrebom dviju metode; DPPH metode koja za radikal koristi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (3) i ABTS metode koja kao radikal koristi 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) (114). Sposobnost voćnog ekstrakta da djeluje kao hvatač slobodnog sintetičkog $DPPH^{\bullet}$ radikala mjerena je smanjenjem aposrbancije na valnoj duljini 517 nm nakon dodatka voćnog ekstrakta te je to smanjenje apsorbancije uspoređeno sa smanjenjem apsorbancije koje je uzrokovano dodavanjem poznatih količina Troloxa, analoga vitamina E koji je topljiv u vodi, pod istim uvjetima analize. U ABTS metodi količina $ABTS^{\bullet+}$ kationa radikala koga je vezao voćni ekstrakt mjerena je praćenjem smanjenja apsorbancije $ABTS^{\bullet+}$ kationa radikala na 734 nm i usporedbom smanjenja apsorbancije sa smanjenjem apsorbancije koje je nastalo dodatkom poznatih količina Troloxa.

3.2.7.1. DPPH metoda

Za mjerenja je priređeno pet razrijeđenja svakog ekstrakta voća. Reakcijska otopina priređena je miješanjem 50 μl razrijeđenog ekstrakta voća s 300 μl metanolne otopine DPPH (1mM) i 2650 μl metanola. Reakcijska otopina čuvana je na tamnom mjestu, na sobnoj temperaturi 15 minuta te je mjerena apsorbancija ($A_{extract}$) na 517 nm nasuprot slijepe probe (50 μl razrijeđenog voćnog ekstrakta, 2950 μl metanola). Slijepa proba DPPH otopine pripremana je svaki dan (300 μl 1mM $DPPH^{\cdot}$ otopine, 2.7 ml metanola) i njena apsorbancija (A_{DPPH}) je mjerena svaki dan. Standardne otopine Trolox-a (analog vitamina E) koncentracije 0-2500 μM pripremljene su u metanolu i mjerene pod istim uvjetima kao i uzorci voća. 50 μl Trolox-a (0-2500 μM) pomiješano je s 300 μl metanolne otopine DPPH (1mM) i 2650 μl metanola. Nakon 15 minuta očitana je apsorbancija Trolox-a (A_{Trolox}) nasuprot slijepe probe na 517 nm. Kalibracijska krivulja Trolox-a konstruirana je linearnom regresijom vrijednosti apsorbancije Trolox-a (A_{Trolox}) nasuprot koncentracije Trolox-a (0-2500 μM). Ova kalibracijska krivulja upotrebljavana je za računanje antioksidacijske aktivnosti svakog razrijeđenja voćnog ekstrakta a

antioksidacijska aktivnost svakog razrijeđenja voćnog ekstrakta izražena u μmol Trolox equivalenta (TE) po g voća (μmol TE/g).

Osim toga, izračunat je i postotak inhibicije DPPH$^{\bullet}$ radikala koji je uzrokovan svakim razrijeđenjem voćnog ekstrakta, prema slijedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_{DPPH}-A_{Exstr})/A_{DPPH})]x100 \quad (9)$$

Postotak inhibicije DPPH$^{\bullet}$ radikala uzrokovan svakim razrijeđenjem voćnog ekstrakta stavljen je u odnos s izračunatom antioksidacijskom aktivnošću (μmol TE/g). Upotrebljavajući dobivenu krivulju, konačni rezultati antioksidacijske aktivnosti izraženi su kao μmol TE po g voća koji su potrebni da reduciraju DPPH$^{\bullet}$ radikal za 50 %.

3.2.7.2. ABTS metoda

Kation ABTS radikala (ABTS$^{\bullet+}$) stvoren je kemijskim putem miješajući 0.2 ml amonijevog peroksodisulfata (65 mM) s 50 ml ABTS otopine (1 mM, pripremljena u 0.1 M fosfatnom puferu pH=7.4) (116). Otopina je ostavljena da stoji preko noći da bi se razvio kation radikala (ABTS$^{\bullet+}$).

Pripremljeno je pet različitih razrijeđenja voćnog ekstrakta svake vrste voća. U kiveti je pomiješano 0.5 ml ABTS otopine i 2 ml fosfatnog pufera (pH=7.4), očitana je apsorbancija (A_{ABTS}) na 734 nm te je u reakcijsku otopinu dodano 0.1 ml razrijeđenog voćnog ekstrakta. Otopina je brzo promiješana te je nakon 60 s očitana apsorbancija (A_{extr}) na 734 nm. Izračunato je smanjenje apsorbancije ($\Delta A=A_{ABTS}-A_{extr}$) svakog razrijeđenja voćnog ekstrakta nakon 60 sekundi. Trolox je upotrijebljen kao standard i u ovoj metodi. Smanjenje apsorbancije ABTS otopine uzrokovano Trolox-om (0-400 μM) mjereno je prema istom postupku. O.5 ml ABTS otopine i 2 ml fosfatnog pufera (pH=7.4) pomiješano je u kiveti, očitana je apsorbancija otopine (A_{ABTS}) na 734 nm. U kivetu je, tada, dodano 0.1 ml Trolox-a, otopina je brzo pomiješana i apsorbancija (A_{trolox}) je očitana nakon 60 sekundi na 734 nm. Smanjenje apsorbancije izračunato je prema slijedećoj formuli: ($\Delta A_{Trolox}=A_{ABTS}-A_{trolox}$). Kalibracijska krivulja Trolox-a konstruirana je linearnom regresijom vrijednosti smanjenja apsorbancije Trolox-a (ΔA_{trolox}) nasuprot koncentracije Trolox-a (0-400 μM). Ova kalibracijska krivulja upotrijebljena je za računanje antioksidacijske aktivnosti svakog razrijeđenja voćnog ekstrakta te je antioksidacijska aktivnost svakog razrijeđenja voćnog ekstrakta izražena u μmol Trolox equivalenta (TE) po g voća (μmol TE/g).

Osim toga, izračunat je i postotak inhibicije ABTS$^{\bullet+}$ radikal-kationa koji je uzrokovan svakim razrijeđenjem voćnog ekstrakta, prema slijedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibition}=[(A_{ABTS}-A_{Exstr})/A_{ABTS})]x100 \quad (10)$$

Postotak inhibicije $ABTS^{\bullet}$ radikal-kationa uzrokovan svakim razrijeđenjem voćnog ekstrakta stavljen je u odnos s izračunatom antioksidacijskom aktivnošću (μmol TE/g). Upotrebljavajući dobivenu krivulju, konačni rezultati antioksidacijske aktivnosti izraženi su kao μmol TE po g voća koji su potrebni da reduciraju ABTS radikal-kation za 50 %.

3.3. Statistička analiza

Analiza korelacije i regresije izvedena je pomoću kompjutorskog programa Statistica 7.1 (Statsoft, Tulsa, USA). Razlike na $p \leq 0.05$ smatrane su značajnima.

4. REZULTATI

4.1. Ukupni polifenoli i ukupni antocijanini u voću

U tablici 7 prikazane su količine ukupnih polifenola (UP) i ukupnih antocijanina (UA) u ispitivanom voću koje su određene primjenom spektrofotometrijskih metoda: Folin-Ciocalteu i pH-diferencijalnom metodom. U istoj tablici prikazani su podaci za omjer UA/UP.

Tablica 7. Količina ukupnih polifenola (UP) (mg GAE kg^{-1})[a], ukupnih antocijanina (UA) (mg CGE kg^{-1})[a], te omjer ukupnih antocijanina i ukupnih polifenola (UA/UP)

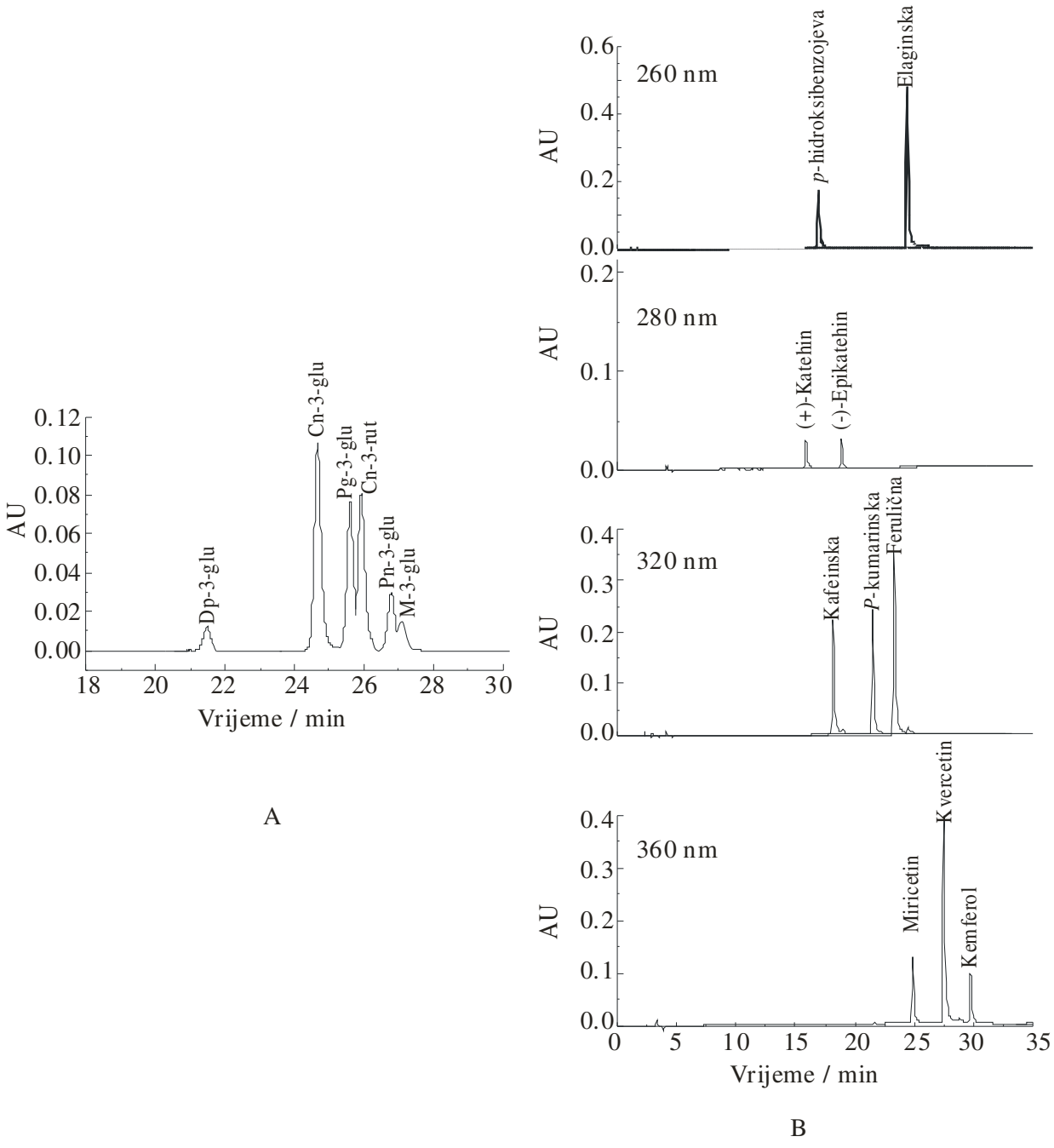
Voće	Ukupni Polifenoli (mg kg^{-1})	Ukupni Antocijanini (mg kg^{-1})	Omjer UA/UP
Porodica Ericaceae			
Borovnica	6180.23 ± 157	**4069.03 ± 129**	0.66
Porodica Rosaceae			
Kupina	3657.57 ± 167	1055.70 ± 31	0.29
Aronija	**7194.40 ± 78**	3571.96 ± 48	0.50
Jagoda	1999.24 ± 88	169.17 ± 2	0.08
Malina	1763.19 ± 71	231.72 ± 1	0.13
Trešnja	2010.67 ± 50	192.52 ± 13	0.10
Višnja	2904.54 ± 101	1145.89 ± 37	0.39
Porodica Caprifoliaceae			
Bazga	4415.33 ± 124	3175.14 ± 34	0.72
Porodica Saxifragaceae			
Crni ribiz	5435.06 ± 31	2189.26 ± 20	0.40
Crveni ribiz	1947.94 ± 23	197.76 ± 2	0.10

[a]srednje vrijednosti tri mjerenja ± standardna devijacija (SD)
GAE-ekvivalent galne kiseline (*engl. gallic acid equivalent*)
CGE-ekvivalent cijanidin-3-glukozida (*engl. cyanidin-3-glucoside equivalent*)

4.2. Antocijanini, flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću

4.2.1. Validacija HPLC metoda, identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva u voću

Slika 17 A prikazuje kromatogram standarda antocijanina koji su razdvojeni HPLC metodom za analizu antocijanina, a razdvojeni standardi flavonola, flavanola i fenolnih kiseline prikazani su na slici 17 B. Rezultati validacije HPLC metoda dani su u tablicama 8, 9a, 9b i 10. Na slikama 18, 19, 20 i 21 prikazani su primjeri kromatograma nekih uzoraka voća u koje su dodani standardi polifenola u svrhu identifikacije tih spojeva preklopljeni sa kromatogramima voća bez dodanih standarda.



Slika 17. Kromatogrami A) standarda antocijanina (520 nm) te B) standarda flavonola, flavanola i fenolnih kiselina snimljeni na 260, 280, 320 i 360 nm.

Tablica 8. Linearnost[a], granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) HPLC metoda

Standardi	Valna duljina (nm)	Retencijsko vrijeme (min)	Raspon koncentracija (mg l^{-1})	Nagib	Odsječak na osi y	r^2	LOD (mg l^{-1})	LOQ (mg l^{-1})
HPLC METODA ZA ANALIZU ANTOCIJANINA								
cijanidin-3-glukozid	520	23.69	1-100	20635	-23716	0.9996	0.64	1.92
cijanidin-3-rutinozid	520	26.05	0.5-200	15578	-20692	0.9997	1.18	3.54
peonidin-3-glukozid	520	26.98	5-100	13530	-6085.7	0.9996	0.41	1.23
malvidin-3-glukozid	520	27.15	0.96-96	33059	-47153	0.9958	0.09	0.27
delfinidin-3-glukozid	520	21.55	1-100	17256	-22213	0.9965	0.35	1.05
pelargonidin-3-glukozid	520	24.93	1-100	18253	-25451	0.9996	0.92	2.76
HPLC METODA ZA ANALIZU FLAVONOLA, FLAVANOLA I FENOLNIH KISELINA								
p-hidroksibenzojeva kiselina	260	16.37	1-80	381296	-332900	0.9979	0.76	2.30
elaginska kiselina	260	25.63	1-250	515480	1649500	0.9998	1.12	3.39
galna kiselina	280	9.23	10-80	190444	-170735	0.9994	0.07	0.22
(+)-katehin	280	14.54	1-100	37603	21970	0.9999	0.10	0.30
(-)-epikatehin	280	17.92	1-100	38568	-11569	0.9982	0.20	0.60
kafeinska kiselina	320	18.12	1-80	454274	-1243600	0.9963	0.32	0.98
p-kumarinska kiselina	320	21.31	2-240	296060	-488220	0.9993	0.49	1.48
ferulična kiselina	320	23.23	1-250	482290	-1778300	0.9985	0.44	1.33
miricetin	360	24.82	1-80	307720	236220	0.9992	0.15	0.46
kvercetin	360	27.44	1-250	329840	-343620	0.9999	0.07	0.21
kemferol	360	29.77	1-80	283410	-355390	0.9997	0.13	0.40

[a] izražena koeficijentom determinacije r^2

Tablica 9a. Preciznost[a] HPLC metode za određivanje antocijanina

Spojevi	Koeficijent varijacije[a] %
Borovnica	
Dp-3-gal	0.08
Dp-3-glu	2.79
Cn-3-gal	4.84
Dp-3-ara	0.10
Cn-3-glu	3.93
Pt-3-glu	5.16
Pn-3-glu	0.02
m-3-gal	3.41
Pn-3-ara	3.53
m-3-glu	2.34
Kupina	
cn-3-glu	0.52
cn-3-rut	5.45
cn-3-ksil	0.56
Aronija	
cn-3-gal	0.27
cn-3-glu	0.17
cn-3-ara	0.16
cn-3-ksil	1.11
Jagoda	
cn-3-glu	5.26
pg-3-glu	1.25
pg-3-rut	0.04
Malina	
cn-3-sopho	1.17
pg-3-sopho	3.54
cn-3-glu	1.66
Trešnja	
cn-3-glu	2.21
cn-3-rut	3.21
pn-3-glu	5.74
pn-3-rut	2.08
Višnja	
cn-3-sopho	1.10
cn-3-glu-rut	1.09
cn-3-glu	5.95
cn-3-rut	0.64
Bobice bazge	
cn-3-sam-5-glu	4.99
cn-3-sam+cn-3-glu	1.41
cn-3-rut	5.39
Crveni ribiz	
Cn-3-sam	0.99
Cn-3-ksilrut	0.29
Cn-3-rut	1.25
Crni ribiz	
dp-3-glu	1.08
dp-3-rut	0.58
cn-3-glu	0.97
cn-3-rut	0.21

[a] preciznost metode izražena računanjem koeficijenta varijacije (KV) površina pikova iz tri uzastopna mjerenja svakog uzorka voća

Tablica 9b. Točnost[b] HPLC metode za određivanje antocijanina

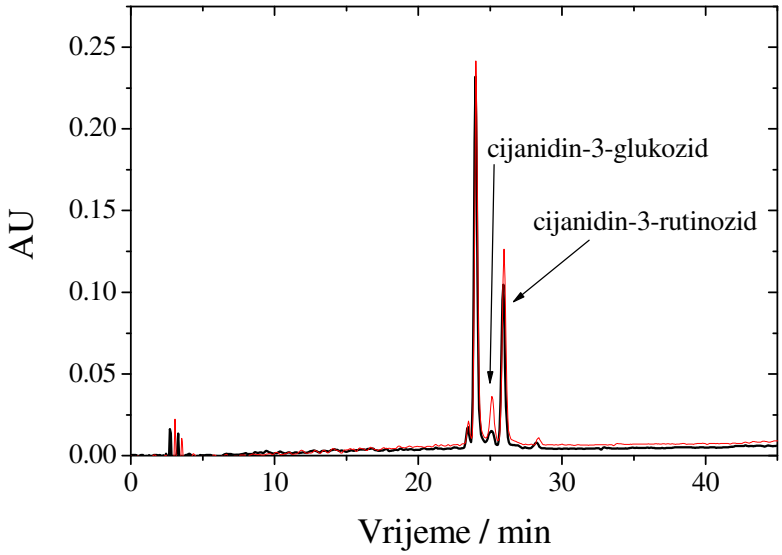
Standardi	Iskorištenje[b] %
cijanidin-3-glukozid	85.89
cijanidin-3-rutinozid	91.43
peonidin-3-glukozid	90.25
malvidin-3-glukozid	95.65
delfinidin-3-glukozid	93.24
pelargonidin-3-glukozid	92.98

[b] točnost metode izražena mjerenjem iskorištenja nakon dodavanja čistih spojeva u sve uzorke voća.
Podaci iskorištenja su srednje vrijednosti

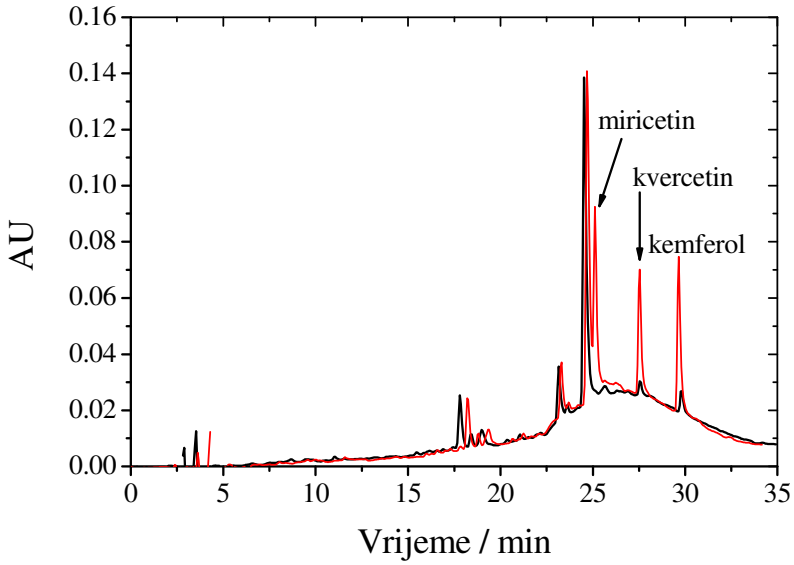
Tablica 10. Preciznost[a] i točnost[b] HPLC metode za analizu flavonola, flavanola i fenolnih kiselina

Standardi	Koeficijent varijacije[a] %		Iskorištenje[b] %
	Crni ribiz	Malina	
p-hidroksibenzojeva kiselina		1.5	92.38
elaginska kiselina	0.6	7.2	106.08
(+)-katehin	1.3		98.30
(-)-epikatehin			96.54
kafeinska kiselina	0.6	5.6	92.63
p-kumarinska kiselina	1.0	2.3	99.72
ferulična kiselina	1.4	5.5	87.28
miricetin	5.4		88.34
kvercetin	5.4	4.8	92.29
kaempferol	8.0		87.48

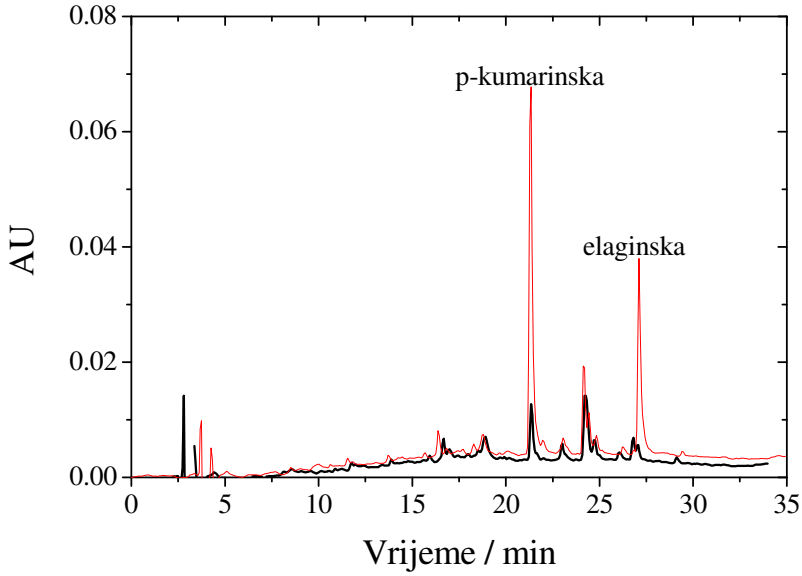
[a] preciznost metode izražena računanjem koeficijenta varijacije (KV) površina pikova iz šest uzastopnih mjerenja ekstrakta crnog ribiza i maline
[b] točnost metode izražena računanjem iskorištenja nakon dodavanja čistih spojeva u sve uzorke voća. Podaci iskorištenja su srednje vrijednosti



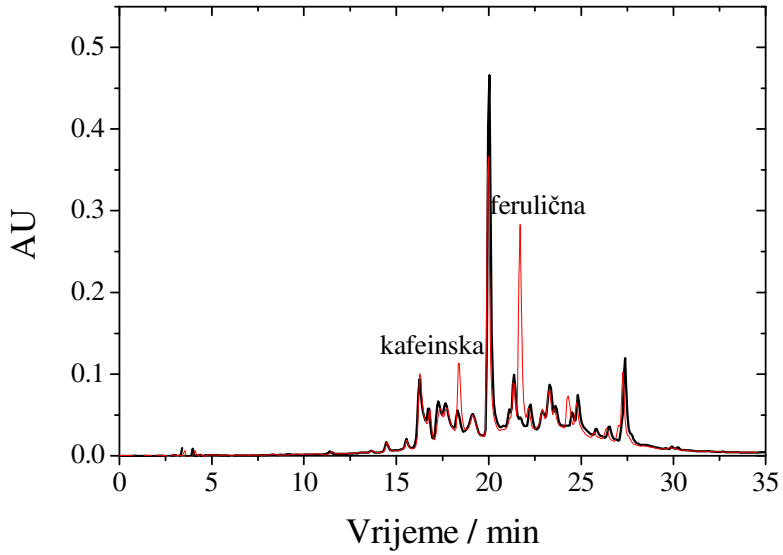
Slika 18. Preklopljeni kromatogrami uzorka višnje i uzorka višnje u koji su dodani standardi cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid (520 nm)



Slika 19. Preklopljeni kromatogrami uzorka jagode i uzorka jagode u koji su dodani standardi miricetin, kvercetin i kemferol (360 nm)



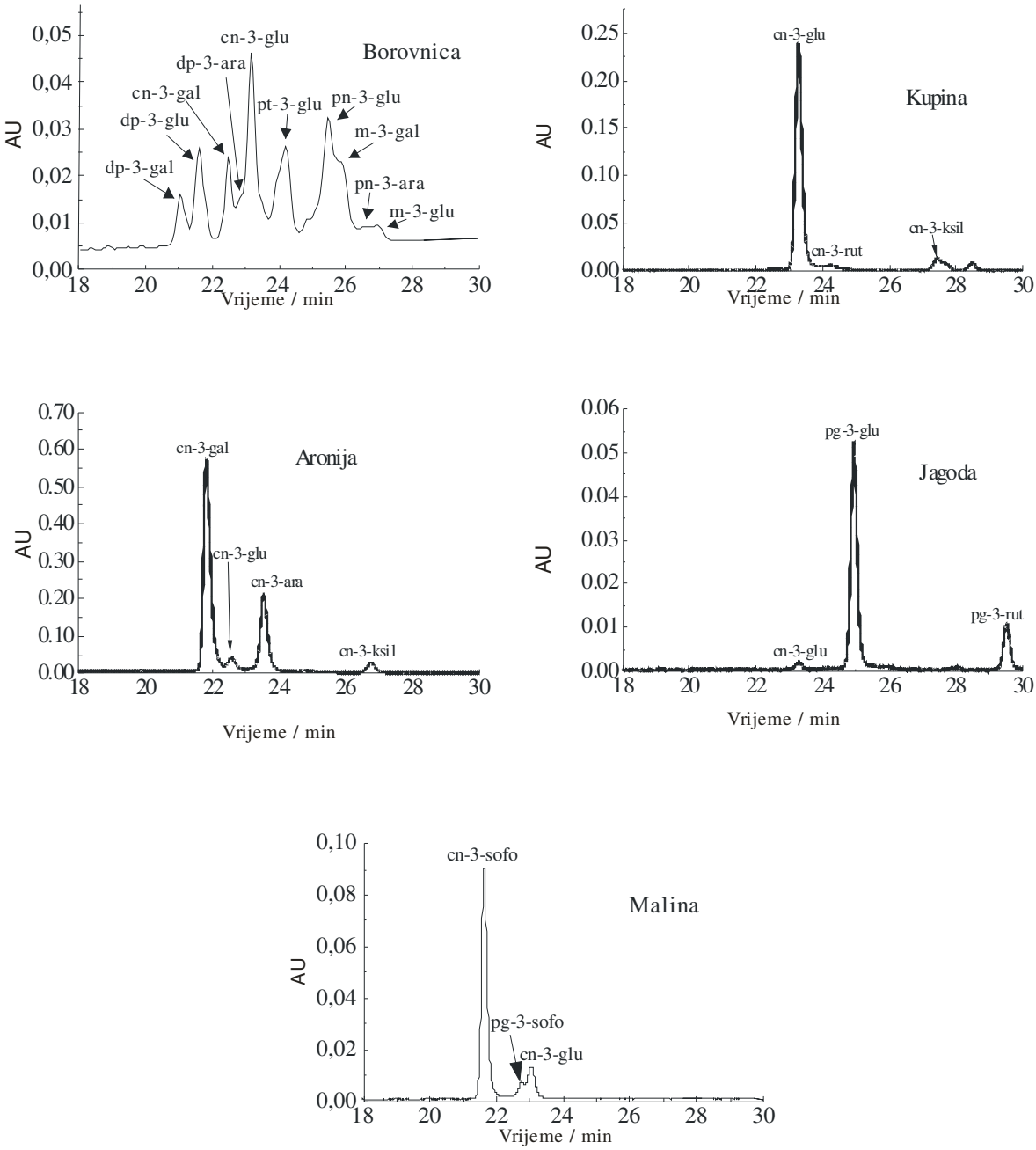
Slika 20. Preklopljeni kromatogrami uzorka jagode i uzorka jagode u koji su dodani standardi *p*-kumarinska i elaginska kiselina (320 nm)



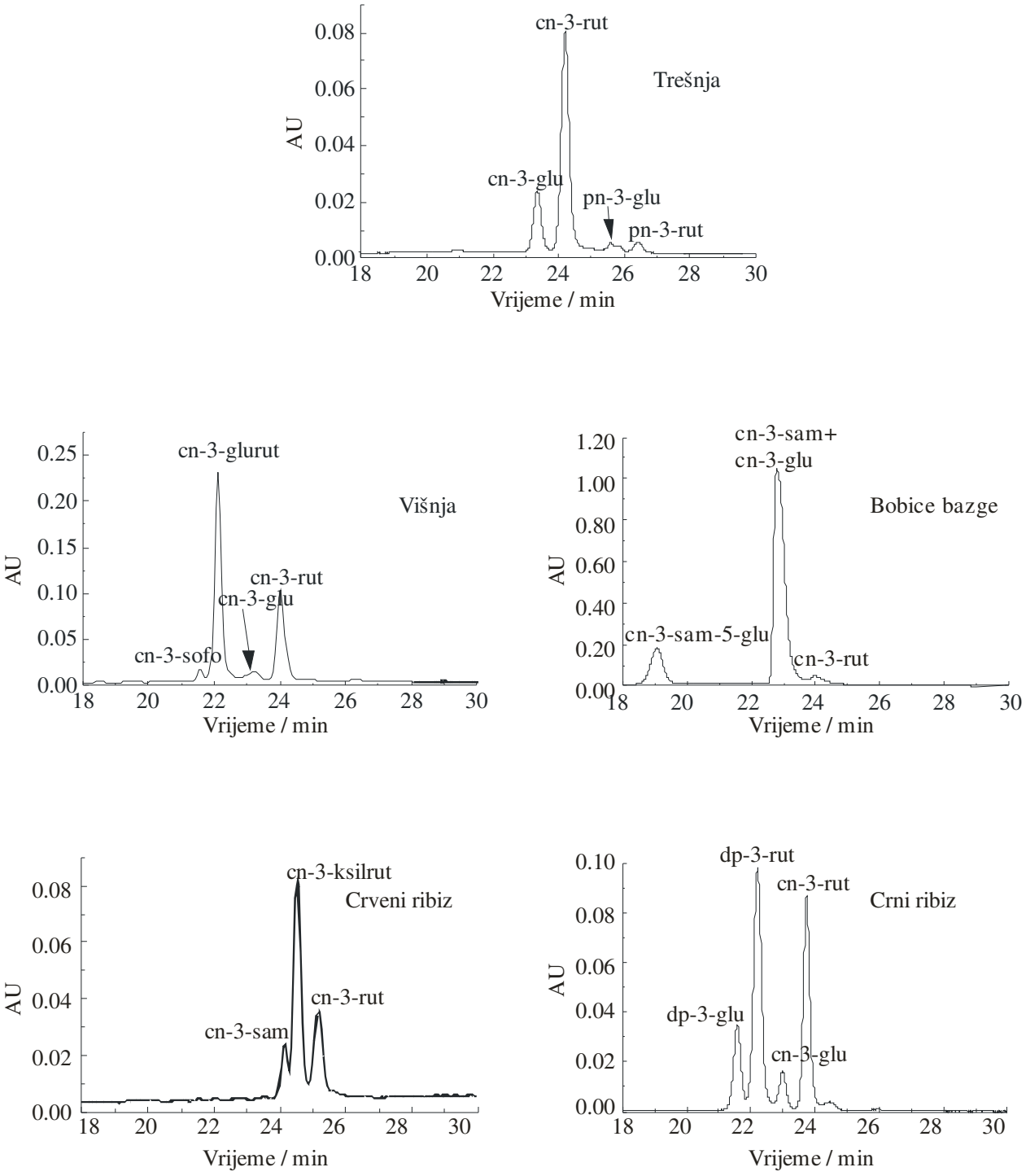
Slika 21. Preklopljeni kromatogrami uzorka borovnice i uzorka borovnice u koji su dodani standardi kafeinska i ferulična kiselina (320 nm)

4.2.2. Antocijanini u voću

Slika 22 prikazuje kromatograme voća s identificiranim antocijaninima, snimljene na 520 nm. U tablici 11 dane su količine pojedinih antocijanina u voću te distribucija antocijanina u svakom voću izražena u postotcima.



Slika 22. HPLC kromatogrami voća snimljeni na 520nm s prikazom identificiranih antocijanina. Cn, cijanidin; pn, peonidin; dp, delfinidin; pg, pelargonidin; pt, petunidin; m, malvidin; glu, glukozid, rut, rutinozid, gal, galaktozid; ara, arabinozid;sam, sambubiozid; sofo, soforozid; ksil, ksilozid; ksilrut, ksilozilrutinozid



Nastavak slike 22. HPLC kromatogrami voća snimljeni na 520 nm s prikazom identificiranih antocijanina. Cn, cijanidin; pn, peonidin; dp, delfinidin; pg, pelargonidin; pt, petunidin; m malvidin; glu, glukozid, rut, rutinozid, gal, galaktozid; ara, arabinozid;sam, sambubiozid; sofo soforozid; ksil, ksilozid; ksilrut, ksilozilrutinozid

Tablica 11. Količina pojedinih antocijanina

(mg cijanidin-3-glukozida/kg svježeg voća)[a] te njihova raspodjela u voću (%)

Voće	Količina antocijanina (mg kg^{-1})			Udio (%) u ukupnoj količini antocijanina
Borovnica				
dp-3-gal	252.6	±	0.0	5.6
dp-3-glu	532.2	±	2.1	11.8
cn-3-gal	369.8	±	2.4	8.2
dp-3-ara	139.8	±	0.1	3.1
cn-3-glu	1086.9	±	6.0	24.1
pt-3-glu	712.6	±	5.1	15.8
pn-3-glu	834.3	±	0.0	18.5
m-3-gal	442.0	±	1.5	9.8
pn-3-ara	49.6	±	0.2	1.1
m-3-glu	90.2	±	0.4	2.0
Ukupno	4509.9	±	17.8	100.0
Kupina				
cn-3-glu	1060.4	±	2.7	90.4
cn-3-rut	15.2	±	0.0	1.3
cn-3-ksil	97.4	±	1.2	8.3
Ukupno	1173.0	±	3.9	100.0
Aronija				
cn-3-gal	2385.0	±	4.9	68.9
cn-3-glu	96.9	±	0.1	2.8
cn-3-ara	848.1	±	1.0	24.5
cn-3-ksil	131.5	±	0.1	3.8
Ukupno	3461.6	±	6.1	100.0
Jagoda				
cn-3-glu	6.2	±	0.7	3.6
pg-3-glu	135.5	±	2.0	78.7
pg-3-rut	30.5	±	0.0	17.7
Ukupno	172.2	±	2.7	100.0
Malina				
cn-3-sopho	195.9	±	2.8	79.8
pg-3-sopho	14.7	±	0.5	6.0
cn-3-glu	34.9	±	0.7	14.2
Ukupno	245.5	±	4.0	100.0
Trešnja				
cn-3-glu	30.8	±	1.5	20.2
cn-3-rut	108.4	±	8.0	71.2
pn-3-glu	6.9	±	1.1	4.5
pn-3-rut	6.2	±	0.2	4.1
Ukupno	152.3	±	10.8	100.0

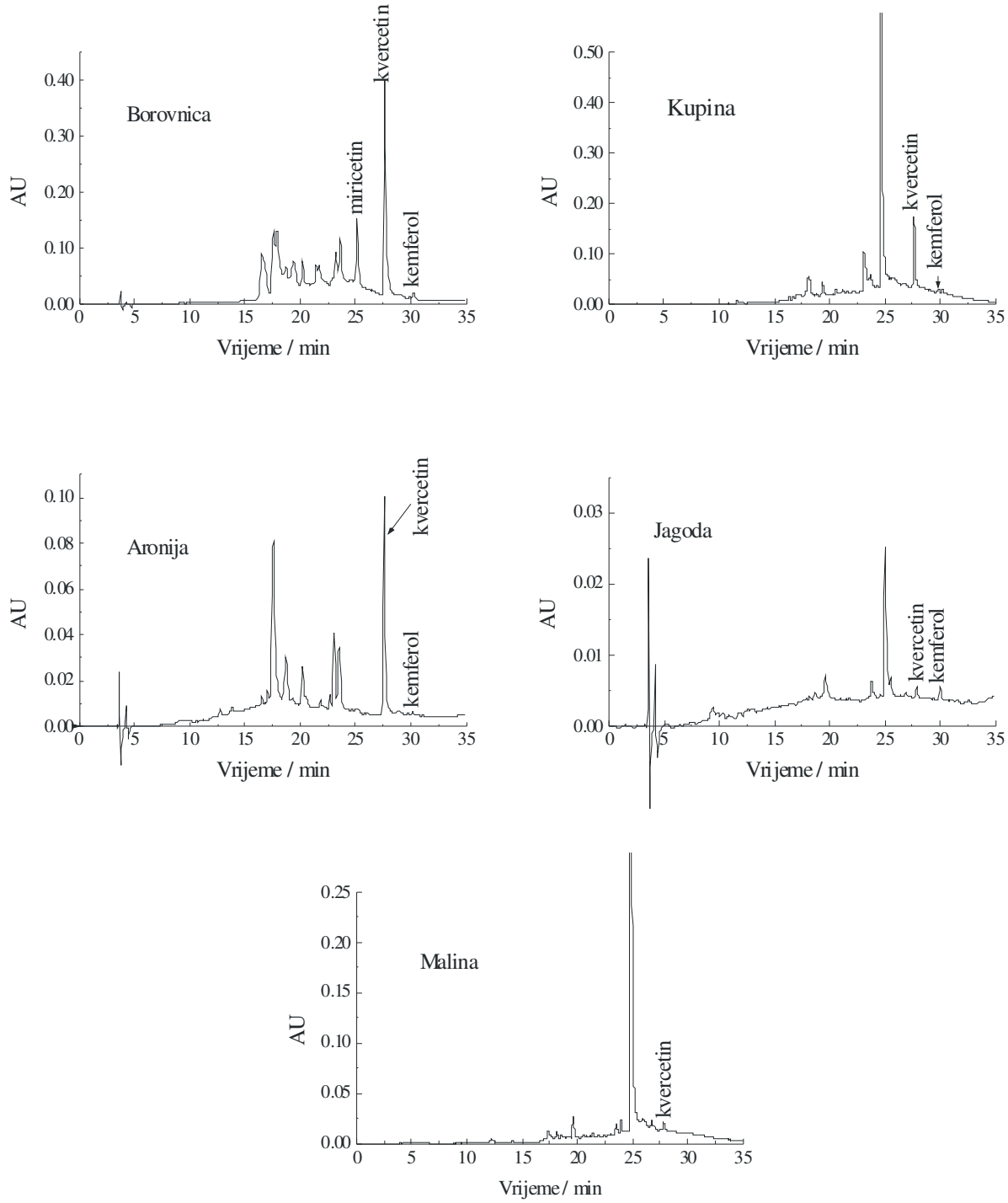
Nastavak tablice 11. Količina pojedinih antocijanina
(mg cijanidin-3-glukozida/kg svježeg voća)[a]te njihova raspodjela u voću (%)

Voće	Količina antocijanina (mg kg^{-1})			Udio (%) u ukupnoj količini antocijanina
Višnja				
cn-3-sopho	41.9	±	0.8	3.9
cn-3-glu-rut	660.1	±	0.7	61.4
cn-3-glu	37.6	±	0.3	3.5
cn-3-rut	335.4	±	1.6	31.2
Ukupno	1075.1	±	3.4	100.0
Bobice bazge				
cn-3-sam-5-glu	476.4	±	9.9	15.1
cn-3-sam+cn-3-glu	2621.9	±	18.9	83.1
cn-3-rut	56.8	±	5.9	1.8
Ukupno	3155.1	±	34.7	100.0
Crveni ribiz				
cn-3-sam	27.4	±	0.4	13.8
cn-3-ksilrut	116.8	±	0.5	58.8
cn-3-rut	54.4	±	1.1	27.4
Ukupno	198.7	±	2.0	100.0
Crni ribiz				
dp-3-glu	349.6	±	10.9	13.8
dp-3-rut	1112.1	±	38.9	43.9
cn-3-glu	159.6	±	1.7	6.3
cn-3-rut	912.0	±	12.3	36.0
Ukupno	2533.3	±	63.8	100.0

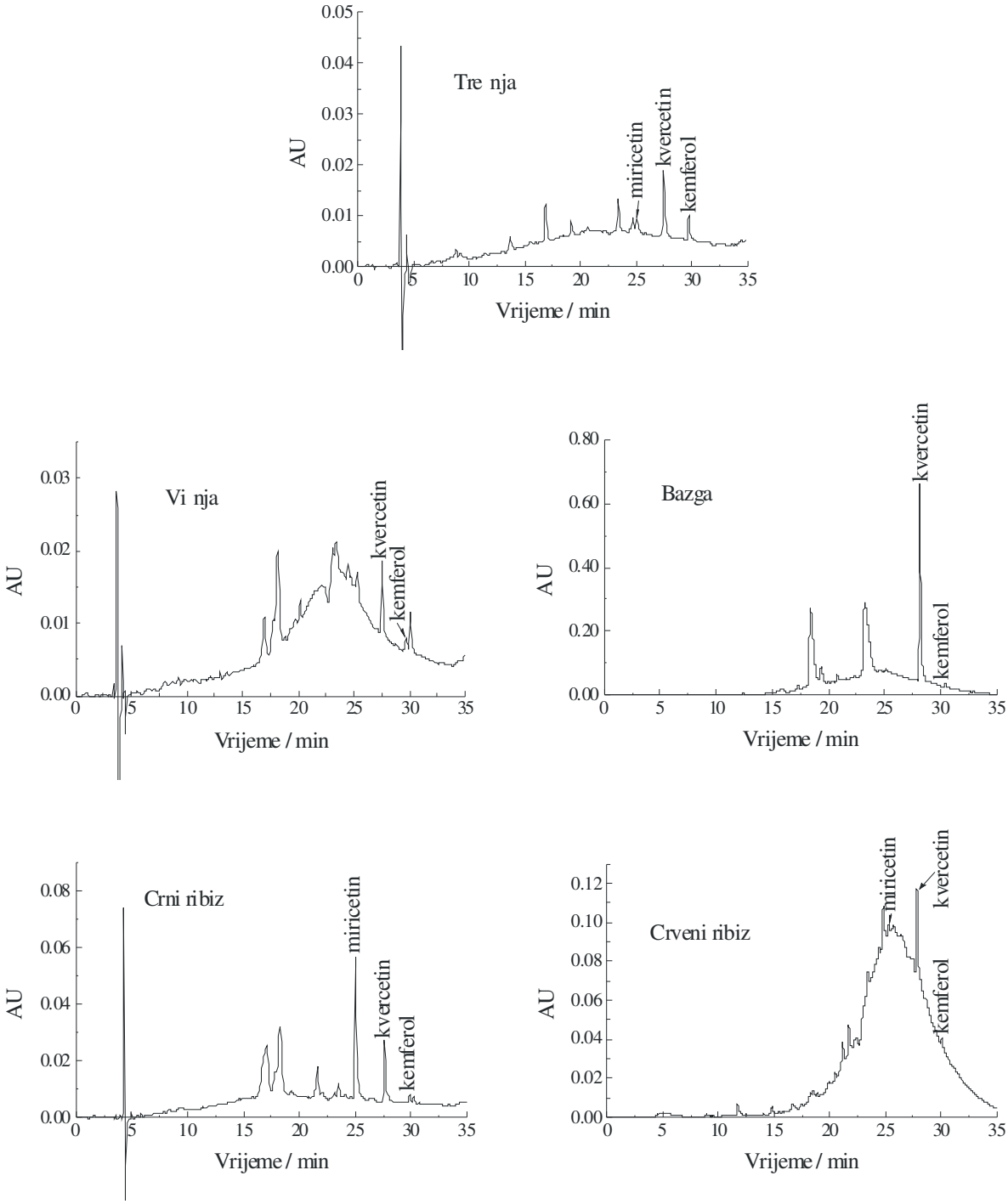
[a] srednje vrijednosti ± SD (n=3)
Cn, cijanidin; pn, peonidin; dp, delfinidin; pg, pelargonidin; pt, petunidin; m, malvidin; glu, glukozid, rut, rutinozid, gal, galaktozid; ara, arabinozid; sam, sambubiozid; sopho, soforozid; ksil, ksilozid; ksilrut, ksilozilrutinozid

4.2.3. Flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću

Kromatogrami voća koji su prikazani na slici 23 snimljeni su na 360 nm i prikazuju flavonole prisutne u ispitivanom voću. Količina flavonola izražena je u mg kg^{-1} svježeg voća i prikazana u tablici 12.



Slika 23. HPLC kromatogrami voća snimljeni na 360 nm s prikazom identificiranih flavonola.



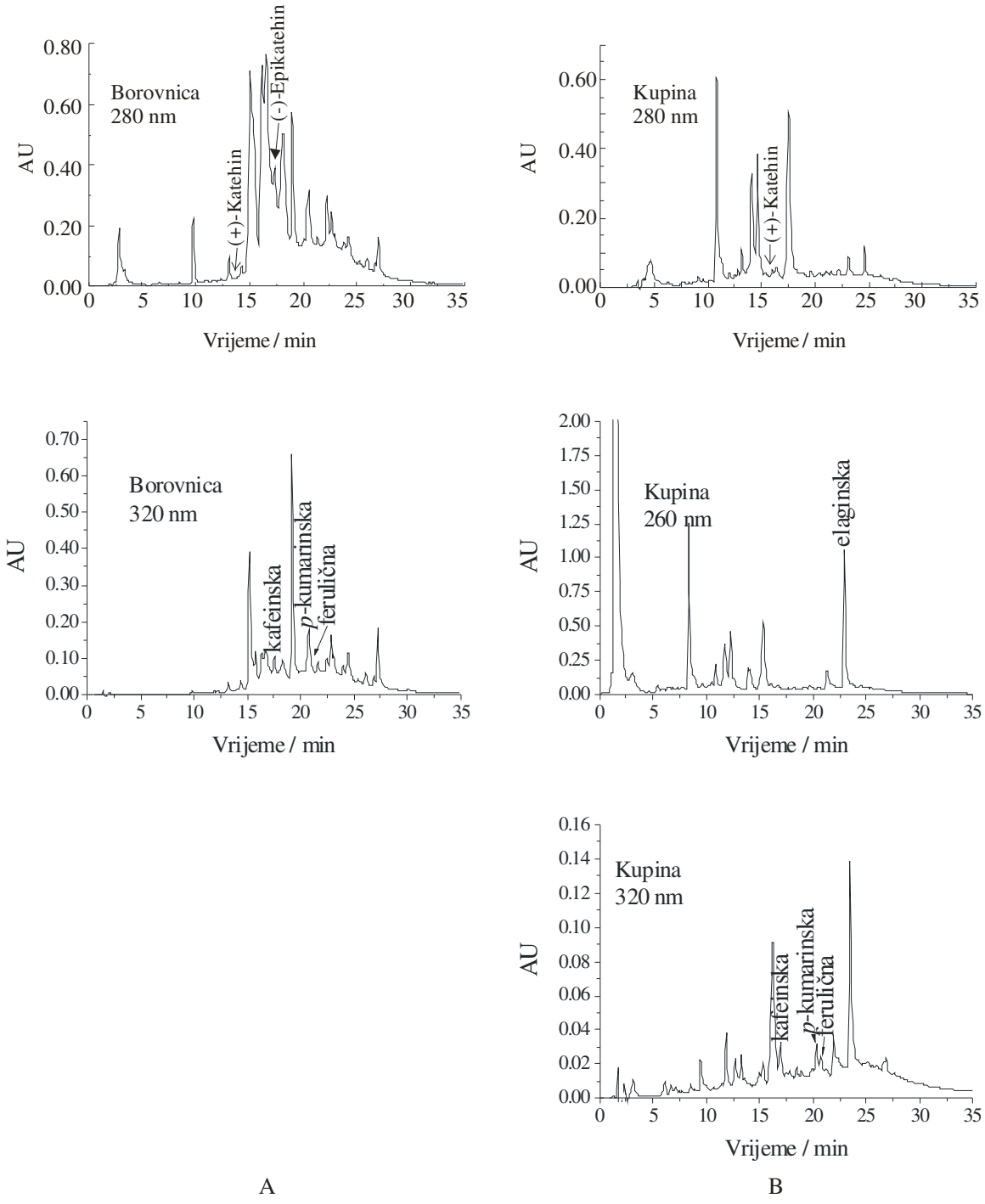
Nastavak slike 23. HPLC kromatogrami voća snimljeni na 360 nm s prikazom identificiranih flavonola

Tablica 12. Količina pojedinih flavonola u voću (mg kg^{-1} svježeg voća)[a] određen HPLC metodom

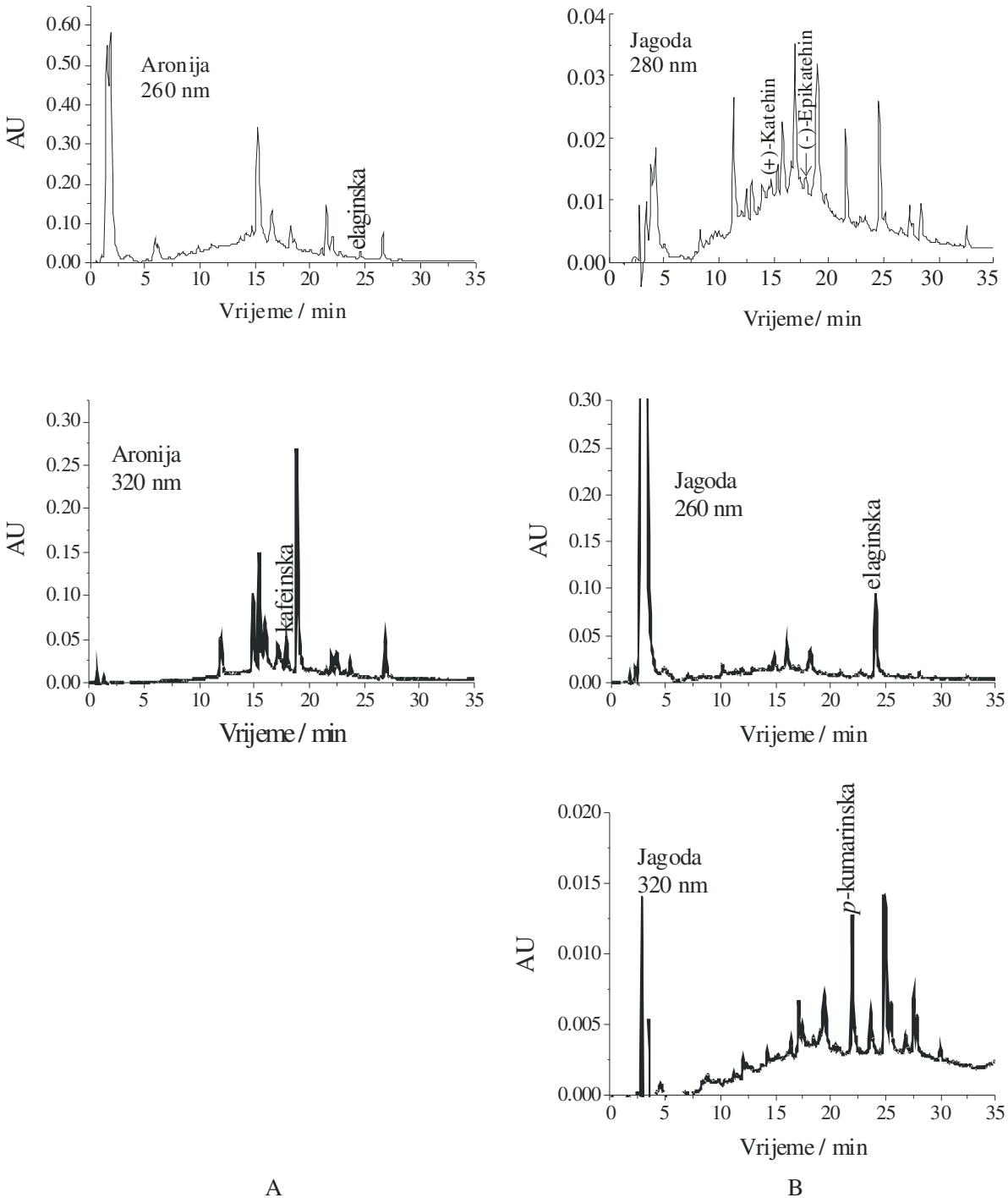
Voće	Flavonoli			
	Miricetin (mg kg^{-1})	**Kvercetin (mg kg^{-1})**	**Kemferol (mg kg^{-1})**	**Ukupno (mg kg^{-1})**
Ericaceae				
Borovnica	43.02±1.1	136.97±3.2	2.88±0.1	**182.87**
Rosaceae				
Kupina		55.42±0.5	2.13±0.5	**57.55**
Aronija		92.15±0.5	6.86±0.3	**99.01**
Jagoda		6.24±0.2	7.71±0.3	**13.95**
Malina		3.85±0.2		**3.85**
Trešnja	0.17±0.1	8.58±0.1	5.97±0.3	**14.72**
Višnja		5.05±0.3	2.38±0.1	**7.43**
Caprifoliaceae				
Bazga		143.69±4.2	2.02±0.1	**145.71**
Saxifragaceae				
Crni ribiz	44.22±4.7	21.44±0.3	7.53±0.3	**73.19**
Crveni ribiz	1.72±0.3	8.87±0.2	0.34±0.0	**10.93**

[a] srednje vrijednosti ± SD (n=2)

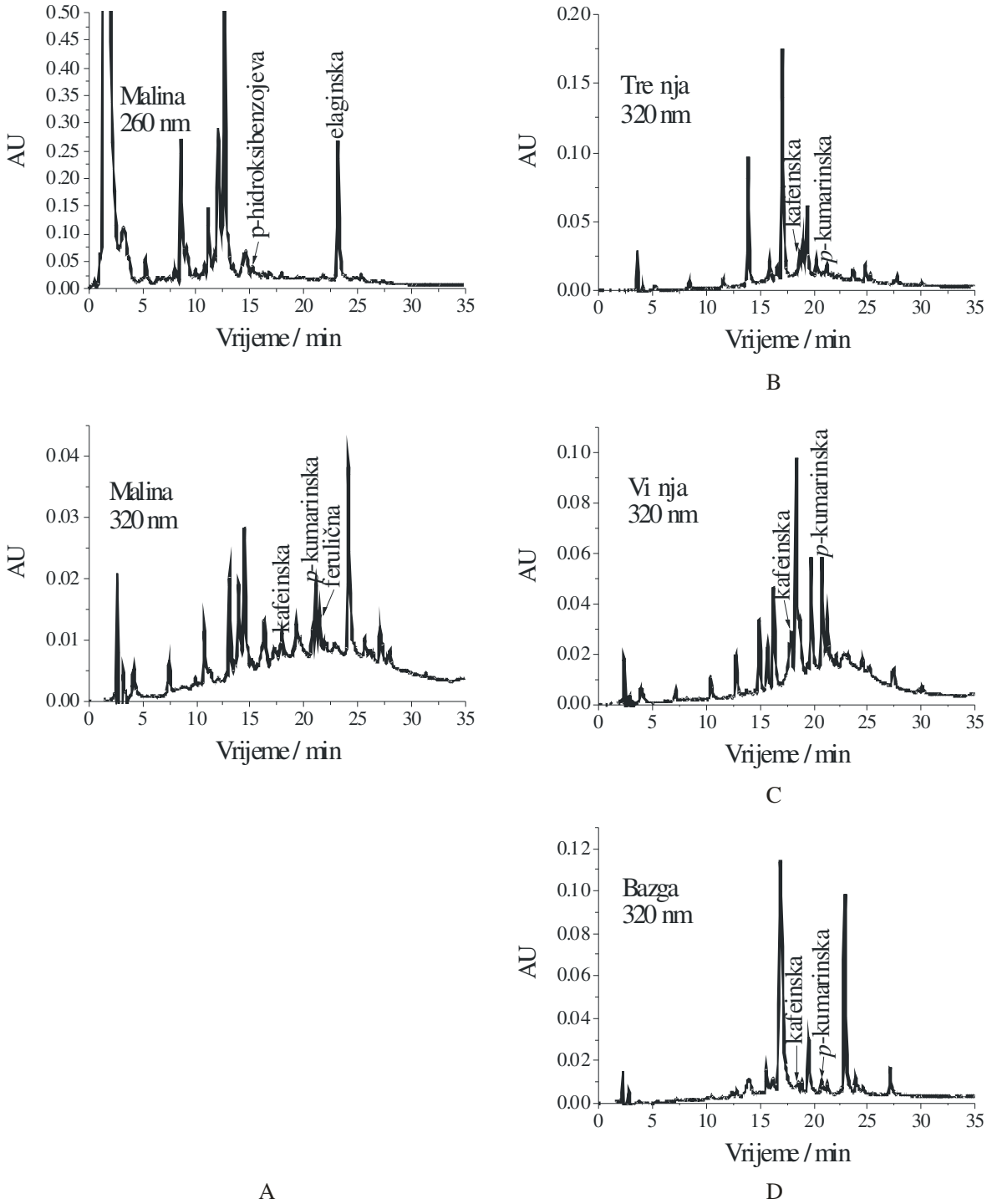
Na slikama 24, 25, 26 i 27 prikazani su kromatogrami voća s identificiranim flavanolima i fenolnim kiselinama. Snimani su na 280, 260 i 320 nm. U tablici 13 dane su količine flavanola i fenolnih kiselina u ispitivanom voću.



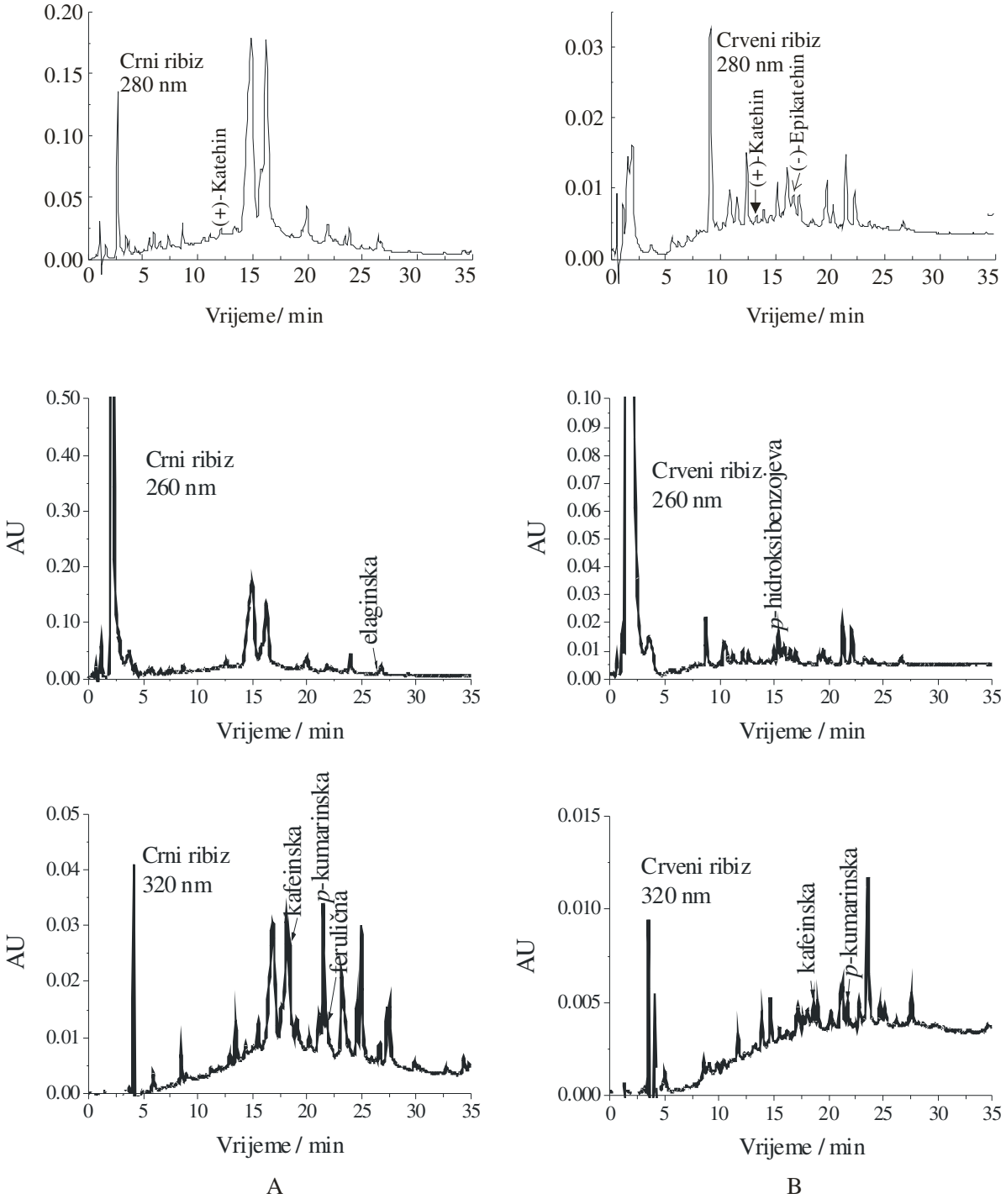
Slika 24. HPLC kromatogrami A) borovnice i B) kupine snimljeni na 260, 280 i 320 nm s prikazom hidroksibenzojevih kiselina, flavanola i hidroksicimetnih kiselina.



Slika 25. HPLC kromatogrami A) aronije i B) jagode snimljeni na 260, 280 i 320 nm s prikazom hidroksibenzojevih kiselina, flavanola i hidroksicimetnih kiselina.



Slika 26. HPLC kromatogrami A) maline, B) trš nje, C) vši nje i D) bazge snimljeni na 260, 280 i 320 nm s prikazom hidroksibenzojevih kiselina, flavanola i hidroksicimetnih kiselina.



Slika 27. HPLC kromatogrami A) crnog ribizla i B) crvenog ribizla snimljeni na 260, 280 i 320 nm s prikazom hidroksibenzojevih kiselina, flavanola i hidroksicimetnih kiselina.

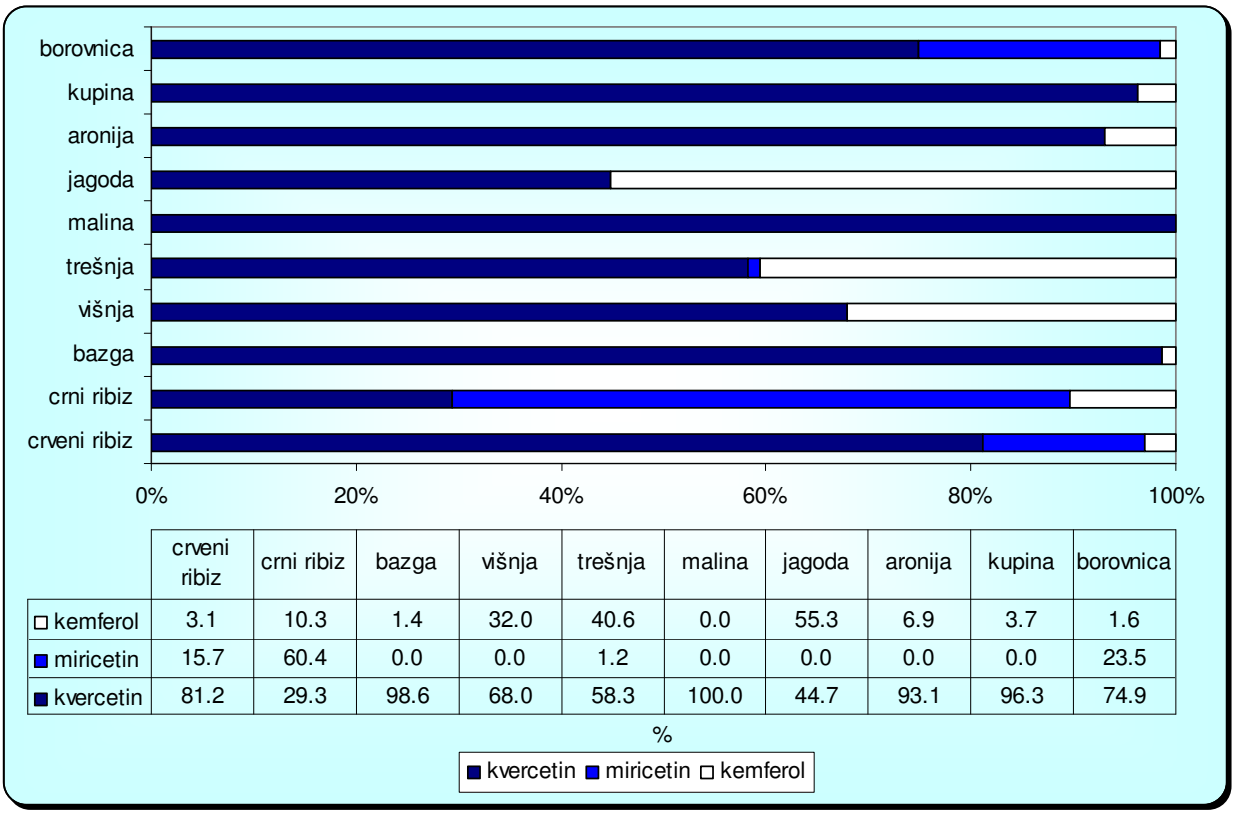
Tablica 13. Količina pojedinih flavanola i fenolnih kiselina u ispitivanom voću (mg kg^{-1} svježeg voća)[a] određene HPLC metodom

Voće	Flavanoli			Hidroksibenzojeve kiseline			Hidroksicimetne kiseline			
	(+)-katehin (mg kg^{-1})	(-)-epikatehin (mg kg^{-1})	Ukupno (mg kg^{-1})	*p*-Hidroksi-benzojeva kiselina (mg kg^{-1})	Elaginska Kiselina (mg kg^{-1})	Ukupno (mg kg^{-1})	Kafeinska Kiselina (mg kg^{-1})	*p*-Kumarinska kiselina (mg kg^{-1})	Ferulična Kiselina (mg kg^{-1})	Ukupno (mg kg^{-1})
Ericaceae										
Borovnica	2.40±0.1	253.24±0.5	**255.64**				27.29±0.6	54.90±3.9	9.57±0.3	**91.76**
Rosaceae										
Kupina	6.06±0.2		**6.06**		121.07±0.2	**121.07**	5.65±0.4	5.94±0.0	5.11±0.0	**16.7**
Aronija	Tragovi	Tragovi	**Tragovi**		3.97±0.1	**3.97**	38.39±0.5			**38.39**
Jagoda	9.31±0.1	22.24±0.3	**31.55**		41.40±0.2	**41.40**		16.86±0.3		**16.86**
Malina				4.95±0.1	31.74±2.1	**36.69**	3.23±0.1	4.24±0.1	4.29±0.1	**11.76**
Trešnja							11.47±0.2	5.40±0.2		**16.87**
Višnja							9.05±0.5	19.12±0.9		**28.17**
Caprifoliaceae										
Bazga							15.84±0.2	10.80±0.2		**26.64**
Saxifragaceae										
Crni ribiz	12.26±0.3		**12.26**		3.15±0.1	**3.15**	21.31±0.1	31.69±0.3	17.48±0.1	**70.48**
Crveni ribiz	4.21±0.2	21.76±0.3	**25.97**	12.54±0.1		**12.54**	12.76±0.3	8.26±0.2		**21.02**

[a] srednje vrijednosti ± SD (n=2)

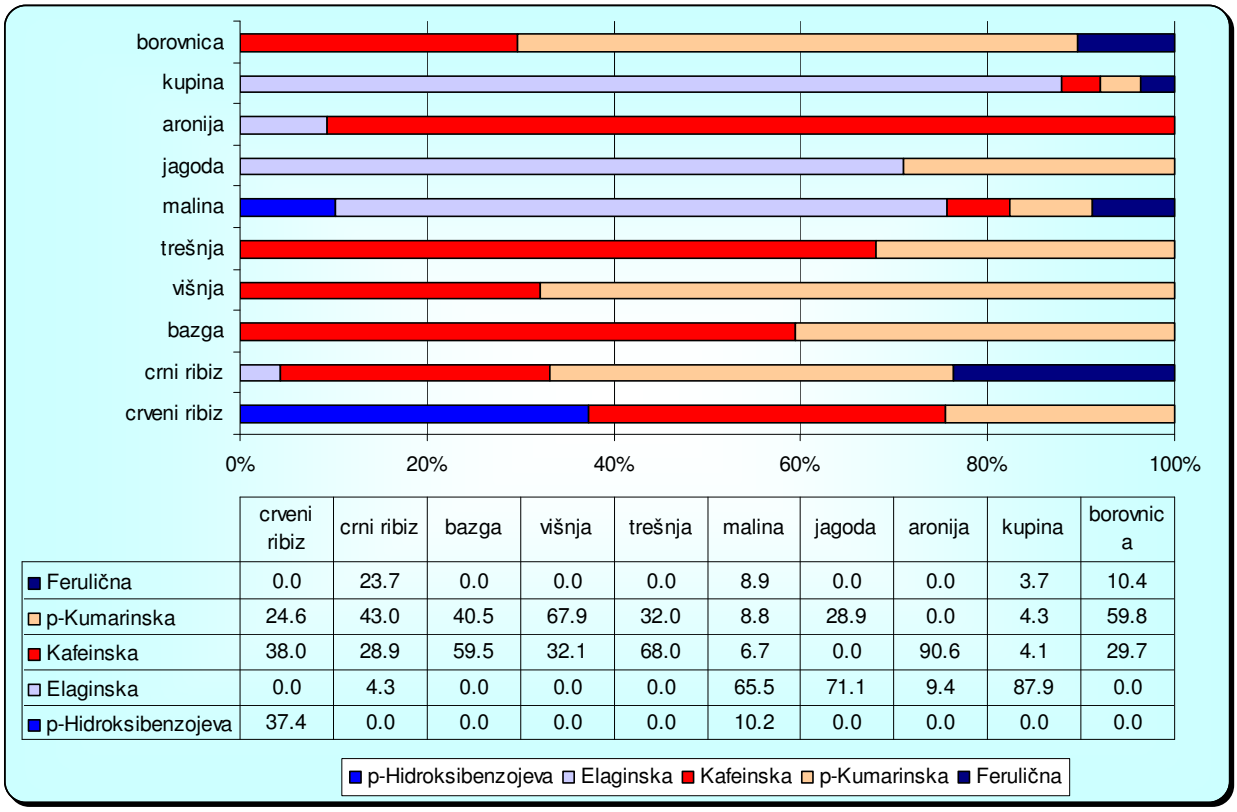
4.3. Rasprostranjenost pojedinih polifenola u voću

Slika 28 prikazuje raspodjelu flavonola u pojedinom ispitivanom voću. Prikazana je kao udio pojedinog flavonola u ukupnoj količini flavonola. Raspodjela fenolnih kiselina voća (%) prikazana je na slici 29. Slika 30 prikazuje količine ukupnih antocijanina, flavonola, flavanola i fenolnih kiselina u voću, a na slici 31 dana je raspodjela tih spojeva u voću (%).



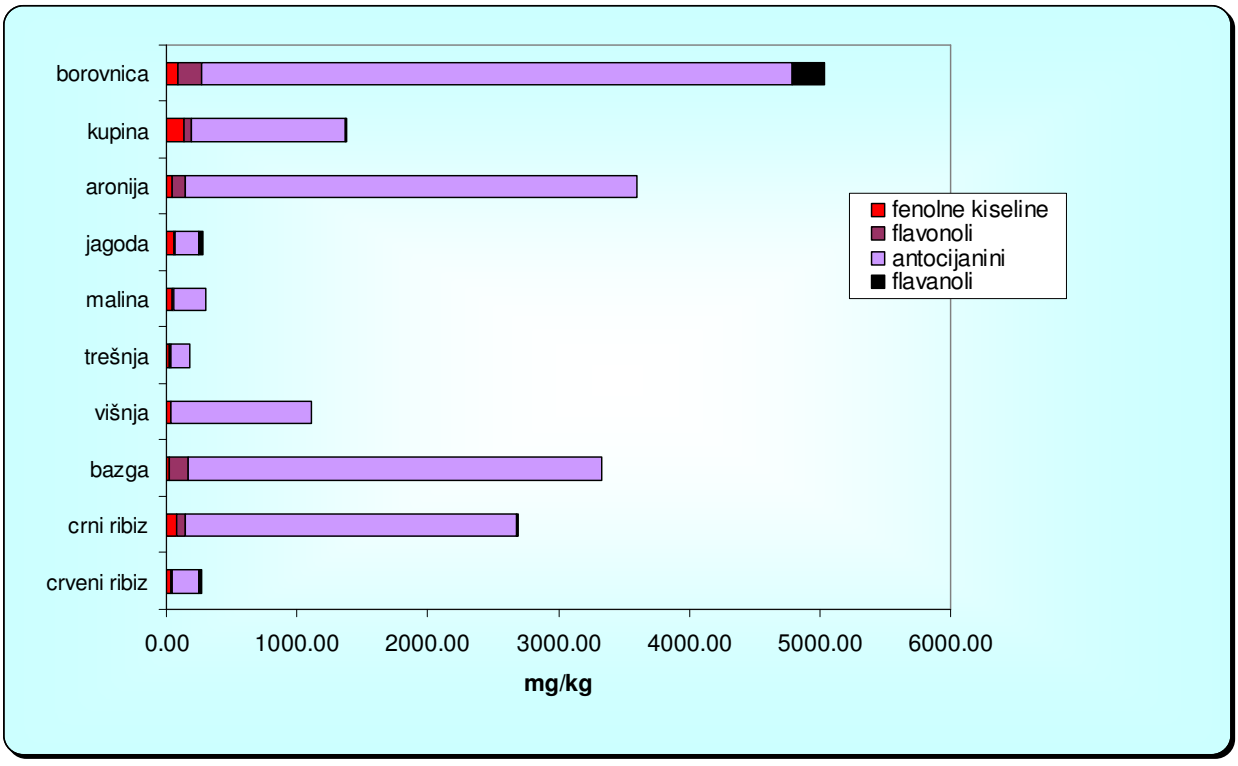
	crveni ribiz	crni ribiz	bazga	višnja	trešnja	malina	jagoda	aronija	kupina	borovnica
kemferol	3.1	10.3	1.4	32.0	40.6	0.0	55.3	6.9	3.7	1.6
miricetin	15.7	60.4	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	23.5
kvercetin	81.2	29.3	98.6	68.0	58.3	100.0	44.7	93.1	96.3	74.9

Slika 28. Raspodjela (% u ukupnoj količini flavonola) pojedinih flavonola u ispitivanom voću

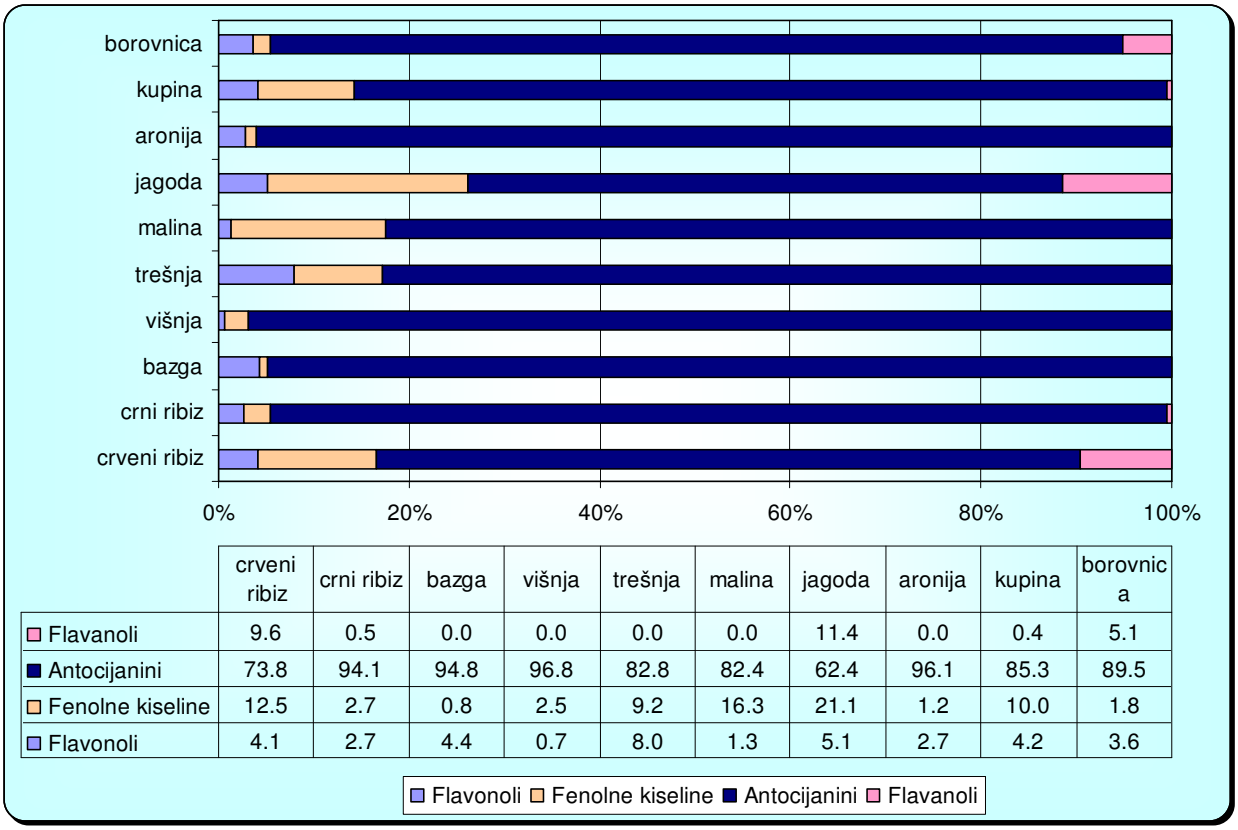


	crveni ribiz	crni ribiz	bazga	višnja	trešnja	malina	jagoda	aronija	kupina	borovnica
Ferulična	0.0	23.7	0.0	0.0	0.0	8.9	0.0	0.0	3.7	10.4
p-Kumarinska	24.6	43.0	40.5	67.9	32.0	8.8	28.9	0.0	4.3	59.8
Kafeinska	38.0	28.9	59.5	32.1	68.0	6.7	0.0	90.6	4.1	29.7
Elaginska	0.0	4.3	0.0	0.0	0.0	65.5	71.1	9.4	87.9	0.0
p-Hidroksibenzojeva	37.4	0.0	0.0	0.0	0.0	10.2	0.0	0.0	0.0	0.0

Slika 29. Raspodjela (% u ukupnoj količini fenolnih kiselina) pojedinih fenolnih kiselina u ispitivanom voću



Slika 30. Količina ukupnih flavonola, ukupnih flavanola, ukupnih fenolnih kiselina te ukupnih antocijanina u voću



	crveni ribiz	crni ribiz	bazga	višnja	trešnja	malina	jagoda	aronija	kupina	borovnica
Flavanoli	9.6	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	11.4	0.0	0.4	5.1
Antocijanini	73.8	94.1	94.8	96.8	82.8	82.4	62.4	96.1	85.3	89.5
Fenolne kiseline	12.5	2.7	0.8	2.5	9.2	16.3	21.1	1.2	10.0	1.8
Flavonoli	4.1	2.7	4.4	0.7	8.0	1.3	5.1	2.7	4.2	3.6

Slika 31. Udio (%) pojedinih grupa polifenola određenih HPLC metodama u ispitivanom voću

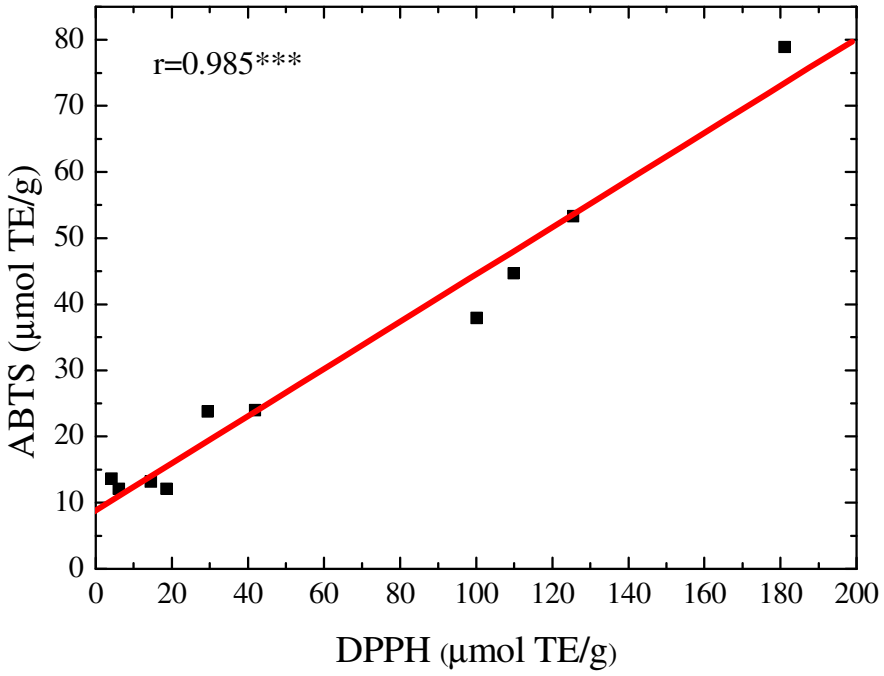
4.4. Antioksidacijska aktivnost voća

Antioksidacijska aktivnost voća određena pomoću DPPH i ABTS metode dana je u tablici 14. Korelacija između antioksidacijskih aktivnosti dobivenih pomoću DPPH i ABTS metode prikazana je na slici 32.

Tablica 14. Antioksidacijska aktivnost voća određena DPPH[a] i ABTS[b] metodom (μmol TE/g)

Voće	DPPH . (μmol TE/g)	ABTS . (μmol TE/g)
Porodica Ericaceae		
Borovnica	125.52	53.28
Porodica Rosaceae		
Kupina	41.89	23.94
Aronija	**181.07**	**78.90**
Jagoda	6.11	12.08
Malina	18.61	12.10
Trešnja	4.22	13.62
Višnja	29.49	23.74
Porodica Caprifoliaceae		
Bazga	100.16	37.91
Porodica Saxifragaceae		
Crni ribiz	109.89	44.67
Crveni ribiz	13.73	13.15

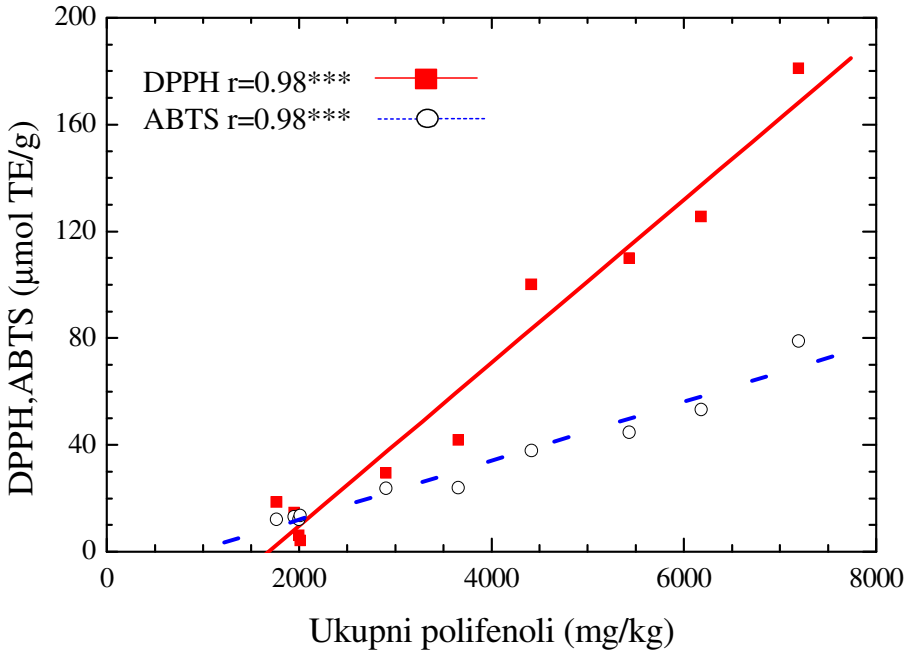
[a]antioksidacijska aktivnost određena hvatanjem $DPPH^{\cdot}$ radikala nakon 15 minuta reakcije
[b]antioksidacijska aktivnost određena hvatanjem $ABTS^{\cdot+}$ radikala nakon 1 minute reakcije



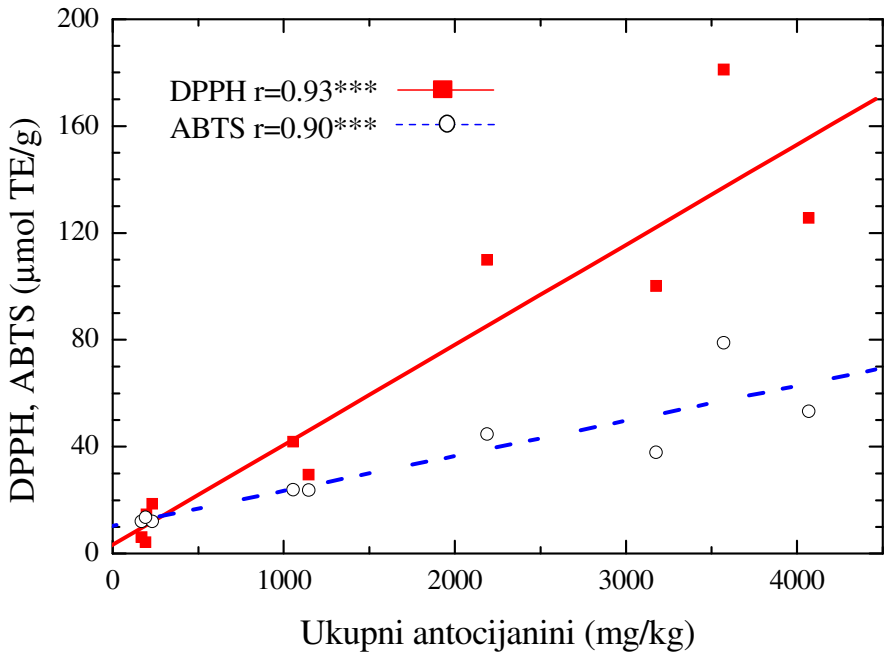
Slika 32. Korelacija između vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i ABTS metodom

4.5. Korelacija između sadržaja i vrste polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća

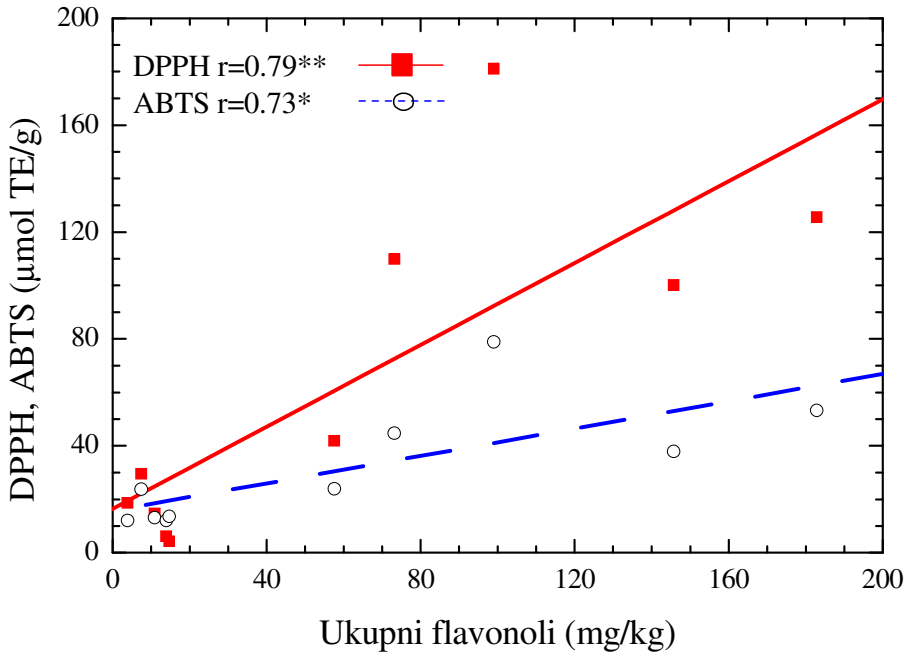
Na slikama 33-41 prikazana je korelacija između količine polifenola i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća, a koeficijenti korelacije (r) dani su u tablici 15.



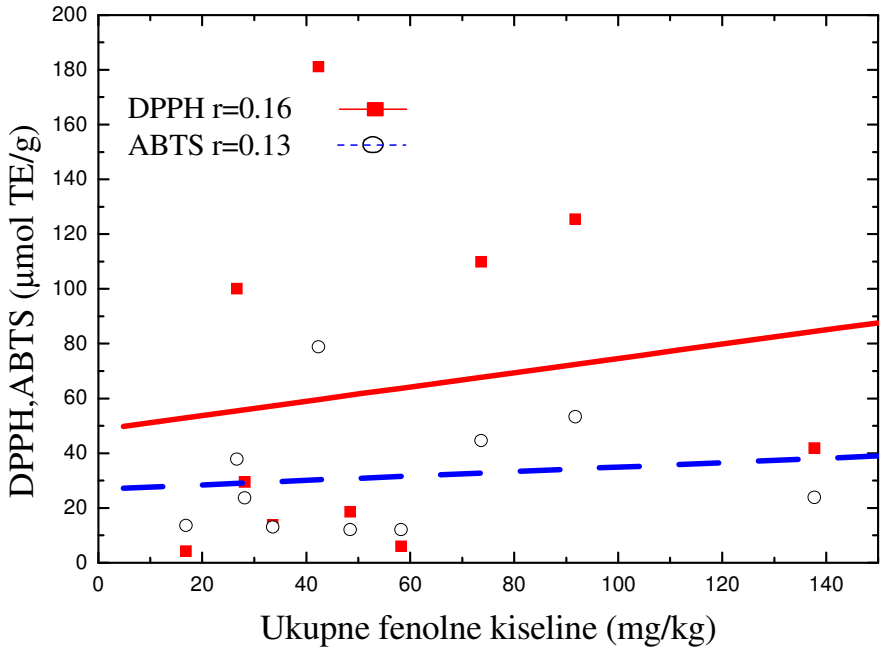
Slika 33. Korelacija između količine ukupnih polifenola u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



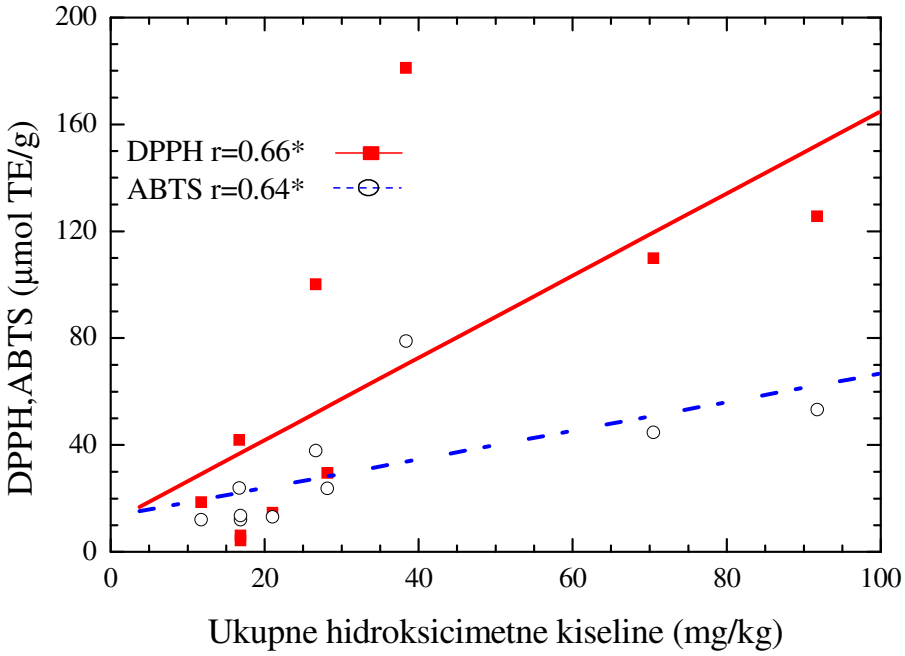
Slika 34. Korelacija između količine ukupnih antocijanina u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



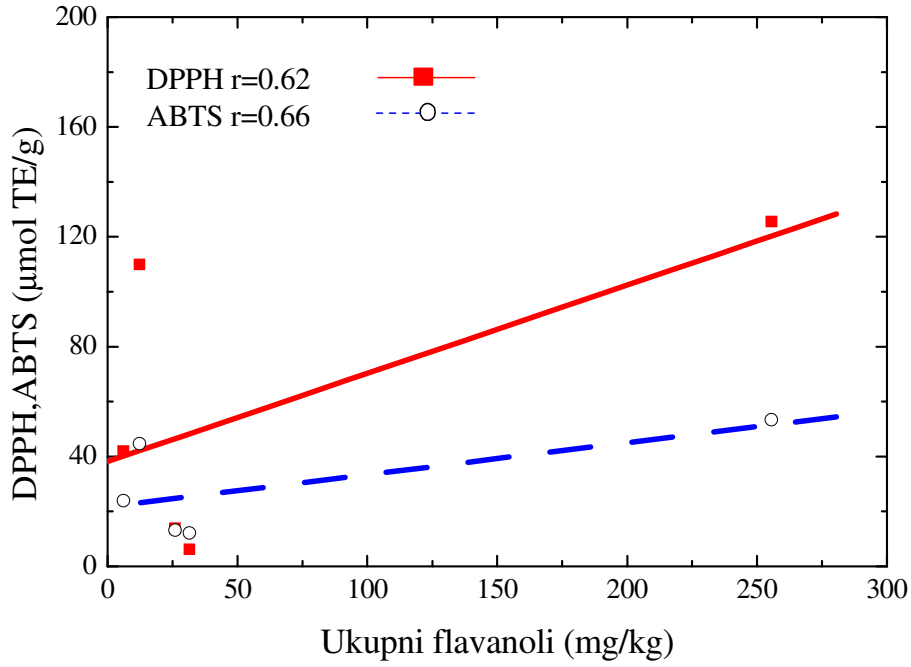
Slika 35. Korelacija između količine ukupnih flavonola u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



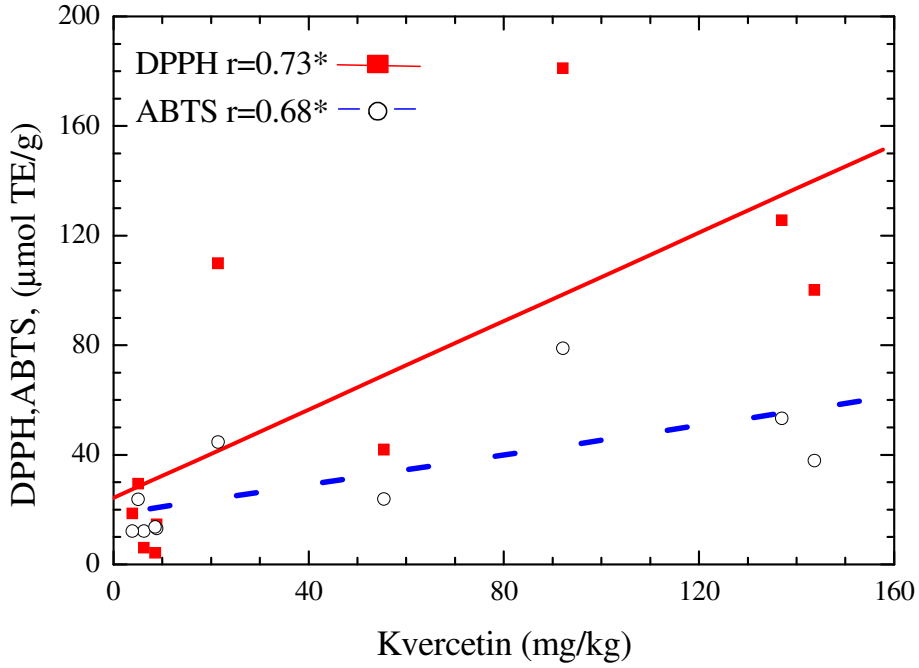
Slika 36. Korelacija između količine ukupnih fenolnih kiselina u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



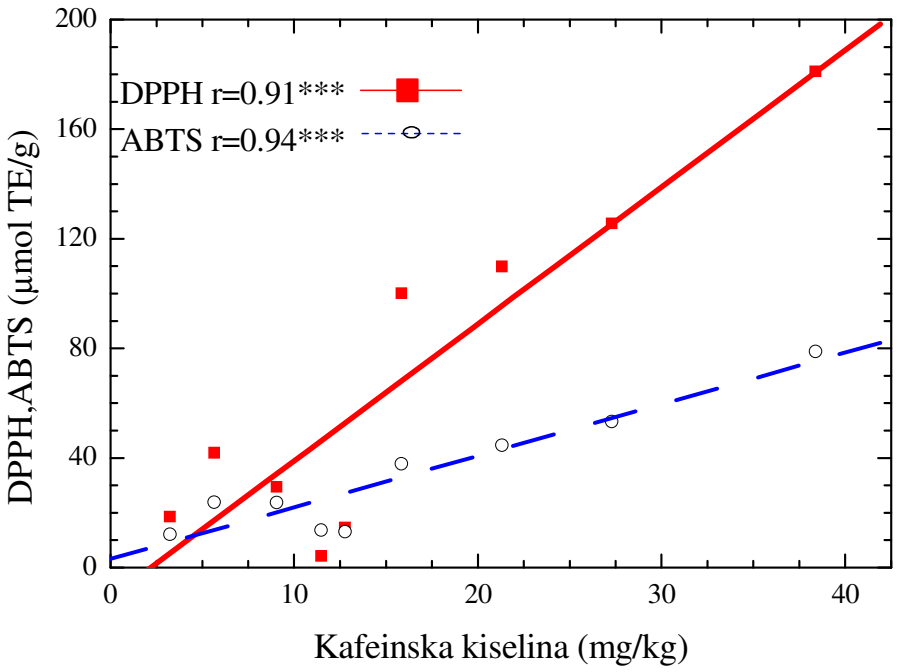
Slika 37. Korelacija između količine ukupnih hidroksicimetnih kiselina u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



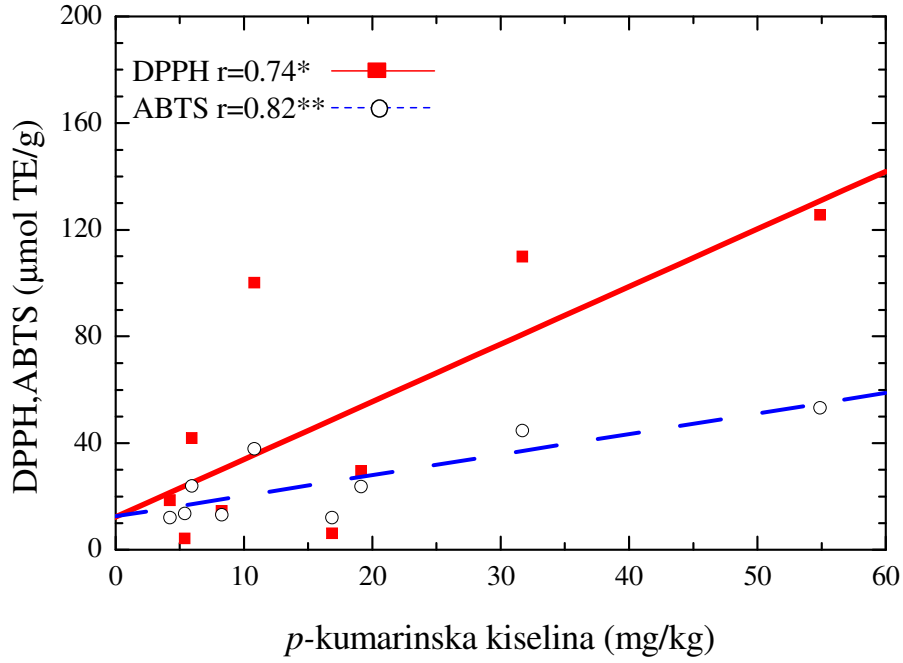
Slika 38. Korelacija između količine ukupnih flavanola u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



Slika 39. Korelacija između količine kvercetina u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



Slika 40. Korelacija između količine kafeinske kiseline u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)



Slika 41. Korelacija između količine *p*-kumarinske kiseline u voću i antioksidacijske aktivnosti ispitivanog voća (određene DPPH i ABTS metodama)

Tablica 15. Koeficijenti korelacije (r) između antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i ABTS metodama i količine pojedinih polifenolnih spojeva u ispitivanom voću

Polifenolni spoj Ili grupa spojeva	Koeficijent korelacije (r)		n
	DPPH (μmolTE/g)	ABTS (μmolTE/g)	
Ukupni polifenoli (mg/kg FW)	0.98***	0.98***	10
Ukupni antocijanini (mg/kg FW)	0.93***	0.90***	10
Ukupni flavonoli (mg/kg FW)	0.79**	0.73*	10
Ukupni flavanoli (mg/kg FW)	0.62	0.66	5
Ukupne fenolne kiseline (mg/kg FW)	0.16	0.13	10
Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg/kg FW)	0.66*	0.64*	10
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline (mg/kg FW)	-0.41	-0.38	6
Derivati cijanidina (mg/kg FW)	0.85**	0.83**	10
Cijanidin-3-glukozid (mg/kg FW)	0.28	0.22	8
miricetin (mg/kg FW)	0.99**	0.98*	4
kvercetin(mg/kg FW)	0.73*	0.68*	10
kemferol(mg/kg FW)	0.21	0.25	9
(+)-katehin (mg/kg FW)	-0.02	-0.06	5
(-)-epikatehin (mg/kg FW)	0.99*	0.99*	3
kafeinska kiselina(mg/kg FW)	0.91***	0.94***	9
p-kumarinska kiselina(mg/kg FW)	0.74*	0.82**	9
ferulična kiselina(mg/kg FW)	0.77	0.71	4
Elaginska kiselina (mg/kg FW)	-0.53	-0.49	5

*,**,*** označavaju značajnost za $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$

n= broj podataka za računanje koeficijenta korelacije

5. RASPRAVA

Da bi se ispitao utjecaj polifenola na antioksidacijsku aktivnost voća, u prvom redu bilo je potrebno karakterizirati polifenolne spojeve voća tj. identificirati ih i kvantitativno odrediti. Nakon određivanja antioksidacijske aktivnosti voća, povezanost antioksidacijske aktivnosti voća i količine i vrste polifenola, ispitana je regresijskom analizom.

5.1. Ukupni polifenoli i ukupni antocijanini u voću

Ukupna količina polifenolnih spojeva ispitivanog voća, koja je određena primijenom spektroskopske Folin-Ciocalteu metode, prikazana je u tablici 7. Provedene analize pokazale su da se ispitivano voće značajno razlikuje po količini polifenolnih spojeva. Najveće količine polifenola pronađene su u aroniji (7194 mg kg^{-1}), borovnici (6180 mg kg^{-1}), crnom ribizu (5435 mg kg^{-1}) i bobicama bazge (4415 mg kg^{-1}) dok ostale vrste voća sadrže znatno manje količine polifenolnih spojeva [kupina (3658 mg kg^{-1}), višnja (2905 mg kg^{-1}), trešnja (2011 mg kg^{-1}), jagoda (1999 mg kg^{-1}), crveni ribiz (1948 mg kg^{-1}) i malina (1763 mg kg^{-1})]. Količine ukupnih polifenolnih spojeva dobivene u ispitivanim uzorcima voća u skladu su s podacima objavljenim u literaturi (2,3,40,45,64,80,95,120,139-141). Aronija, koja se ističe između ispitivanih vrsta voća kao vrsta s izrazito velikom količinom polifenola sadrži čak 2 do 4 puta više polifenola nego voće kao što su maline, kupine, višnje, trešnje, jagode, crveni ribiz.

Količina ukupnih antocijanina u voću određena je spektroskopskom pH-diferencijalnom metodom s ciljem određivanja ukupne količine antocijanina kao jedne od najvažnijih podskupina polifenolnih spojeva (tablica 7). Iz rezultata je moguće vidjeti da je količina antocijanina u ispitivanom voću vrlo raznolika (od 169 mg kg^{-1} u jagodi do 4069 mg kg^{-1} u borovnici), a dobivene vrijednosti u skladu su s podacima objavljenim u literaturi (2,3,40,41,62,80,97,45,103,120,139,140). Borovnice su najbogatije antocijaninima (4069 mg kg^{-1}), ali je sadržaj antocijanina visok i u aroniji (3572 mg kg^{-1}), bobicama bazge (3175 mg kg^{-1}) i crnom ribizu (2189 mg kg^{-1}). Ostalo ispitivano voće sadrži čak 3 do 24 puta manje antocijanina u usporedbi s borovnicom. Iz omjera UA/UP može se vidjeti da je udio antocijanina u ukupnom sadržaju polifenola ispitivanog voća znatan (tablica 7). U borovnici su antocijanini zastupljeni sa čak 66 % u ukupnoj količini polifenolnih spojeva, a zauzimaju vrlo visok udio i u polifenolima bobica bazge (72 %), aronije (50 %) i crnog ribiza (40%). Prema tome, antocijanini su u navedenom voću dominantni polifenolni spojevi te je za očekivati da je udio ostalih polifenolnih spojeva u ovom voću vjerojatno manji. U višnji i kupini udio antocijanina je također značajan (redosljedom 39 %, 29 %), a za razliku od spomenutog voća, udio antocijanina u malinama,

trešnjama, crvenom ribizu i jagodama je manji (redosljedom 13 %, 10 %, 10%, 8%) što ukazuje na veći udio nekih drugih skupina polifenola u ovom voću.

5.2. Antocijanini, flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću

Da bi se identificirali pojedini polifenolni spojevi prisutni u voću te da bi se odredila njihova distribucija i rasprostranjenost u voću, provedena je detaljna analiza uzoraka voća primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

5.2.1. Validacija HPLC metoda, identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva u voću

Pomoću HPLC metode koja je primijenjena za analizu antocijanina, razdvojeni su standardi antocijanina u vremenu od 18 do 30 minuta (tablica 8, slika 17). Druga metoda, kojom su analizirani flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline, razdvojila je dane standardne spojeve u vremenu od 14 do 30 minuta (tablica 8, slika 17). Obje metode pokazale su linearan odziv u ispitivanom području koncentracija (antocijanini r^2=0.9958-0.9997; flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline r^2=0.9963-0.999) (tablica 8). Granice detekcije (tablica 8) za antocijanine iznose 0.09-1.18 mg l^{-1}. Nešto veća vrijednost granice detekcije za spoj cijanidin-3-rutinozid rezultat je bliskog eluiranja cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-glukozida. No računanjem koeficijenta separacije (α) pokazalo se da su ta dva spoja ipak dovoljno razdvojena na koloni pri uvjetima HPLC analize antocijanina. Granice detekcije za flavonole, flavanole i fenolne kiseline iznose 0.07-1.12 mg l^{-1}. Koeficijenti varijacije pojedinih antocijanina iznose od 0.02 % do 5.95 % (tablica 9a) što ukazuje na dobru preciznost provedenih mjerenja. Raspon koeficijenta varijacije pojedinih flavonola i fenolnih kiselina je 0.6 % do 8.0 % (tablica 10) te se i ova metoda može smatrati dovoljno preciznom za određivanje ispitivanih polifenola u voću. Iskorištenja metoda (tablica 9b i 10) su dobra ili tolerantna, a iznose 86% do 96 % za standarde antocijanina te 87% do 106 % za standarde flavonola, flavanola i fenolnih kiselina. Validirane HPLC metode upotrijebljene su za identifikaciju i kvantifikaciju antocijanina, flavonola, flavanola, hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina.

Identifikacija antocijanina u voću provedena je usporedbom spektara standarda antocijanina sa spektrima antocijanina prisutnih u voću u području valnih duljina od 190 do 600 nm te usporedbom retencijskih vremena standarda sa retencijskim vremenima antocijanina prisutnih u voću. Nadalje, identifikacija antocijanina provedena je i dodavanjem standarda

antocijanina u svaki uzorak voća. Primjer kromatograma voća s dodanim standardima antocijanina dan je na slici 18. Ova slika prikazuje preklopljeni kromatogram uzorka višnje te višnje u koji su dodani standardi cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid. Dodatak standarda cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-rutinozida u uzorak višnje uzrokovao je povećanje onih pikova koji i u izvornom uzorku višnje predstavljaju te antocijanine. Uz provjeru spektara tih spojeva te retencijskih vremena, podatak dobiven dodavanjem standarda nam potvrđuje identifikaciju tih antocijanina. Ostali se pikovi antocijanina u višnji nisu povećali. Dodatna identifikacija antocijanina provedena je usporedbom profila antocijanina pojedinog voća s profilom antocijanina objavljenim u literaturi te su na taj način identificirani svi prisutni antocijanini.

Flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline su isto tako identificirani usporedbom spektara (190-600 nm) i retencijskih vremena standarda flavonola, flavanola i fenolnih kiselina sa spektrima i retencijskim vremenima odgovarajućih pikova u voću. Nadalje da bi se dobili dodatni podaci za identifikaciju, provedeno je dodavanje standarda flavonola, flavanola i fenolnih kiselina u svaki uzorak voća. Slike 19, 20 i 21 prikazuju primjere kromatograma pojedinih uzoraka voća preklopljenih s kromatogramima voća u koje su dodani standardi. U ekstrakt jagode pripremljen za analizu flavonola, dodani su standardi miricetin, kvercetin i kemferol (slika 19). Pikovi koji predstavljaju te standarde dali su povećanu površinu, a usporedbom kromatograma jagode u koji su dodani standardi i kromatograma jagode u koji nisu dodani standardi mogu se identificirati pikovi koji pripadaju miricetinu, kvercetinu i kemferolu u jagodi. U ekstrakte jagode i borovnice dodani su standardi fenolnih kiselina (slike 20 i 21), a povećanje površine pikova omogućava identificiranje fenolnih kiselina u uzorku.

Količina identificiranih polifenolnih spojeva određena je pomoću kalibracijskih krivulja dobivenih za pojedini standardni polifenolni spoj.

5.2.2. Antocijanini u voću

Kromatogrami antocijanina identificiranih u voću prikazani su na slici 22. Količine pojedinih antocijanina u voću, kao i njihov udio (%) u ukupnoj količini antocijanina prikazani su u tablici 11. Analizom pomoću HPLC metode najveće količine antocijanina pronađene su u borovnici (4510 mg kg^{-1}), aroniji (3462 mg kg^{-1}), bazgi (3155 mg kg^{-1}) i crnom ribizlu (2533 mg kg^{-1}) isto kao i analizom pomoću spektroskopske metode. Ostalo voće ima znatno manje količine antocijanina.

Za **borovnicu** je karakterističan vrlo raznolik profil antocijanina. Identificirani su derivati čak pet skupina antocijanidina: derivati delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina.

Identifikacija se slaže s rezultatima prethodnih istraživanja (19,46,122,142,143). Derivati cijanidina najzastupljeniji su i čine 32 % u ukupnoj količini antocijanina (cijanidin-3-glukozid 1087 mg kg^{-1}, cijanidin-3-galaktozid 370 mg kg^{-1}). Veliku skupinu čine i derivati delfinidina (delfinidin-3-glukozid 532 mg kg^{-1}, delfinidin-3-galaktozid 253 mg kg^{-1}, delfinidin-3-arabinozid 140 mg kg^{-1}), a zastupljeni su sa 20.5 % u ukupnoj količini antocijanina borovnice. Derivati peonidina zastupljeni su sa 19.6 % (peonidin-3-glukozid 834 mg kg^{-1},peonidin-3-arabinozid 50 mg kg^{-1}), derivati petunidina sa 15.8 % (petunidin-3-glukozid 713 mg kg^{-1}), a derivati malvidina sa 11.7 % (malvidin-3-galaktozid 442 mg kg^{-1}, malvidin-3-glukozid 90 mg kg^{-1}). Slična distribucija pojedinih grupa antocijanina pronađena je i u ranijim istraživanjima gdje su cijanidin derivati zauzimali 30 do 36%, delfinidin derivati 34 do 39 % , peonidin derivati 2 do 6%, petunidin derivati 11 do 14 %, a malvidin derivati 12 do 16% u ukupnoj količini antocijanina borovnice (*Vaccinium myrtillus*) (4,19,46).

Prevladavajući antocijanin pronađen u **kupini** je cijanidin-3-glukozid (1060 mg kg^{-1}) koji u ukupnoj količini antocijanina zauzima čak 90 %, dok su ostali antocijanini pronađeni u znatno manjoj količini (cijanidin-3-rutinozid 15 mg kg^{-1}; cijanidin-3-ksilozid 97 mg kg^{-1}). Ovi antocijanini identificirani su u kupini i u istraživanjima drugih istraživača (47,93). U najvećoj količini pronađen je cijanidin-3-glukozid (44 do 95 % u različitim sortama kupine) (93) kao i u ovom radu, a ostali identificirani antocijanini, uključujući cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-ksilozid pronađeni su u malim količinama (93). Količina antocijanina u kupini u skladu je s vrijednostima pronađenima u literaturi (47,93).

Aronija sadrži mješavinu 4 različita glikozida cijanidina: 3-galaktozida, 3-arabinozida, 3-glukozida i 3-ksilozida. Cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid su prisutni u najvećoj količini (2385 mg kg^{-1}, 848 mg kg^{-1}) i zastupljeni su sa >93 % u ukupnoj količini antocijanina dok je koncentracija cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-ksilozida puno niža. Prema ranije objavljenim podacima, glavni antocijanini aronije su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid, a slijede ih cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-ksilozid (46,47,79,115,122,142,144) što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

Jagoda je jedino voće između ispitivanih vrsta voća u kojoj dominiraju derivati pelargonidina; pelargonidin-3-glukozid, (136 mg kg^{-1}) i pelargonidin-3-rutinozid (31 mg kg^{-1}). Ta dva antocijanina zajedno su zastupljena sa >96 % u ukupnoj količini antocijanina. Količina cijanidin-3-glukozida je niska (6 mg kg^{-1}, 4%). Istraživanja drugih istraživača potvrdila su da su za jagodu karakteristični isti derivati pelargonidina koji su identificirani i ovim istraživanjem, te da oni dominiraju u jagodi, dok je cijanidin-3-glukozid prisutan u puno manjoj količini (7,145-147).

Dominantni antocijanin pronađen u **malini**, koji je zastupljen sa 79.8 % u ukupnoj količini antocijanina, je cijanidin-3-soforozid (196 mg kg^{-1}). Osim njega, pronađeni su cijanidin-3-glukozid (35 mg kg^{-1}) i pelargonidin-3-soforozid (15 mg kg^{-1}) u manjim količinama. Antocijanini pronađeni u istraživanjima drugih istraživača u ranim sortama maline (sorta Heritage) su cijanidin-3-soforozid, cijanidin-3-glukozid i pelargonidin-3-soforozid što se slaže s rezultatima u ovom radu (92). Prema istraživanjima drugih istraživača, glavni antocijanini u malini su derivati cijanidina i pelargonidina (7,46,47,96,148,149), ali profil antocijanina u malini može biti vrlo različit te su u nekim kasnim sortama maline pronađeni derivati malvidina i delfinidina (96).

Prevladavajući antocijanin u **trešnji** je cijanidin-3-rutinozid (108 mg kg^{-1}), a slijedi ga cijanidin-3-glukozid (31 mg kg^{-1}). Ta dva antocijanina zastupljena su sa 91.4 % u ukupnoj količini antocijanina dok je količina derivata peonidina puno niža [peonidin-3-rutinozida (6 mg kg^{-1}) i peonidin-3-glukozida (7 mg kg^{-1})]. Prema podacima ranijih istraživanja trešnja sadrži derivate cijanidina, peonidina i pelargonidina, među kojima su glavni cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-glukozid kao i u ovom radu, dok su 3-rutinozidi i 3-glukozidi pelargonidina i peonidina prisutni u daleko manjoj količini (7,47,150,151).

U **višnji** su pronađeni samo derivati cijanidina i to cijanidin-3-glukozilrutinozid (660 mg kg^{-1}, 61.4 %), cijanidin-3-rutinozid (335 mg kg^{-1}, 31.2 %), cijanidin-3-glukozid (38 mg kg^{-1}, 3.5 %) i cijanidin-3-soforozid (42 mg kg^{-1}, 3.9%) što se slaže s prije objavljenim podacima (98,148,152).

Glavni antocijanini identificirani u **bobicama bazge** su derivati cijanidina. Cijanidin-3-sambubiozid i cijanidin-3-glukozid eluiraju zajedno (2622 mg kg^{-1}), dominantni su u bazgi i zajedno čine 83 % u ukupnoj količini antocijanina bobica bazge. Iza njih slijede cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid (476 mg kg^{-1}) te cijanidin-3-rutinozid (57 mg kg^{-1}). Ranija istraživanja potvrdila su da su glavni antocijanini u bazgi derivati cijanidina, a među njima dominiraju cijanidin-3-sambubiozid i cijanidin-3-glukozid (47,79,115,122,142,148,153) kao i u ovom radu.

U **crvenom ribizlu** identificirani su, također, samo derivati cijanidina. U najvećoj koncentraciji prisutan je cijanidin-3-ksilozilrutinozid (117 mg kg^{-1}), a slijede ga cijanidin-3-rutinozid (54 mg kg^{-1}) i cijanidin-3-sambubiozid (27 mg kg^{-1}). Ti rezultati slažu se s rezultatima koji su nađeni u literaturi (46,47,79).

Za **crni ribiz** su karakteristični derivati cijanidina i delfinidina na koji su vezane molekule glukoze ili rutinoze. Derivati rutinozida prisutni su u većoj količini (delfinidin-3-rutinozid 1112 mg kg^{-1}, cijanidin-3-rutinozid 912 mg kg^{-1}) i zajedno zauzimaju 79.9 % u ukupnoj količini antocijanina. Prema literaturnim podacima crni ribiz sadrži rutinozide i

glukozide delfinidina i cijanidina (19,46,47,79,115,122,148,154-156), što se slaže s rezultatima ovog rada.

5.2.3. Flavonoli, flavanoli i fenolne kiseline u voću

Slika 23 prikazuje kromatograme voća s identificiranim pikovima flavonola. Koncentracija flavonola u voću dana je u tablici 12. Kromatogrami voća s identificiranim flavanolima, hidroksibenzojevim i hidroksicimetnim kiselinama prikazani su na slikama 24, 25, 26 i 27. Koncentracije flavanola i fenolnih kiselina dane su u tablici 13.

Borovnica se, između ispitivanih vrsta voća, ističe najvećom količinom ukupnih flavonola (183 mg kg^{-1}), ukupnih flavanola (255 mg kg^{-1}) te ukupnih hidroksicimetnih kiselina (92 mg kg^{-1}). Kvercetin je glavni flavonol borovnice (137 mg kg^{-1}), a slijedi ga miricetin (43 mg kg^{-1}). Kemferol je identificiran, ali u znatno manjoj količini (3 mg kg^{-1}). Osim flavonola, u borovnici su identificirani flavanoli (-)-epikatehin (256 mg kg^{-1}) i (+)-katehin (2 mg kg^{-1}), te fenolne kiseline: *p*-kumarinska kao dominantna (55 mg kg^{-1}), kafeinska kiselina (27 mg kg^{-1}) i ferulična kiselina (10 mg kg^{-1}). U ranijim istraživanjima u borovnici (*Vaccinium myrtillus*) su pronađeni isti polifenolni spojevi u sličnim omjerima (4,8,44,157).

Za **kupinu** je karakterističan visok sadržaj fenolnih kiselina (138 mg kg^{-1}) zahvaljujući visokoj koncentraciji elaginske kiseline (121 mg kg^{-1}). Uz elaginsku kiselinu koja je dominantna, pronađene su niske koncentracije kafeinske (6 mg kg^{-1}), *p*-kumarinske (6 mg kg^{-1}) i ferulične kiseline (5 mg kg^{-1}). Flavonoli kupine su kvercetin (55 mg kg^{-1}) kao dominantan i kemferol (2 mg kg^{-1}). Jedini flavanol prisutan u kupini je (+)-katehin (6 mg kg^{-1}) što je u skladu s ranijim istraživanjima (45,101).

Aronija se ističe visokom količinom flavonola (99 mg kg^{-1}). Dominantan flavonol je kvercetin (92 mg kg^{-1}), a slijedi ga kemferol (7 mg kg^{-1}), ali u znatno manjoj količini. Prema rezultatima ranijih istraživanja dominantan flavonol u aroniji je kvercetin (4,7,18,102) dok kemferol nije identificiran (7,102) ili je pronađen u maloj količini (4,18) što se slaže s rezultatima u ovom radu. Količina fenolnih kiselina nije toliko znatna, no pronađene su kafeinska kiselina (38 mg kg^{-1}) i mala količina elaginske kiseline (4 mg kg^{-1}) što je u skladu s literaturnim podacima (4,9,18,144). Između svih vrsta ispitivanog voća, aronija se ističe najvećim sadržajem kafeinske kiseline te visokim sadržajem kvercetina.

U **jagodi** su fenolne kiseline prisutne u većoj količini (58 mg kg^{-1}) nego flavonoli (14 mg kg^{-1}) ili flavanoli (32 mg kg^{-1}). Elaginska kiselina (41 mg kg^{-1}) je dominantna, a slijedi ju *p*-kumarinska kiselina (17 mg kg^{-1}). Za jagodu su karakteristični flavonoli kemferol (8 mg kg^{-1}) i kvercetin (6 mg kg^{-1}) koji su pronađeni u vrlo maloj količini, te flavanoli (+)-katehin (9 mg kg^{-1})

i (-)-epikatehin (22 mg kg^{-1}) što se slaže s rezultatima prethodnih istraživanja (9,10,95,102,103,147,157,158).

I za **malinu** je karakterističan veći sadržaj fenolnih kiselina (48 mg kg^{-1}) kao i za jagodu. Dominantna je elaginska kiselina (32 mg kg^{-1}), a pronađena je i kafeinska (3 mg kg^{-1}), ferulična (4 mg kg^{-1}), *p*-kumarinska (4 mg kg^{-1}) i *p*-hidroksibenzojeva kiselina (5 mg kg^{-1}) što je u skladu s prije objavljenim podacima (18,19,44,46). Količina flavonola u malini izrazito je mala. Pronađen je samo kvercetina (4 mg/kg) što se slaže s već objavljenim podacima (9, 102).

U **trešnji** su flavonoli [kvercetin (9 mg kg^{-1}), kemferol (6 mg kg^{-1}) i miricetin (0.2 mg kg^{-1})] i fenolne kiseline [kafeinska (12 mg kg^{-1}) i *p*-kumarinska kiselina (5 mg kg^{-1})] prisutni u maloj količini. Ovi rezultati slažu se s dostupnim literaturnim podacima (80,151).

Višnja sadrži male količine flavonola kvercetina (5 mg kg^{-1}) i kemferola (2 mg kg^{-1}). Fenolne kiseline identificirane u višnji su *p*-kumarinska (19 mg kg^{-1}) i kafeinska kiselina (9 mg kg^{-1}). Ovi flavonoli i fenolne kiseline pronađeni su u višnji i ranijim istraživanjima (80).

Bobice bazge se između ispitivanih vrsta voća ističu najvećom količinom kvercetina (144 mg kg^{-1}). Bazga sadrži i kemferol, ali u vrlo maloj količini (2 mg kg^{-1}). Prethodni rezultati potvrđuju da su za bobice bazge karakteristične visoke količine kvercetina i izrazito male količine kemferola (4). Od fenolnih kiselina, u bazgi su pronađene kafeinska (16 mg kg^{-1}) i *p*-kumarinska kiselina (11 mg kg^{-1}) što se slaže s rezultatima ranijih istraživanja (4).

Crni ribiz sadrži visoke količine ukupnih flavonola (73 mg kg^{-1}) i ukupnih fenolnih kiselina (74 mg kg^{-1}) koji su u ovom voću jednoliko raspoređeni. Glavni flavonol je miricetin (44 mg kg^{-1}), a slijede ga kvercetin (21 mg kg^{-1}) i kemferol (7 mg kg^{-1}). U nekim istraživanjima pronađeno je da je glavni flavonol crnog ribiza miricetin (4,102,156) što se slaže s rezultatima ovog rada, dok je u nekim istraživanjima ustanovljeno da je glavni flavonol u crnom ribizu kvercetin (6,9). U crnom ribizu prisutan je (+)-katehin (13 mg kg^{-1}) kao što se pokazalo i u ranijem istraživanju (4), dok (-)-epikatehin nije identificiran. Fenolne kiseline karakteristične za crni ribiz su *p*-kumarinska kiselina kao dominantna (32 mg kg^{-1}), kafeinska (21 mg kg^{-1}) i ferulična kiselina (17 mg kg^{-1}), dok je količina elaginske kiseline mala (3 mg kg^{-1}). Te fenolne kiseline pronađene su u crnom ribizu i u ranijim istraživanjima (4,6,9,156).

Crveni ribiz sadrži male količine flavonola [kvercetin (9 mg kg^{-1}), miricetin (2 mg kg^{-1}) i kemferol (0.34 mg kg^{-1})] i flavanola [katehin (4 mg kg^{-1}) i (-)-epikatehin (22 mg kg^{-1})]. Fenolne kiseline prisutne u crvenom ribizu su kafeinska (13 mg kg^{-1}), *p*-kumarinska (8 mg kg^{-1}) i *p*-hidroksibenzojeva kiselina (13 mg kg^{-1}). Po identificiranoj *p*-hidroksibenzojevoj kiselini crveni ribiz se izdvaja između ispitivanih vrsta voća, jer je ova kiselina, osim u crvenom ribizu,

identificirana još jedino u malini. Ti rezultati u skladu su s nekima objavljenim ranije (4,6,9,102).

5.3. Rasprostranjenost pojedinih polifenola u voću

Slika 28 prikazuje rasprostranjenost pojedinih **flavonola** u svakoj vrsti voća, a prikazana je u postocima u odnosu na ukupnu količinu flavonola. Kvercetin je najrasprostranjeniji flavonol, pronađen u svim vrstama ispitivanog voća i čini visoki udio u ukupnoj količini flavonola. Udio kvercetina u bazgi iznosi 99 %, u kupini 96 %, u borovnici 75 %, u aroniji 93 %. Miricetin je karakterističan za crni (60 %) i crveni ribiz (16 %) koji pripadaju rodu *Ribes*, te za borovnicu (24%) (porodica *Ericaceae*). Iako je kemferol pronađen u malim količinama u ispitivanom voću (tablica 11), on je rasprostranjeniji od miricetina jer je pronađen u svim vrstama voća, osim u malini. U većim količinama pronađen je jedino u jagodi, trešnji i višnji (redosljedom 55 %, 41 %, 32 % u ukupnoj količini flavonola).

Flavanoli su identificirani samo u borovnici, jagodi, crvenom i crnom ribizlu te u kupini, dok u ostalim vrstama voća nisu pronađeni te se može zaključiti da ovi spojevi nisu rasprostranjeni u ispitivanom voću kao flavonoli (tablica 12).

Rasprostranjenost **fenolnih kiselina** u voću vrlo je raznolika, a udio pojedine kiseline (u %) u svakom voću prikazan je na slici 29. Kafeinska kiselina vrlo je rasprostranjena u voću i nalazi se u svim vrstama ispitivanog voća, osim u jagodi. Visok udio kafeinske kiseline ima aronija (91 %), trešnja (68 %) te bazga (60 %). *P*-kumarinska kiselina je rasprostranjena isto kao i kafeinska kiselina i nalazi se u svom ispitivanom voću osim u aroniji. Ova kiselina zauzima visok udio u fenolnim kiselinama višnje (68 %), borovnice (60 %) te crnog ribizla (43 %). Ferulična kiselina pronađena je samo u crnom ribizlu (23 %), borovnici (10 %), malini (9 %) i kupini (4 %) i nije rasprostranjena u voću kao kafeinska i *p*-kumarinska. Elaginska i *p*-hidroskibenzojeva kiselina karakteristične su za pojedine vrste voća. Elaginska čini veliki udio u fenolnim kiselinama kupine (88 %), a pronađena je još u značajnim udjelima u jagodi (71 %) i malini (66 %). *P*-hidroksibenzojeva kiselina prisutna je samo u crvenom ribizlu (37 %) i u malini (10 %). Iz rezultata (slika 29) je vidljivo da su hidroksicimetne kiseline rasprostranjenije u ispitivanom voću od hidroksibenzojevih kiselina.

Cjelokupni rezultati za količinu i rasprostranjenost polifenola u svakom pojedinom voću koje je ispitivano u ovom radu sažeti su na slikama 30 i 31. Slika 30 prikazuje količinu flavonola, flavanola, fenolnih kiselina i antocijanina u svakoj voćnoj vrsti dok je na slici 31 prikazana rasprostranjenost (u %) tih grupa polifenola u voću. Iz rezultata se vidi da su

antocijanini dominantni polifenolni spojevi ispitivanog tamno obojenog sitnog voća. Oni su u višnji zastupljeni s 97 %, u aroniji sa 96 %, u bobicama bazge sa 95 %, u crnom ribizlu sa 94 %, a i u ostalom voću čine najveći dio u ukupnoj koncentraciji polifenola (od 62 do 90%). Ostale grupe polifenola slabije su zastupljene u ispitivanom voću. Fenolne kiseline se nalaze većim udjelom jedino u jagodi (21%) i malini (16 %). Flavonoli su zastupljeni niskim udjelom u ukupnim polifenolima (0.7 do 8 %). Između ispitivanih vrsta voća mogu se izdvojiti borovnica, aronija, bazga i crni ribiz koji sadrže najveće količine ispitivanih polifenola (slika 30). Koncentracija polifenola u kupini i višnji nešto je manja, a ostale vrste voća (jagoda, malina, trešnja, crveni ribiz) imaju znatno manju koncentraciju polifenolnih spojeva (slika 30).

5.3.1. Sličnosti i razlike u rasprostranjenosti polifenolnih spojeva u voću

Svih deset vrsta voća razlikuje se značajno po količini polifenolnih spojeva, ali su primjećene neke sličnosti i razlike u rasprostranjenosti polifenola između voća koje pripada istom rodu.

Kupina i malina pripadaju istom rodu *Rubus*, a znatno se razlikuju po količini ukupnih polifenola i ukupnih antocijanina. Kupina sadrži dvostruko veću količinu ukupnih polifenola, te skoro pet puta veću količinu ukupnih antocijanina od maline (tablica 7). No, ako se pogleda zastupljenost pojedinih grupa polifenolnih spojeva, vidljive su sličnosti između te dvije voćne vrste. Tako su antocijanini u malini i kupini zastupljeni s 85 % i 82% (slika 31), a glavni antocijanini su derivati cijanidina (tablica 11). Fenolne kiseline zauzimaju od 10-16 % u ukupnoj količini polifenola, što je s obzirom na ostalo voće vrlo visok postotak (slika 31). I malina i kupina sadrže elaginsku kiselinu, iako je količina elaginske kiseline veća u kupini. Količina kafeinske, *p*-kumarinske i ferulične kiseline vrlo je slična i u kupini i u malini (tablica 13). Flavonoli su u kupini i malini zastupljeni s vrlo niskim udjelom (1-6 %).

Trešnja i višnja pripadaju rodu *Prunus*. Ovo voće znatno se razlikuju po količini ukupnih antocijanina i ukupnih polifenola jer višnja sadrži skoro šest puta veću količinu antocijanina od trešnje te nešto veću količinu ukupnih polifenola (tablica 7). U rasprostranjenosti pojedinih grupa polifenolnih spojeva vidljive su neke sličnosti (slika 31). Antocijanini su zastupljeni s 83-97 % (slika 31), a glavni antocijanini pripadaju derivatima cijanidina (tablica 11). U ove dvije vrste voća pronađene su iste fenolne kiseline, kafeinska i *p*-kumarinska, a zastupljene su s 3-9 %. Flavonoli čine 1-8 % u ukupnoj količini polifenola, dok flavanoli nisu pronađeni (slika 31).

Crni i crveni ribiz pripadaju rodu *Ribes* i, bez obzira na pripadnost istom rodu voća, značajno se razlikuju po količini polifenolnih spojeva. Tako crni ribiz ima skoro tri puta veću količinu ukupnih polifenola nego crveni ribiz te oko deset puta veću količinu antocijanina od

crvenog ribiza (tablica 7). Crni i crveni ribiz razlikuju se i po vrsti antocijanina, jer su u crnom ribizu pronađeni derivati delfinidina i cijanidina dok se u crvenom ribizu nalaze samo derivati cijanidina (tablica 11). Antocijanini su zastupljeni sa 74-94 %, flavonoli 3-4 % (slika 31). U crvenom ribizlu nešto je veći postotak fenolnih kiselina (13 %) i flavanola (10 %) nego u crnom ribizu (fenolne kiseline 3 %; flavanoli 1 %) (slika 31).

S obzirom na količinu i polifenolni profil, neke vrste voća ističu se između ostalog voća. Tako se aronija ističe najvećom količinom ukupnih polifenola (tablica 7). Ima također veliku količinu antocijanina, flavonola i fenolnih kiselina. Borovnica se ističe najvećom količinom flavonola, flavanola (tablica 12) te antocijanina (tablica 7), a profil antocijanina (tablica 11) je vrlo raznolik što ju razlikuje od ostalog ispitivanog voća. Bazga je voće bogato antocijaninima, flavonolima, a ističe se najvećom količinom kvercetina (tablica 12). Kupina ima najveću količinu fenolnih kiselina uglavnom zbog visoke količine elaginske kiseline (tablica 13). Jagoda se ističe visokim sadržajem derivata pelargonidina što ju razlikuje od ostalih ispitivanih vrsta voća, a crni ribiz ima veliku količinu derivata delfinidina, koji se uz crni ribiz pojavljuju još jedino u borovnici (tablica 11).

5.4. Voće kao funkcionalna hrana

Iz rezultata drugih istraživača poznato je da polifenolni spojevi pokazuju pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje. Oni djeluju antiupalno, antikancerogeno, antimikrobno (20-25, 159), a pri tome se najviše ističu neki polifenoli; npr. derivati kvercetina (21,23), derivati kafeinske, ferulične kiseline (160), antocijanini (161). Prema nekim istraživanjima niže koncentracije kvercetina (10-25 μmol l^{-1}) imaju zaštitni učinak na citotoksičnost izazvanu vodikovim peroksidom, pozitivno djeluju protiv oštećenja DNA molekula te utječu na apoptozu kancerogenih stanica. Ako bi se uzimali dodaci prehrani s 1-2 g kvercetina, koncentracija kvercetina u plazmi bila bi od 10 do 50 μmol l^{-1} (162) što bi moglo imati pozitivan utjecaj na zdravlje. Esteri kafeinske i ferulične kiseline inhibiraju širenje stanica tumora, kao i lipidnu peroksidaciju *in vitro* (160), a esteri kafeinske kiseline mogu biti i potencijalna kemoterapija protiv nekih vrsta oralnih tumora (163). Elaginska kiselina pokazuje kemopreventivno djelovanje (sposobnost blokiranja procesa transformacije normalne stanice u tumornu stanicu) (164,165). Za antocijanine je poznato da pokazuju razna pozitivna djelovanja u ljudskom organizmu (161), ali se pojedini antocijanini, kao što su delfinidin-3-glukozid, delfinidin-3-rutinozid i cijanidin-3-glukozid, ističu snažnijim antioksidacijskim djelovanjem *in vitro* (117). Na osnovu rezultata ovog rada, neke vrste voća ističu se upravo povećanom količinom određenih polifenolnih

spojeva za koje je dokazano da pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje. Znatnom količinom kvercetina ističu se bobice bazge, borovnica i aronija, a aronija je bogata i derivatima kafeinske kiseline. Elaginska kiselina je pronađena u relativno velikoj količini u kupini, jagodi i malini, a antocijaninima su osobito bogate borovnice, aronija, bobice bazge i crni ribiz. Navedeno voće može se smatrati vrlo dobrom sirovinom koja može poslužiti za proizvodnju hrane obogaćene polifenolnim spojevima. No, pošto neki polifenoli u određenim uvjetima i koncentracijama mogu imati prooksidativno djelovanje (162,166,167) ili mogu djelovati sinergistički (168) i dalje je potrebno provoditi detaljna istraživanja djelovanja ovih spojeva da bi se utvrdile stvarne djelotvorne koncentracije te sinergistička djelovanja polifenola s ostalim spojevima prisutnim u hrani.

I ekstrakti voća u kojim se nalazi prirodna koncentrirana mješavina polifenola pokazuju pozitivno djelovanje na ljudski organizam. Tako npr. sok od aronije bogat različitim polifenolima, inhibira širenje malignih stanica (169). Takvo djelovanje pokazali su i ekstrakti borovnice, crnog ribiza, višnje i maline, a pri tome su jedni od najaktivnijih ekstrakti borovnice i crnog ribiza (170). Istraživana je također sposobnost nekih ekstrakata voća (kupine, crne maline, borovnice, brusnice, maline i jagode) da inhibiraju širenje stanica raka debelog crijeva, prostate i grudi (171). Utvrđeno je da ovi ekstrakti inhibiraju rast malignih stanica te stimuliraju njihovu apoptozu (programiranu smrt stanice), a pri tome su najaktivniji ekstrakti crne maline i jagode (171). Povećanjem koncentracije ekstrakta voća povećava se sposobnost inhibiranja širenja malignih stanica (171). Osim toga, voće i voćni sokovi bogati polifenolima također poboljšavaju antioksidacijski status organizma (167). Različito biološko djelovanje pojedinog voća u ljudskom organizmu vjerojatno je rezultat velike raznolikosti u strukturnoj građi te količini polifenola koji se nalaze u voću (172,173). Iz rezultata ovog rada može se vidjeti koliko je različit polifenolni sastav svakog pojedinog voća, a posebno se na temelju ukupnog polifenolnog sastava te sadržaja i vrste polifenola ističu četiri vrste voća: aronija, bobice bazge, borovnica i crni ribiz, tj. vrste voća za koje je i ranijim istraživanjima dokazano da mogu imati pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje.

5.5. Antioksidacijska aktivnost voća

Antioksidacijska aktivnost voća određena je DPPH metodom koja za slobodni radikal koristi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil te primjenom ABTS metode koja za radikal koristi 2,2'-azinobis(3-etillbenzotiazoline-6-sulfonsku kiselinu. Obje metode su metode kojima se mjeri sposobnost antioksidansa da hvataju (engl. „scavenge“) slobodne radikale. Ove metode odabrane

su za određivanje antioksidacijske aktivnosti voća pošto je hvatanje slobodnih radikala jedan od mehanizama prema kojima pojedini polifenolni spojevi djeluju kao antioksidansi. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene ovim metodama (tablica 14) razlikuju se zbog različitog slobodnog radikala korištenom u metodama te zbog različitog vremena reakcije koje u DPPH metodi iznosi 15 minuta, a u ABTS metodi 1 minutu. No linearna regresija vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene pomoću obje metode pokazala je da su antioksidacijske aktivnosti usporedive te da pokazuju isti slijed (r=0.99***) (slika 32).

Daleko najveću antioksidacijsku aktivnost prema oba radikala pokazuje aronija (181 μmol TE/g DPPH; 79 μmol TE/g ABTS) (tablica14). Nakon aronije slijede borovnica, crni ribiz i bobice bazge (redosljedom 126, 110, 100 μmolTE/g, DPPH metoda), (redosljedom 53, 45, 38 μmolTE/g ABTS metoda). Ove četiri vrste voća koje su pokazale najveću antioksidacijsku aktivnost, imaju također i najveće količine polifenolnih spojeva (tablice 7,11,12 i 13). Ostalo ispitivano voće kao što su kupine, višnje, maline, crveni ribiz, jagode, trešnje, posjeduje znatno slabiju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (redosljedom 42, 30, 19, 14, 6, 4 μmolTE/g; DPPH metoda), (redosljedom 24, 24, 12, 13, 12, 14 μmolTE/g; ABTS metoda). Do sada ima puno podataka u literaturi o antioksidacijskoj aktivnosti voćnih ekstrakata određenih različitim metodama kao što su ORAC metoda (*engl. Oxygen radical absorbing capacity*), ABTS ili DPPH metoda u kojima se može vidjeti da aronija, borovnica, crni ribiz i bobice bazge pokazuju snažnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala (2,3,18,79,115) kao što se pokazalo u ovom radu. Aronija je pokazala najveću antioksidacijsku aktivnost određenu ORAC metodom, a slijedili su je plodovi bazge i crni ribiz (79) ili borovnica (18). U određivanju antioksidacijske aktivnosti koncentrata crvenog voća, najveću antioksidacijsu aktivnost određenu DPPH metodom pokazao je koncentrat aronije kao i u ovom radu, a slijedili su je crni ribiz i plodovi bazge, dok su koncentrati ostalog voća kao što su koncentrati crvenog ribizla, jagode, maline i višnje pokazali nižu antioksidacijsku aktivnost (115). Najveću antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom pokazali su koncentrati crnog ribizla, aronije i plodova bazge, dok je antioksidacijska aktivnost koncentrata crvenog ribizla, jagode, maline i višnje bila znatno niža (115).

5.6. Korelacija između sadržaja i vrste polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća

Provedenom linearnom regresijom između količine ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća, pronađeno je da postoji potpuna korelacija između tih varijabli (DPPH r=0.98***, ABTS r=0.98***) što znači da povećanjem količine ukupnih polifenola u voću raste i

antioksidacijska aktivnost voća (slika 33). No različite grupe polifenolnih spojeva mogu doprinositi različito ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti voća te je zbog toga potrebno promatrati postojanje korelacije između antioksidacijske aktivnosti i pojedinih grupa polifenolnih spojeva kao što su antocijanini, fenolne kiseline, flavonoli.

Veza između ukupnih antocijanina i antioksidacijske aktivnosti prikazana je na slici 34. Pokazalo se da postoji linearna ovisnost između količine ukupnih antocijanina i antioksidacijske aktivnosti voća (DPPH r=0.93***, ABTS r=0.90***) (tablica 15) što ukazuje na moguć visok utjecaj antocijanina na antioksidacijsku aktivnost voća. U ranijim istraživanjima pokazalo se da postoji linearna ovisnost između količine ukupnih antocijanina i antioksidacijske aktivnosti (2,41,79,115) što se slaže s rezultatima u ovom istraživanju. Između svih antocijanina koji su identificirani u voću, derivati cijanidina prisutni su u najvećim količinama. Oni su najrasprostranjeniji i pronađeni su u svim ispitivanim vrstama voća. Povezanost između derivata cijanidina i antioksidacijske aktivnosti voća pokazala se visokim koeficijentom korelacije (DPPH r=0.85**, ABTS r=0.83**) (tablica 15) te je moguće da upravo ovi antocijanini najznačajnije pridonose antioksidacijskoj aktivnosti antocijanina u voću. Ostali antocijanini kao što su derivati delfinidina, pelargonidina i peonidina pronađeni su samo u određenim vrstama voća. Derivati delfinidina nalaze se samo u borovnici i crnom ribizlu, derivati pelargonidina u jagodi i malini, a derivati peonidina u borovnici i trešnji te je broj uzoraka za provedbu linearne regresije i računanje koeficijenta korelacije bio premali. No moguće je da ovi antocijanini imaju utjecaj na antioksidacijsku aktivnost pojedinog voća.

Iako su flavonoli prisutni u manjim količinama u voću u usporedbi s antocijaninima, i ukupni flavonoli pokazuju visoku linearnu ovisnost s antioksidacijskom aktivnošću voća (DPPH, r=0.79**; ABTS, r=0.73*) (slika 35, tablica 15) (no nešto slabiju nego antocijanini) i moguće je da povećana količina flavonola ima značajan utjecaj na povećanje antioksidacijske aktivnosti voća.

Korelacijom između sadržaja fenolnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti voća (DPPH, r=0.16; ABTS, r=0.13) (slika 36, tablica 15) pokazalo se da fenolne kiseline imaju nizak ili neznatan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća u usporedbi s antocijaninima i flavonolima. No, pošto fenolne kiseline u voću pripadaju grupama hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina, potražena je korelacija između tih dviju grupa fenolnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti voća. Pokazalo se da antioksidacijska aktivnost voća ovisi o sadržaju hidroksicimetnih kiselina tj. da se povećanjem sadržaja hidroksicimetnih kiselina u voću povećava i antioksidacijska aktivnost voća (DPPH, r=0.66*; ABTS, r=0.64*) (slika 37, tablica 15). To nije slučaj s ukupnim hidroksibenzojevim kiselinama jer je korelacija između sadržaja

hidroksibenzojevih kiselina i antioksidacijske aktivnosti voća pokazala da između tih varijabli postoji negativna korelacija (DPPH, r=-0.41; ABTS, r=-0.38) (tablica 15). Hidroksibenzojeve kiseline nisu toliko rasprostranjene u voću kao hidroksicimetne i pronađene su samo u 6 vrsta ispitivanog voća te je korelacija napravljena na osnovi tih 6 podataka. Ako ove kiseline imaju utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća, onda je taj utjecaj vjerojatno važan samo za pojedine vrste voća kao što su kupina, malina, jagoda i crveni ribiz koji sadrže nešto veće količine tih spojeva.

Flavanoli su pronađeni samo u pet vrsta voća u manjoj količini i, provedenom linearnom regresijom između sadržaja flavanola u tih pet vrsta voća i njihove antioksidacijske aktivnosti, pokazalo se da flavanoli mogu imati utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća (DPPH, r=0.62; ABTS, r=0.66) (slika 38) (tablica 15). No treba uzeti u obzir da flavanoli, isto kao i hidroksibenzojeve kiseline, nisu rasprostranjeni u voću kao hidroksicimetne kiseline ili flavonoli te su ovi spojevi vjerojatno značajniji za antioksidacijsku aktivnost pojedinog voća.

Postojanje korelacije između sadržaja pojedinih grupa polifenola i antioksidacijske aktivnosti pokazalo se i u nekim ranijim istraživanjima. U istraživanju antioksidacijske aktivnosti različitih sorti borovnica pronađena je linearna ovisnost između količine ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti (64). Korelacija između ukupnih flavonola i antioksidacijske aktivnosti bila je bolja nego korelacija između ukupnih hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti (64) što se slaže s rezultatima u ovom radu.

Antocijanini su po količini najbrojniji polifenoli ispitivanog voća i, kako se pokazalo u ovom radu, koreliraju bolje s antioksidacijskom aktivnošću od flavonola i hidroksicimetnih kiselina. No ispitivanjem antioksidacijske aktivnosti različitih polifenola u model otopinama (17) pokazalo se da su antocijanini zapravo slabiji antioksidansi nego flavonoli i hidroksicimetne kiseline. Postojanje najbolje korelacije između antocijanina i antioksidacijske aktivnosti voća koje je dobiveno u ovom radu, moguće je objasniti ako se uzme u obzir količina antocijanina u voću. Naime, antocijanini su u voću prisutni u daleko većoj količini u usporedbi s flavonolima i hidroksicimetnim kiselinama što objašnjava postojanje najbolje linearne ovisnosti između sadržaja antocijanina i antioksidacijske aktivnosti voća te najveći utjecaj antocijanina na antioksidacijsku aktivnost voća. Prema tome, antocijanine se može izdvojiti između drugih skupina polifenola voća, kao skupinu koja ima najznačajniji utjecaj na ukupnu antioksidacijsku aktivnost ispitivanog voća upravo zbog svoje visoke količine u voću.

Osim ovih ovisnosti između pojedinih grupa polifenola i antioksidacijske aktivnosti voća, promatrano je postojanje korelacije između količine pojedinih polifenolnih spojeva i

antioksidacijske aktivnosti voća. Cijanidin-3-glukozid je jedini antocijanin koji je identificiran u devet vrsta voća, no pokazalo se da je povezanost između sadržaja cijanidin-3-glukozida i antioksidacijske aktivnosti voća slaba ili neznatna (DPPH, r=0.28; ABTS, r=0.22) (tablica 15).

Suprotno tome, sadržaj kvercetina pokazuje značajnu povezanost s antioksidacijskom aktivnosti voća (DPPH, r=0.73*; ABTS, r=0.68*) (slika 39). Iako je kemferol prisutan u devet vrsta ispitivanog voća, njegova količina je daleko manja od količine kvercetina te ovaj flavonol ima tek neznatan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća što se pokazalo računanjem koeficijenta korelacije (DPPH, r=0.21; ABTS, r=0.25) (tablica 15). Miricetin je identificiran u četiri vrste voća i na osnovu ta četiri podatka dobiven je visok koeficijent korelacije (DPPH, r=0.99**; ABTS, r=0.98**) (tablica 15) koji pokazuje visoku povezanost s antioksidacijskom aktivnošću. No miricetin vjerojatno ima veći utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća u kojem je prisutan u značajnijim količinama kao što su borovnica i crni ribiz. U istraživanjima antioksidacijske aktivnosti model otopina flavonola, kvercetin je pokazao veću antioksidacijsku aktivnost od ostalih aglikona flavonola kao što su miricetin i kemferol (17,114,159). Za antioksidacijsku aktivnost kvercetina bitne su njegove strukturne osobine, prije svega prisutnost OH skupina na pozicijama 3' i 4' prstena B, OH skupina na poziciji 3 prstena C te dvostruka 2=3 veza zajedno s keto skupinom na poziciji 4. Ove strukturne osobine omogućuju kvercetinu visoku sposobnost hvatanja slobodnih radikala te stabilizaciju nastalog radikala kvercetina pomoću delokalizacije elektrona. Miricetin, isto tako, ima strukturne osobine bitne za visoku antioksidacijsku aktivnost, ali prisustvo OH skupine na poziciji 5' vjerojatno smanjuje antioksidacijsko djelovanje miricetina u odnosu na kvercetin. Kemferol ne posjeduje OH skupine na pozicijama 3' i 4' već samo na poziciji 4' što mu znatno smanjuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala u odnosu na kvercetin i miricetin. Uzimajući u obzir strukturne osobine te visoku antioksidacijsku aktivnost kvercetina u model otopini, moguće je postojanje linearne ovisnosti između kvercetina i antioksidacijske aktivnosti voća koje je pokazano u ovom radu te je moguće da kvercetin i njegovi derivati u voću utječu na povećanje antioksidacijske aktivnosti voća. Miricetin pokazuje nešto manju antioksidacijsku aktivnost od kvercetina, ali ipak je snažan antioksidans u model otopinama te je moguće da i on ima snažan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost pojedinog voća.

Antioksidacijska aktivnost voća u linearnoj je korelaciji s količinom kafeinske kiseline (DPPH, r=0.91***; ABTS, r=0.94***) (slika 40, tablica 15) te količinom *p*-kumarinske kiseline (DPPH, r=0.74*; ABTS, r=0.82*) (slika 41). Prema tome, moguće je da i ove hidroksicimetne kiseline pridonose povećanju antioksidacijske aktivnosti voća. Iako prema rezultatima regresijske analize povećanje sadržaja ferulične kiseline uzrokuje povećanje antioksidacijske

aktivnosti voća (DPPH, r=0.77; ABTS, r=0.71) (tablica 15) treba uzeti u obzir činjenicu da je ferulična kiselina identificirana samo u četiri vrste voća te je vjerojatno njen utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća slabiji nego utjecaj kafeinske i *p*-kumarinske kiseline.

Kafeinska i *p*-kumarinska kiselina također pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost u model otopinama (redosljedom kafeinska kiselina> *p*-kumarinska>vanilinska>i klorogenska kiselina (18)). Budući da ove kiseline pokazuju snažnu antioksidacijsku aktivnost u model otopinama, moguće je da imaju značajan utjecaj i na povećanje antioksidacijske aktivnosti voća. Korelacijski koeficijent bio je veći za ovisnost antioksidacijske aktivnosti o sadržaju kafeinske kiseline voća nego za ovisnost o sadržaju *p*-kumarinske kiseline. Kafeinska kiselina je bolji antioksidans i u model otopinama od *p*-kumarinske kiseline (18) te je stoga logično postojanje bolje korelacije između kafeinske kiseline i antioksidacijske aktivnosti voća. Za antioksidacijsku aktivnost kafeinske i *p*-kumarinske kiseline važno je prisustvo CH=CH-COOH skupine, a dodatna OH skupina u molekuli kafeinske kiseline vjerojatno ima utjecaj na veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala u odnosu na *p*-kumarinsku kiselinu.

Iako elaginska ksielina pokazuje snažnu antioksidacijsku aktivnost u model otopinama, čak i jaču od kvercetina (6,114) korelacija između sadržaja elaginske kiseline i antioksidacijske aktivnosti voća je slaba i negativna (DPPH, r= -0.53; ABTS, r= -0.49). Prema ovim rezultatima, povećana količina elaginske kiseline ne povećava antioksidacijsku aktivnost voća. No i ova kiselina je pronađena u malom broju uzoraka (n=5) te je moguće da elaginska kiselina ima utjecaja na antioksidacijsku aktivnost pojedinog voća kao što su kupine i jagode.

Sadržaj flavanola (+)-katehina u ispitivanom voću je nizak te je i za očekivati da ovaj polifenol nema velikog utjecaja na antioksidacijsku aktivnost voća. To se pokazalo i nepostojanjem korelacije između sadržaja (+)-katehina i antioksidacijske aktivnosti voća (DPPH, r= -0.02; ABTS, r= -0.06) (tablica 15). Suprotno tome, sadržaj (-)-epikatehina pokazuje pozitivnu i visoku povezanost s antioksidacijskom aktivnošću voća (DPPH, r= -0.99*; ABTS, r= 0.99*) no treba uzeti u obzir da je (-)-epikatehin identificiran u malom broju uzoraka (n=3) koji možda nije dovoljan da bi se sa sigurnošću moglo utvrditi koliki je utjecaj ovog flavanola na antioksidacijsku aktivnost voća. Za antioksidacijsku aktivnost flavanola (+)-katehina i (-)-epikatehina važno je prisustvo OH skupina na prstenu B te OH skupine na poziciji 3 prstena C (17). Osim ovih strukturnih osobina, flavanoli ne posjeduju ostale strukturne osobine koje su bitne za hvatanje slobodnih radikala, a koje su prisutne na npr. flavonolima te flavanoli pokazuju manju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, a i u ovom radu se pokazalo da slabije doprinose antioksidacijskoj aktivnosti u usporedbi s flavonolima.

Iz rezultata ovog rada može se zaključiti da na antioksidacijsku aktivnost ispitivanog voća najveći utjecaj imaju oni polifenoli koji su u tom voću najrasprostranjeniji i koji su prisutni u visokim količinama, a to su antocijanini, derivati cijanidina, flavonoli, hidroksicimetne kiseline te kvercetin, kafeinska i *p*-kumarinska kiselina kao pojedinačni polifenoli.

5.5.1. Voće s najvećom antioksidacijskom aktivnošću i najvećom količinom polifenola

Između ispitivanih vrsta voća potrebno je izdvojiti aroniju jer ovo voće pokazuje daleko najveću antioksidacijsku aktivnost, a sadrži i najveće količine ukupnih polifenola. No količina pojedinačnih grupa polifenola (antocijanina, flavonola i fenolnih kiselina) nije najveća u aroniji. Antocijanini, flavonoli i fenolne kiseline pridonose visokoj antioksidacijskoj aktivnosti aronije, ali u aroniji se vjerojatno nalaze i drugi spojevi koji nisu analizirani u ovom radu kao što su proantocijanidini te vitamin C (3,4), a koji pokazuju vrlo snažnu antioksidacijsku aktivnost u model otopinama (17) te vjerojatno u određenoj mjeri pridonose visokoj ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti aronije. Moguća su i sinergistička djelovanja nekih spojeva (104) koja mogu povećati antioksidacijsku aktivnost ove vrste voća. S druge strane u borovnici su pronađene najveće količine antocijanina, flavonola, flavanola i fenolnih kiselina, a ipak je antioksidacijska aktivnost ovog voća nešto niža od antioksidacijske aktivnosti aronije. Po visokom sadržaju antocijanina, flavonola i fenolnih kiselina mogu se izdvojiti i plodovi bazge i crni ribiz. Ovo voće ima isto tako visoku antioksidacijsku aktivnost, ali ipak znatno nižu od aronije. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da polifenolni spojevi pridonose značajnim udjelom ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti voća, ali za ukupnu antioksidacijsku aktivnost voća bitni su i neki drugi antioksidansi te njihovo međudjelovanje i utjecaj okoline te su potrebna daljnja istraživanja polifenolnih spojeva u voću i njihovog utjecaja na ukupnu antioksidacijsku aktivnost voća.

6. ZAKLJUČCI

- U ovom radu provedena je karakterizacija bioaktivnih polifenolnih spojeva [antocijanina, flavonola (kvercetin, miricetin i kemferol), flavanola ((+)-katehin, (-)-epikatehin)), hidroksibenzojevih (*p*-hidroksibenzojeva, elaginska) i hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinska, kafeinska, ferulična)] prisutnih u deset vrsta tamno obojenog voća (borovnici, bobicama bazge, kupini, malini, višnji, trešnji, crnom i crvenom ribizlu, jagodi i aroniji) koje pripada u četiri porodice; *Saxifragaceae*, *Rosaceae*, *Ericaceae* i *Caprifoliaceae*. Svih deset vrsta voća značajno se razlikuje po sadržaju i vrsti polifenola, a između njih se po sadržaju polifenola posebno ističu četiri vrste voća, aronija, borovnica, crni ribiz i bobice bazge.
- Antocijanini su najvažnija podskupina polifenola ispitivanog voća jer su u voću pronađeni u vrlo visokim ili visokim količinama. Posebno se količinom ukupnih antocijanina ističu borovnica, aronija, bazga i crni ribiz. Između 23 identificirana antocijanina najzastupljeniji su derivati cijanidina jer su pronađeni u svim vrstama ispitivanog voća, a među njima najrasprostranjeniji je cijanidin-3-glukozid. U kupini, aroniji, višnji, bobicama bazge i crvenom ribizu pronađeni su samo derivati cijanidina. Derivati delfinidina identificirani su u borovnici i crnom ribizlu, pelargonidin je karakterističan za jagodu, a borovnica se ističe najraznolikijim sastavom antocijanina jer su u njoj pronađeni derivati cijanidina, delfinidina, petunidina, peonidina i malvidina.
- Sadržaj flavonola, flavanola i fenolnih kiselina je u ispitivanom voću manji u usporedbi s količinom antocijanina.
- Flavonolima su najbogatiji borovnica, bazga, aronija i crni ribiz. Kvercetin je najrasprostranjeniji flavonol jer se pojavljuje u svim ispitivanim vrstama voća u relativno visokim koncentracijama, a najveće količine kvercetina pronađene su u bazgi, borovnici, aroniji i kupini. Miricetin je karakterističan za crni ribiz i borovnicu. Kemferol je, isto kao i kvercetin, rasprostranjen u ispitivanom voću jer se nalazi u gotovo svim vrstama voća, ali je sadržaj kemferola u voću znatno manji u usporedbi s kvercetinom.
- Fenolne kiseline identificirane su u nešto većoj količini u kupini, borovnici i crnom ribizu. Hidroksicimetne kiseline, posebice kafeinska i *p*-kumarinska, identificirane su u gotovo svim vrstama ispitivanog voća i rasprostranjenije su od hidroksibenzojevih kiselina (elaginska i *p*-hidroksibenzojeva) koje su karakteristične za pojedine vrste voća. Elaginska kiselina karakteristična je za kupinu koja je zbog količine ove kiseline najbogatija ukupnim fenolnim kiselinama, te za jagodu i malinu. *p*-hidroksibenzojeva kiselina karakteristična je za crveni ribiz i malinu.
- Flavanoli su pronađeni samo u borovnici, jagodi, crvenom ribizu, crvenom ribizu i kupini.

- Istraživanja su pokazala da se neke vrste voća ističu količinom pojedinih polifenolnih spojeva, za koje je i ranijim istraživanjima pokazano da imaju znatno biološko djelovanje. Bobice bazge, borovnica i aronija ističu se visokom količinom kvercetina, aronija i visokom količinom kafeinske kiseline, a kupine, jagode i maline relativno visokim sadržajem elaginske kiseline.

- Svi ispitivani uzorci voća pokazuju određenu antioksidacijsku aktivnost
- Najveću ukupnu antioksidacijsku aktivnost posjeduju aronija, borovnica, crni ribiz i bobice bazge tj. voće koje sadrži najviše ukupnih polifenolnih spojeva. Antioksidacijska aktivnost ostalog voća znatno je slabija.
- Provedenom linearnom regresijom između količine polifenolnih spojeva (ukupnih ili pojedinačnih) i antioksidacijske aktivnosti pokazalo se da polifenoli voća imaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća, ali da je taj utjecaj različit za različite skupine polifenola ili pojedinačne polifenolne spojeve.
- Ukupna antioksidacijska aktivnost voća linearno ovisi o količini ukupnih antocijanina te se povećanjem sadržaja tih polifenola u voću povećava antioksidacijska aktivnost voća. Od različitih antocijanina koji su pronađeni u ispitivanom voću, po količini su najznačajniji derivati cijanidina, a provedenom linearnom regresijom utvrđeno je da upravo ovi antocijanini imaju utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. Ostali antocijanini vjerojatno su značajniji za antioksidacijsku aktivnost pojedinog voća.
- Ukupna antioksidacijska aktivnost voća linearno ovisi o količini ukupnih flavonola. S obzirom na utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća, između pojedinačnih flavonola mogu se izdvojiti derivati kvercetina i miricetina. Oni su snažni antioksidansi u model otopinama, a i u ovom radu pokazalo se da njihova povećana količina povećava antioksidacijsku aktivnost voća. No značajniji za ukupnu antioksidacijsku aktivnost voća svakako su derivati kvercetina jer su rasprostranjeniji u ispitivanom voću od derivata miricetina.
- Povećanje količine ukupnih hidroksicimetnih kiselina u voću uzrokuje povećanje antioksidacijske aktivnosti voća. Antioksidacijska aktivnost linearno ovisi i o količini pojedinačnih hidroksicimetnih kiselina; *p*-kumarinskoj i kafeinskoj kiselini. Suprotno hidroksicimetnim kiselinama, hidroksibenzojeve kiseline nisu rasprostranjene u ispitivanom voću i nemaju značajnog utjecaja na povećanje antioksidacijske aktivnosti voća.
- Iako je sadržaj flavanola u ispitivanom voću nizak, njihova povećana količina uzrokuje povećanje antioksidacijske aktivnosti voća. Sličan utjecaj pokazao je i flavanol (-)-epikatehin koji također ima utjecaj na povećanje antioksidacijske aktivnosti voća. Kod ovih polifenolnih

spojeva treba uzeti u obzir činjenicu da su oni identificirani u malom broju uzoraka te da je njihov utjecaj vjerojatno važniji za antioksidacijsku aktivnost pojedinog voća.

- Na temelju ovog rada može se zaključiti da polifenolni spojevi imaju vrlo značajnu ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti voća. Kao dominantni polifenolni spojevi, i po količini i po utjecaju na antioksidacijsku aktivnost, mogu se izdvojiti antocijanini. Također se pokazalo da su za antioksidacijsku aktivnost voća bitne i ostale, manje zastupljene skupine polifenola kao što su flavonoli i hidroksicimetne kiseline. Od pojedinačnih polifenola se mogu izdvojiti kafeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kvercetin i derivati cijanidina, koji su snažni antioksidansi i imaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. Rezultati ovog istraživanja daljnji su korak prema boljem razumijevanju i objašnjenju antioksidacijske aktivnosti voća koja je vrlo blisko povezana s pozitivnim djelovanjem voća u ljudskom organizmu.

7. **LITERATURA**

1. C. Kaur, H.C. Kapoor,: Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. ***Int J Food Sci Technol***, 36, 703-725, 2001.
2. R.A. Moyer, K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei, R.E. Wrolstad,: Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium, Rubus*, and *Ribes*. ***J Agric Food Chem,*** 50, 519-525, 2002
3. S. Benvenuti, F. Pellati, M. Melegari, D. Bertelli,: Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus, Ribes*, and *Aronia*. ***J Food Sci,*** 69, 164-169, 2004.
4. K.R Määttä-Riihinen, A. Kamal-Eldin, P.H. Mattila, A.M. González-Paramás, A.R. Törrönen,: Distribution and content of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. ***J Agric Food Chem,*** 52, 4477-4486, 2004.
5. M.P. Kähkönen, A.I. Hopia, M. Heinonen,: Berry phenolics and their antioxidant activity. ***J Agric Food Chem***, 49, 4076-4082, 2001.
6. K.R. Määttä, A. Kamal-Eldin, A.R. Törrönen,: High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: *Ribes* species. ***J Agric Food Chem***, 51, 6736-6744, 2003.
7. X. Wu, R.L. Prior,: Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. ***J Agric Food Chem***, 53, 2589-2599, 2005.
8. R. Zadernowski, M. Naczk, J. Nesterowicz,: Phenolic acid profiles in some small berries. ***J Agric Food Chem***, 53, 2118-2124, 2005.
9. S. Häkkinen, M. Heinonen, S. Kärenlampi, H. Mykkänen, J. Ruuskanen, R. Törrönen,: Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. ***Food Res Int*****,** 32, 345-353, 1999a.
10. K.R. Määttä-Riihinen, A. Kamal-Eldin, A.R. Törrönen,: Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). ***J Agric Food Chem,*** 52, 6178-6187, 2004b.
11. K.J. Joshipura, F.B. Hu, J.E. Manson, M.J. Stampfer, E.B. Rimm, F.E. Speizer, G. Colditz, A. Ascheiro, B. Rosner, D. Spiegelman, W.C. Willett,: The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. ***Ann Intern Med***, 134, 1106-1114, 2001.
12. R. Garcia-Closas, C.A. Gonzalez, A. Agudo, E. Riboli,: Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. ***Canc causes contr***, 10, 71-75, 1999.

13. P. Knekt, R. Järvinen, R. Seppänen, M. Heliövaara, L. Teppo, E. Pukkala. A. Aromaa,: Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. ***Am J Epidemiol***, 146, 223-230, 1997.
14. T.F. Burns Kraft, B.M. Schmidt, G.G. Yousef, C.T.G. Knight, M. Cuendet, YH. Kang, J.M. Pezzuto, D.S. Seigler, M.A. Lila,: Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. ***J Food Sci***, 70, 159-166, 2005.
15. S. Hope Smith, P.L. Tate, G. Huang, J.B. Magee, K.M. Meepagala, D.E. Wedge, L.L. Larcom,: Antimutagenic activity of berry extracts. ***J Med Food***, 7, 450-455, 2004.
16. A. Bub, B. Watzl, M. Blockhaus, K. Briviba, U. Liegibel, H. Müller, B.L. Pool-Zobel, G. Rechkemmer,: Fruit juice consumption modulates antioxidant status, immune status and DNA damage. ***J Nutr Biochem***, 14, 90-98, 2003.
17. M.A. Soobratte, V.S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma, T. Bahorum,: Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. ***Mutation Research***, 579, 200-213, 2005.
18. W. Zheng, Y. Wang,: Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. ***J Agric Food Chem***, 51, 502-509, 2003.
19. M.P. Kähkönen, J. Heinämäki, V. Ollilainen, M. Heinonen,: Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. ***J Sci Food Agric,*** 83, 1403-1411, 2003.
20. K. Robards, M. Antolovich,: Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. ***Analyst***, 122, 11R-34R, 1997.
21. A.E.Rotelli, T. Guardia, A.O. Juárez, N.E. de la Rocha, L.E. Pelzer,: Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. ***Pharmacol Res,*** 48, 601-606, 2003.
22. M.D. dos Santos, M.C. Almeida, N.P. Lopes, G.E.P. de Souza,: Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. ***Biol Pharm Bul,***. 29, 2236-2240, 2006.
23. M. Mamani-Matsuda, T. Kauss, A. AL-Kharrat, J. Rambert, F. Fawaz, D. Thiolat, D. Moynet, S. Caves, D. Malvy, MD. Mossalayi. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decrease macrophage inflammatory mediators. ***Biochem Pharmacol***, 72, 1304-1310, 2006.
24. K. Gąsiorowski, K. Szyba, B. Brokos, B. Kolaczyńska, M. Jankowiak-Wlodarczyk, J. Oszmiański,: Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. ***Cancer Lett***, 119, 37-46, 1997.

25. PN. Chen, SC. Chu, HL. Chiou, WH. Kuo, CL Chiang, YS. Hsieh,: Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. ***Cancer Lett***, 235, 248-259, 2006.
26. H. Shi, N. Noguchi, E. Niki: Introducing natural antioxidants. U Antioxidants in food. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (ur.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 147-158, 2001.
27. I.S. Young, J.V. Woodside,: Antioxidants in health and disease. ***J Clin Pathol***. 54, 176-186, 2001.
28. M. Netzel, G. Strass, M. Herbst, H. Dietrich, R. Bitsch, T. Frank,: The excretion and biological antioxidant activity of elderberry antioxidants in healthy humans. ***Food Res. Int***. **38**, 905-910 (2005).
29. U. Mülleder, M. Murkovic, W. Pfannhauser,: Urinary excretion of cyanidin glycosides. ***J Biochem Biophys Methods***, 53, 61-66, 2002.
30. T. Miyazawa, K. Nakagawa, M. Kudo, K. Muraishi, K. Someya,: Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. ***J Agric Food Chem***, 47, 1093-1091, 1999.
31. P.E. Milbury, G. Cao, R.L. Prior, J. Blumberg,: Bioavailability of elderberry anthocyanins. ***Mech Ageing Dev***, 123, 997-1006, 2002.
32. P.C.H. Hollman, I.C.W. Arts,: Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. ***J Sci Food Agric***, 80, 1081-1093, 2000.
33. P.C. Hollman, J.H. de Vries, S.D. van Leeuwen, M.J. Mengelers, M.B. Katan,: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. ***Am J Clin Nutr***, 62, 1276-1282, 1995.
34. JP. Suomela, M. Ahotupa, B. Yang, T. Vasankari, H. Kallio,: Absorption of flavonols derived from Sea Buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. ***J Agric Food Chem***, 54, 7364-7369, 2006.
35. W. Mullen, B.A. Graf, S.T. Caldwell, R.C. Hartley, G.G. Duthie, C.A. Edwards, M.E.J. Lean, A. Crozier,: Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-^{14}C]quercetin-4'-glucoside. ***J Agric Food Chem***, 50, 6902-6909, 2002.
36. A.J. Day, J.M. Gee, M.S. DuPont, I.T. Johnson, G. Williamson,: Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of

lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. ***Biochem Pharmacol***, 65, 1199-1206, 2003.

37. F. Lei, DM. Xing, L. Xiang, YN. Zhao, W. Wang, LJ. Zhang, LJ. Du,: Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. ***J Chromatogr B***, 796, 189-194, 2003.
38. M.P. Germanò, V. D'Angelo, T. Biasini, R. Sanogo, R. De Pasquale, S. Catania,: Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. ***J Ethnopharmacol***, 105, 368-373, 2006.
39. S. Lafay, A. Gil-Izquierdo, C. Manach, C. Morand, C. Besson, A. Scalbert,: Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. ***J Nutr***, 136, 1192-1197, 2006.
40. E.M. González, B. de Ancos, M. Pilar Cano,: Relation between bioactive compounds and free radical-scavenging capacity in berry fruits during frozen storage. ***J Sci Food Agric***, 83, 722-726, 2003.
41. R.L. Prior, G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, C. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer, C.M. Mainland,: Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and antocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. ***J Agric Food Chem,*** 46, 2686-2693, 1998.
42. I.M. Heinonen, A.S. Meyer, E.N. Frankel,: Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. ***J Agric Food Chem***, 46, 4107-4112, 1998.
43. M.P. Kähkönen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, JP. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen,: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. ***J Agric Food Chem***. 47, 3954-3962, 1999.
44. P. Mattila, J. Hellström, R. Törrönen,: Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. ***J Agric Food Chem,*** 54, 7193-7199, 2006.
45. S. Sellappan, C.C. Akoh, G. Krewer,: Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. ***J Agric Food Chem,*** 50, 2432-2438, 2002.
46. J.M.Koponen, A.M. Happonen, P.H. Mattila, A.R. Törrönen,: Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. ***J Agric Food Chem***, 55, 1612-1619, 2007.
47. X. Wu, G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt, R.L. Prior,: Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. ***J Agric Food Chem***, 54, 4069-4075, 2006.

48. J. Wollgast, E. Anklam,: Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. ***Food Res Int***, 33, 423-447, 2000.
49. K. Robards, P.D. Prenzel, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover,: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. ***Food Chem***, 66, 401-436, 1999.
50. S.A. Aherne, N.M. O'Brien,: Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. ***Nutrition***, 18, 75-81, 2002.
51. S. Lajšić, B. Grujić-Injac: *Hemija prirodnih spojeva*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1998.
52. M.N. Clifford,: Anthocyanins-nature occurence and dietary burden. ***J Sci Food Agric***, 80, 1063-1072, 2000.
53. C.T. da Costa, B.C. Nelson, S.A. Margolis, D. Horton,: Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. ***J Chromatogr A***, 799, 321-327, 1998.
54. S. Häkkinen: Flavonols and phenolic acids in berries and berry products: *Doktorski rad*. Kuopio University, Finland, 2000.
55. F.A. Tomás-Barberán, M.N. Clifford,: Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. ***J Sci Food Agric***. 80, 1024-1032, 2000.
56. P.A. Kroon, G. Williamson,: Hydroxycinnamates in plants and food:current and future perspectives. ***J Sci Food Agric***. 79, 355-361, 1999.
57. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez,: Polyphenols: food source and bioavailability. ***Am J Clin Nutr***, 79, 727-747, 2004.
58. V. Dragović-Uzelac, K. Delonga, B. Levaj, S. Djakovic, J. Pospisil,: Phenolic profiles of raw apricot in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity. ***J Agric Food Chem***, 53, 4836-4842, 2005.
59. M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, D. Ryan,: Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, 125, 989-1009, 2000.
60. M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman, D.P. Venema,: Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. ***J Agric Food Chem***, 40, 1591-1598, 1992.
61. S.H. Häkkinen, S.O. Kärenlampi, I.M. Heinonen, H.M. Mykkänen, A.R. Törrönen,: HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. ***J Sci Food Agric***, 77, 543-551, 1998.
62. B. Mozetič, P. Trebše, J. Hribar,: Determination and quantitation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica region (Slovenia). ***Food Technol Biotechnol***, 40, 207-212, 2002.

63. M. Stefanova, T. Stafilov, S. Kulevanova,: HPLC analysis of flavonoids. U Encyclopedia of Chromatography. J. Cazes (ur.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2005.
64. L.R. Howard, J.R. Clark, C. Brownmiller,: Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. ***J Sci Food Agric***, 83, 1238-1247, 2003.
65. M.M. Giusti, R.E. Wrolstad. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. U Current protocols in food analytical chemistry, R.E. Wrolstad (ur), Wiley, New York, F1.2.1.-F1.2.13., 2001.
66. A.Soriano, P.M. Perez-Juan, A. Vicario, J.M. Gonzalez, M.S. Perez-Coello,: Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. ***Food Chem***, 104, 1295-1303, 2007.
67. F. Cuyckens, M. Claeys,: Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. ***J Mass Spectrom***. 39, 1-15, 2004.
68. J. Berregi, J.I. Santos, G. del Campo, J.I. Miranda,: Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by ^{1}H NMR. ***Talanta***, 61, 139-145, 2003.
69. J.J. Košir, J. Kidrič,: Use of a modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. ***Anal Chim Acta***, 458, 77-84, 2002.
70. J. Sadecka, J. Polonsky,: Electrophoretic methods in the analysis of beverages. ***J Chromatogr A***, 880, 243-279, 2000.
71. C. T. da Costa, D. Horton, S.A. MArgolis,: Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography.mass spectrometry and capillary electrophoresis. ***J Chromatogr A***, 881, 403-410, 2000.
72. P. Bridle, C. Garcia-Viguera,: Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. ***Food Chem***, 59, 299-304, 1997.
73. W.R. Sousa, C. da Rocha, C.L. Cardoso, D. H. S. Silva, M. V. B. Zanoni,: Determination and relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. ***J Food Compos Anal***, 17, 619-633, 2004.
74. M. dos Santos Raymundo, M.M. da Silva Paula, C. Franco, R. Fett,: Quantitative determination of the phenolic actioxidants using voltammetric techniques. ***LWT***, 40, 1133-1139, 2007.
75. J.A. Garcia-Mesa, R. Mateos,: DIrect automatic determination of bitterness and total phenolic compounds in virgin olive oil using pH-based flow-injection analysis system. ***J Agric Food Chem***, 55, 3863-3868, 2007.

76. H.M. Merken, G. R. Beecher,: Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. ***J Agric Food Chem***. 48, 577-599, 2000.
77. R. J. Robbins,: Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. ***J Agric Food Chem***. 51, 2866-2887, 2003.
78. D.A. Skoog, D.M. West, F.M. Holler,: Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
79. X. Wu, L. Gu, R.L. Prior, S. McKay,: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes, Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. ***J Agric Food Chem***, 52, 7846-7856, 2004.
80. D.O. Kim, H.J. Heo, Y.J. Kim, H.S. Yang, C.Y. Lee,: Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. ***J Agric Food Chem***, 53, 9921-9927, 2005.
81. B.L. Halvorsen, K. Holte, M.C.W. Myhrstad, I. Barikmo, E. Hvattum, S.F. Remberg, A. Wold, K. Haffner, H. Baugerød, L.F. Andersen, J.Ø. Moskaug, D.R. Jacobs, R. Blomhoff,: A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. ***The Journal of Nutrition*** 132, 461-471, 2002.
82. N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D, Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti,: Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. ***J Nutr***. 133, 2812-2819, 2003.
83. H. Wang, G. Cao, R.L. Prior,: Total antioxidant capacity of fruits. ***J Agric Food Chem***, 44, 701-705, 1996.
84. J Oszmiański, A. Wojdylo,: Aronia melanocarpa and their antioxidant activity. ***Eur Food Res Technol***, 221, 809-813, 2005.
85. T. Bačić, M. Sabo,: Filogenetska sistematika stablašica (Embriophyta-Cormophyta). Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta J.J, Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2006
86. I. Krpina,: Voćarstvo, Globus, Zagreb, 2004.
87. http://www.zzjzpgz.hr/nzl/21/voce.htm (travanj, 2007)
88. www.thefruitbook.com/fruits/index.html (travanj, 2007)
89. http://www.vinogradarstvo.com/index.php?s=736 (travanj, 2007)
90. I. Miljković,: Suvremeno voćarstvo, Znanje, Zagreb, 1991.
91. http://www.pyrus-mm.hr/podlinkovi_priroda/bazga.htm (travanj, 2007)
92. I.M Heinonen: Antioxidants in fruits, berries and vegetables. U Fruit and vegetable processing. W. Jongen (ur.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 23-51, 2002.
93. H.J. Fan-Chiang, R.E. Wrolstad,: Anthocyanin pigment composition of blackberries. ***J Food Sci***, 70, C198-C202, 2005.

94. M.J. Cho, L.R. Howard, R.L. Prior, J.R. Clark,: Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. ***J Sci Food Agric***, 84, 1771-1782, 2004.

95. K. Skupień, J. Oszmiański,: Comparison of six cultivars of strawberries (Fragaria x ananassa Duch.) grown in northwest Poland. ***Eur Food Res Techn***, 219, 66-70, 2004.

96. B. De Ancos, E. Gonzalez, M.P. Cano,: Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A,** 208, 33-38, 1999.

97. T.G. Taruscio, D.L.Barney, J. Exon,: Content and profile of flavonoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. ***J Agric Food Chem***, 52, 3169-3176, 2004.

98. F. Blando, C. Gerardi, I. Nicoletti,: Sour cherry (*Prunus cerasus* L) anthocyanins as ingridients for functional foods. ***J Biomed Biotech*** 5, 253-258, 2004.

99. L. Gao, G. Mazza,: Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. ***J Agric Food Chem***. 43, 343-346, 1995.

100. R. Slimestad, K. Torskangerpoll, H.S. Nateland, T. Johannessen, N.H. Giske,: Flavonoids from black chokeberries, Aronia melanocarpa. ***J Food Compos Anal***. 18, 61-68, 2005.

101. A. Bilyk, G.M. Sapers,: Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. ***J Agric Food Chem***, 34, 585-588, 1986.

102. S.H. Häkkinen, S.O. Kärenlampi, I.M. Heinonen, H.M. Mykkänen, A.R. Törrönen,: Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. ***J Agric Food Chem***, 47, 2274-2279 1999b.

103. M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman, M.B. Katan,: Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. ***J Agric Food Chem***, 40, 2379-2383, 1992a.

104. M.. Kosar, E. Kafkas, S. Paydas, K.H.C. Baser,: Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. ***J Agric Food Chem***, 52, 1586-1589, 2004.

105. A.S. Meyer, K.I. Suhr, P. Nielsen: Natural food preservatives. U Minimal processing technologies in the food industry. T. Ohlsson, N. Bengtsson (ur.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 124-173, 2002.

106. M. Murakami, T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba,: Effects of ascorbic acid and α-tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. ***J Food Sci***, 68, 1622-1625, 2003.

107. M. Rein: Copigment reactions and color stability of berry anthocyanins: *Doktorski rad*. University of Helsinki, Finland, 2005.

108. R. Yawadio, N. Morita,: Color enhancing effect of carboxylic acids on anthocyanins. ***Food Chem***, 105, 421-427, 2007.

109. P.M. Abuja, M. Murkovic, W. Pfannhauser,: Antioxidant and prooxidant activites of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. ***J Agric Food Chem***, 46, 4091-4096, 1998.

110. http://www.zzjzpgz.hr/nzl/35/hrana.htm (travanj, 2007)

111. C. Jullian, L. Moyaro, C. Yanez, C. Olea-Azar,: Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins:An antioxidant study. ***Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, 67, 230-234, 2007.

112. R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich,: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. ***J Agric Food Chem,*** 53, 4290-4302, 2005.

113. W. Brand Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset,: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. ***Lebensm-Wiss U Technol***, 28, 25-30, 1995.

114. D. Iveković, S. Milardović, M. Roboz, B.S. Grabarić,: Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. ***Analyst***, 130, 708-714 2005.

115. M. Bermudez-Soto, F.A. Tomás-Barberán,: Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. ***Eur Food Res Technol,*** 219, 133-141, 2004.

116. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga,: Antioxidant properties of phenolic compounds. ***Trends Plant Sci***, 2, 152-159, 1997.

117. M.P. Kähkönen, M. Heinonen,: Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. ***J Agric Food Chem***, 51, 628-633, 2003.

118. T. Lapidot, S. Harel, B. Akiri, R. Granit, J. Kanner,: pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. ***J Agric Food Chem***, 47, 67-70, 1999.

119. S.S. Pekkarinen, I.M. Heinonen, A.I. Hopia,: Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. ***J Sci Food Agric***, 79, 499-506, 1999.

120. A. Chaovanalikit, R.E. Wrolstad,: Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. ***J Food Sci***, 69, 67-72, 2004.

121. M. García-Alonso, S. de Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, J. C. Rivas-Gonzalo,: Evaluation of the antioxidant properties of fruits. ***Food Chem***, 84, 13-18, 2004.

122. J. Nakajima, I. Tanaka, S. Seo, M. Yamazaki, K. Saito,: LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. ***J Biomed Biotech***, 5, 241-247, 2004.

123. S.Y. Wang, H. Jiao,: Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. ***J Agric Food Chem***, 48, 5677-5684, 2000.

124. S.Y. Wang, HS. Lin,: Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage. ***J Agric Food Chem***, 48, 140-146, 2000.

125. J. Beattie, A. Crozier, G.G. Duthie,: Potential health benefits of berries. ***Curr Nutr Food Sci***, 1, 71-86, 2005.

126. H. Matsumoto, H. Inaba, M. Kishi, S. Tominaga, M. Hirayama, T. Tsuda,: Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. ***J Agric Food Chem***, 49, 1546-1551, 2001.

127. M. Netzel, G. Strass, C. Kaul, I. Bitsch, H. Dietrich, R. Bitsch,: In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. ***Food Res Int,*** 35, 213-216, 2002.

128. M.C. Walton, T.K. McGhie, G.W. Reynolds, W.H. Hendriks,: The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption in vitro. ***J.Agric Food Chem***, 54, 4913-4920, 2006.

129. M.G. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, S. Nedeljković, A. Menoti et al,: Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. ***Arch Intern Med***, 155, 381-386, 1995.

130. P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Järvinen., H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, A. Aromaa,: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am J Clin Nutr**, 76, 560-568, 2002.

131. L.Yochum, L.H. Kushi, K. Mayer, A.R. Folsom,: Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. ***Am J Epidemiol***, 149, 943-949, 1999.

132. L. Le Marchand, S.P. Murphy, J.H. Hankin, L.R. Wilkens, L.N. Kolonel,: Intake of flavonoids and lung cancer. ***J Natl Cancer Inst***, 92, 154-160, 2000.

133. JP. Rauha, S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kähkönen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, P. Vuorela,: Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. ***Int J Food Microbiol***, 56, 3-12,2000.

134. R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, S. Hartmann-Schmidlin, M. Kähkönen, M. Heinonen, K. Määttä-Riihinen, K.M. Oksman-Caldentey,: Berry phenolics selectively inhibit growth of intestinal pathogens. ***J Appl Microbiol***, 98, 991-1000, 2005.

135. R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen, A. Hopia, K.M. Oksman-Caldentey,: Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. ***J Appl Microbiol***, 90, 494-507, 2001.

136. P. Tate, A. Kuzmar, S.W. Smith, D.E. Wedge, L.L. Lacrom,: Comparative effect of eight varieties of blackberry on mutagenesis. ***Nutrition Research***, 23, 971-979, 2003.

137. K.A. Youdim, A. Martin, J.A. Joseph,: Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. ***Free Radic Biol Med***, 29, 51-60, 2000.

138. A. Waterhouse, http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/folinmicro.htm (travanj, 2007)

139. G.E. Pantelidis, M. Vasilakakis, G.A. MAnganaris, G.R. Diamantidis,: Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. ***Food Chem***. 102, 777-783, 2007.

140. M.K. Ehlenfeldt, R.L. Prior,: Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. **J Agric Food Chem**, 49, 2222-2227, 2001.

141. L. Wada, B. Ou,: Antioxidant activity and phenolic content of Oregon canberries, ***J Agric Food Chem***, 50, 3495-3500, 2002.

142. A. Chandra, J. Rana, Y. Li,: Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. ***J Agric Food Chem***, 49, 3515-3521, 2001.

143. D.N. Cooke, S. Thomasset, D.J. Boocock, M. Schwarz, P. WInterhalter, W.P. Steward, A.J. Gescher, T.H. Marczylo,: Development of analysis by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry of bilberry (*Vaccinium myrtilus*) anthocyanins in human plasma and urine. ***J Agric Food Chem***, 54,7009-7013,2006.

144. M.J. Bermúdez-Soto, FA Tomás-BArberán, MT Garcia-Conesa,: Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. ***Food Chem***, 102, 865-874, 2007.

145. M.I. Gill, D.M. Holcroft, A.A. Kader,: Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. ***J Agric Food Chem,*** 45, 1662-1667, 1997.

146. F. Lopes-da-Silva, S. Pascual-Teresa, J. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga,: Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. ***Eur Food Res Technol***, 214, 248-253, 2002.

147. N.P Seeram, R. Lee, H.S: Scheuller, D, Heber,: Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. ***Food Chem***, 97, 1-11, 2006.

148. J. Goiffon, P.P. Mouly, E.M. Gaydou,: Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. ***Anal Chim Acta,*** 382, 39-50, 1999.

149. W. Mullen, M.E.J. Lean, A. Crozier,: Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadropole mass spectrometry. ***J Chromatogr A***, 966, 63-70, 2002.

150. B. Mozetič, P. Trebše,: Identification of sweet cherry anthocyanins and hydroxycinnamic acids using HPLC coupled with DAD and MS detector. ***Acta Chim Slov***, 51, 151-158, 2004.

151. B. Mozetič, M. Simčić, P. Trebše,: Anthocyanins and hydroxycinnamic acids of LAmbert compact cherries (*Prunus avium* L) after cold storage and 1-methylcycopropene treatment. ***Food Chem***, 97, 302-309, 2006.

152. F. Blando, A.P. Scardino, L. De Bellis, I. Nicoletti G. Giovinazzo,: Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour chery (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. ***Food Res Int***, 38**,** 937-942, 2005.

153. M. Jordheim, N.H. Giske, Ø.M. Andersen,: Anthocyanins in Caprifoliaceae. ***Biochem Sys Eco***, 35, 153-159, 2007.

154. R. Slimestad, H. Solheim,: Anthocyanins from black currant (*Ribes nigrum* L.). ***J Agric Food Chem,*** 50, 3228-3231, 2002.

155. H. Matsumoto, S. Hanamura, T. Kawakami, Y. Sato, M. Hirayama,: Preparative-scale isolation of four anthocyanin components of black currant (Ribes nigrum L.) fruits. ***J Agric Food Chem***, 49, 1541-1545, 2001.

156. M.J. Anttonen, R.O. Karjalainen,: High-performance liquid chromatography analysis of black currant (*Ribes nigrum* L.) fruit phenolics grown either conventionally or organically. ***J Agric Food Chem***, 54, 7530-7538, 2006.

157. S.H. Häkkinen, A.R. Törrönen,: 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, 2000.

158. D. Hernandez, A.F. Recamales, A.J. Melendez-Martinez, M.L. Gonzalez-Miret, F.J. Heredia,: Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria ananassa* duch) grown in two different soilless systems. ***J Agric Food Chem***, 55, 1846-1852, 2007.

159. L. Wang, YC. Tu, TW. Lian, JT Hung, JH Yen, MJ Wu,: Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. ***J Agric Food Chem***, 54, 9798-9804, 2006.

160. B. Jayaprakasam, M. Vanisree, Y. Zhang, D.L. Dewitt, M.G. Nair,: Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. ***J Agric Food Chem,*** 54, 5375-5381, 2006.

161. J. Wang, G. Mazza,: Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN-γ-activated RAW 264.7 macrophages. ***J Agric Food Chem,*** 50, 4183-4189, 2002.

162. W. Wätjen, G. Michels, B. Steffan, P. Niering, Y Chovolou, AA. Kampkötter, QH. Tran-Tri, P. Proksch, R. Kahl,: Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. ***J Nutr***, 135, 525-531, 2005.

163. YJ. Lee, PH. Liao, WK. Chen, CC. Yang,: Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. ***Cancer Lett***, 153, 51-56, 2000.

164. K.L. Khanduja, R.K. Gandhi, V. Pathania, N. Syal,: Prevention of N-Nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. ***Food Chem Toxicol***, 37, 313-318, 1999.

165. D. Ahn, D. Putt, L. Kresty, G.D. Stoner, D. Fromm, P.F. Hollenberg,: The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes. ***Carcinogenesis***, 17, 821-828, 1996.

166. I.M.C.M. Rietjens, M.G. Boersma, L. de Haan, B. Spenkelink, H.M. Awad, N.H.P. Cnubben, J.J. van Zanden, H.van der Woude, G.M. Alink, J.H. Koeman,: The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidant vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. Environ Toxicol Pharmacol, 11, 321-333, 2002.

167. J Garcia-Alonso, G. Ros, M.L. Vidal-Guevara, M.J. Periago,: Acute intake of phenolic-rich juice improves, antioxidant status in healthy subjests. ***Nutrition Research***, 26, 330,339, 2006.

168. S.U. Mertens-Talcott, S.T. Talcott, S.S. Percival,: Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. ***J Nutr***, 133, 2669-2674, 2003.

169. M.J. Bermúdez-Soto, M. Larrosa, J.M. Garcia-Cantalejo, J.C.Espin, F.A. Tomás-Barberan, M.T. Garcia-Conesa,: Up-regulation of tumor suppressors carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. ***J Nutr Biochem***, 18, 259-271, 2007.

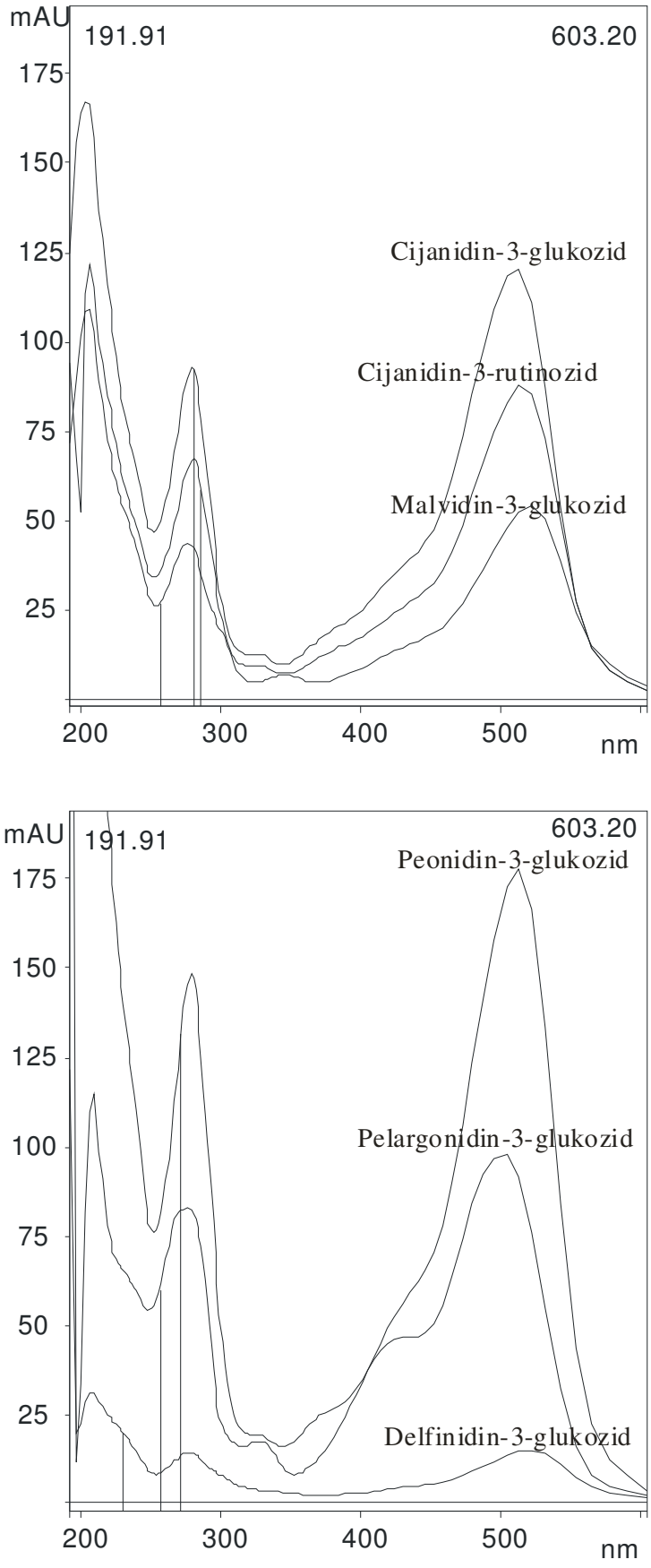
170. M.E. Olsson, KE. Gustavsson, S. Andersson, A. Nilsson, RD. Duan,: Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. ***J Agric Food Chem,*** 52, 7264-7271, 2004.

171. N.P.Seeram, L.S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H.S. Scheuller, D. Heber,: Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. ***J Agric Food Chem,*** 54, 9329-9339, 2006.

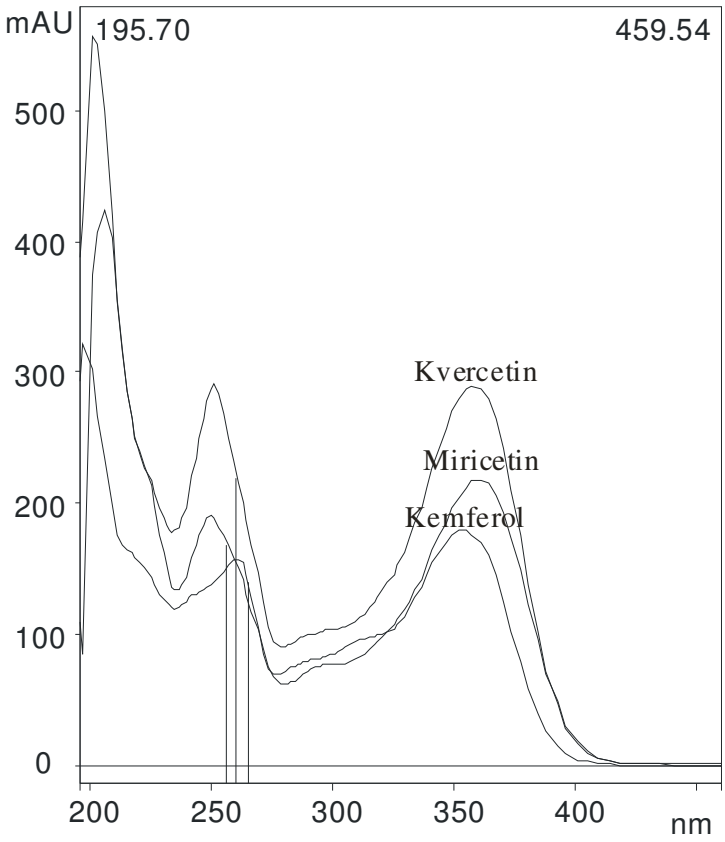
172. T. Ichiyanagi, Y. Shida, M.M. RAhman, Y. Hatano, T. Konishi,: Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (Vaccinium myrtillus L.) extracts in rats. ***J Agric Food Chem***, 54, 6578-6587, 2006.

173. W. Yi, C.C.Akoh, J. Fischer, G. Krewer,: Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayer. ***J Agric Food Chem***, 54, 5651-5658, 2006.

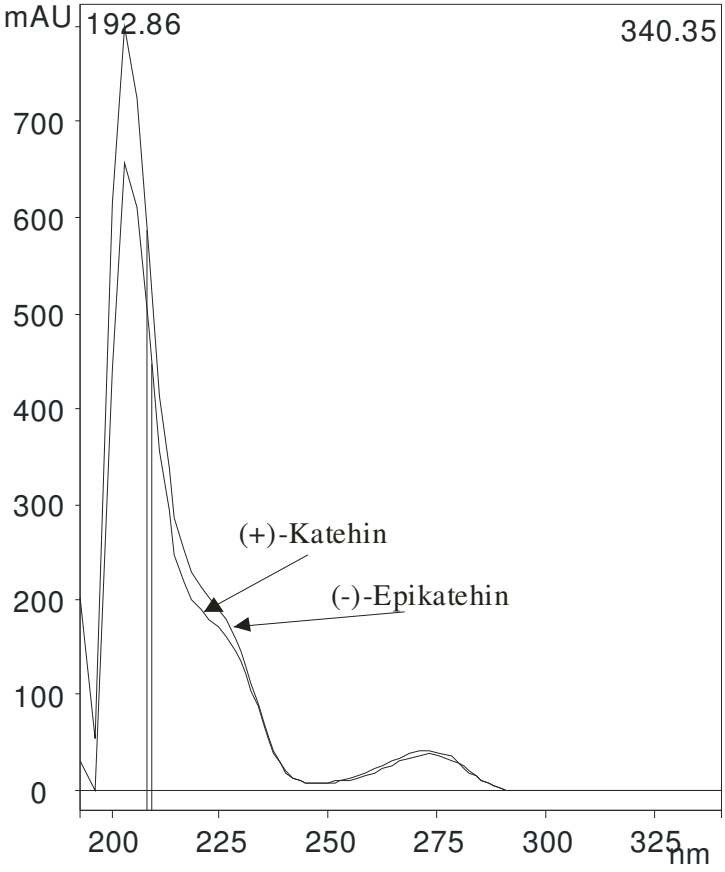
8. PRILOZI



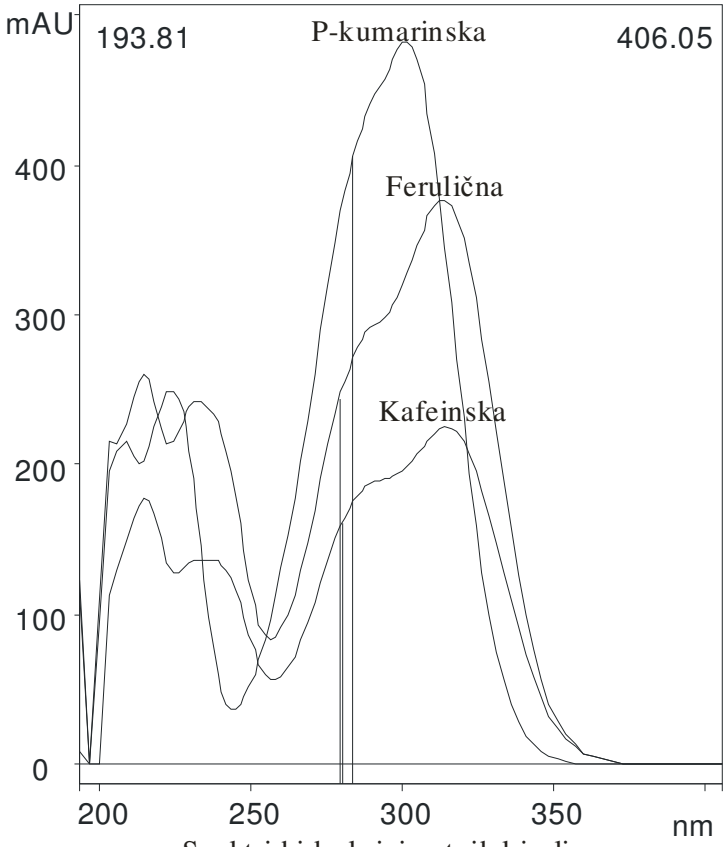
Spektri antocijanina



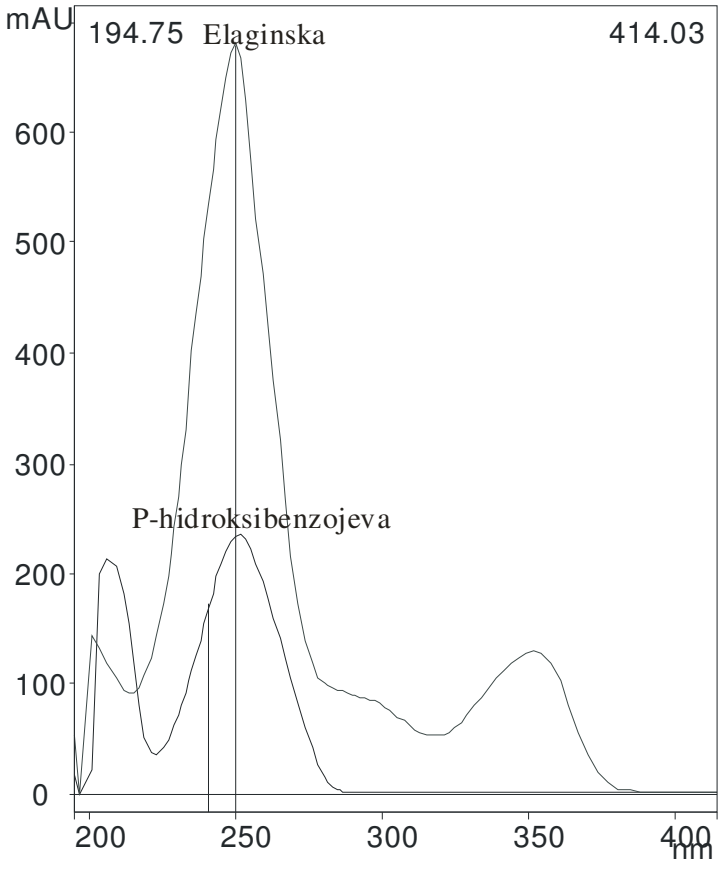
Spektri flavonola



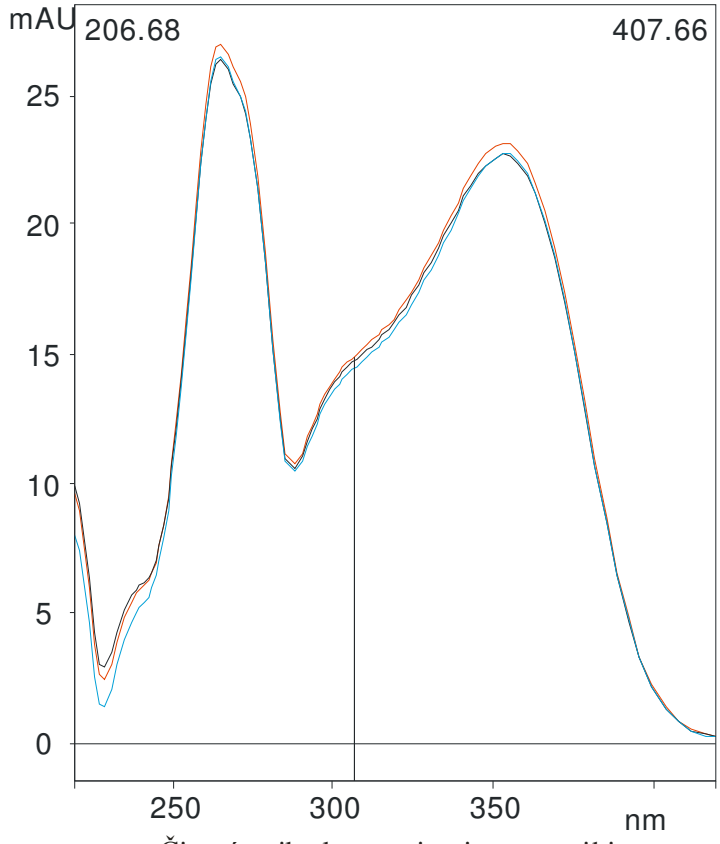
Spektri flavanola



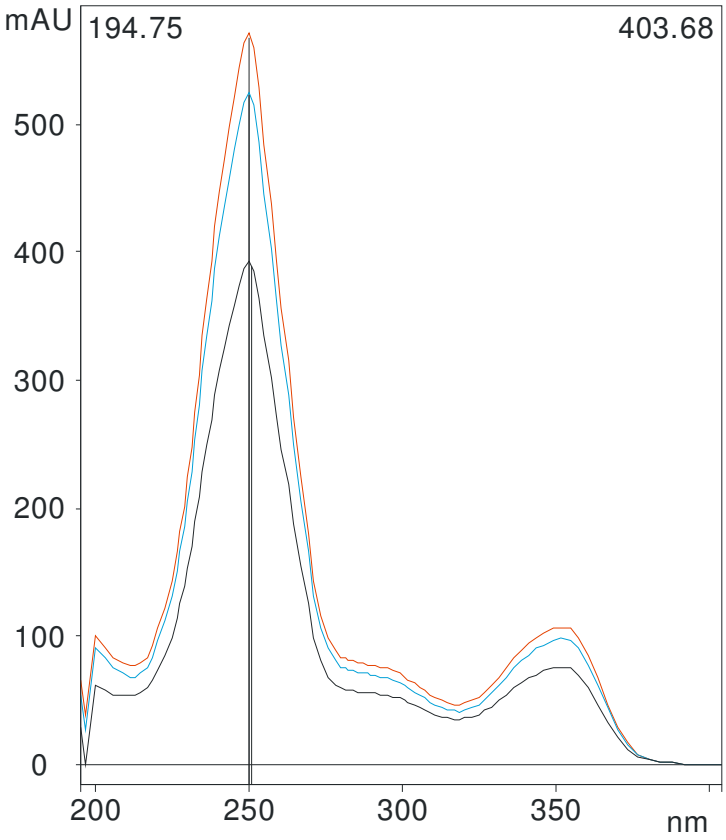
Spektri hidroksicimetnih kiselina



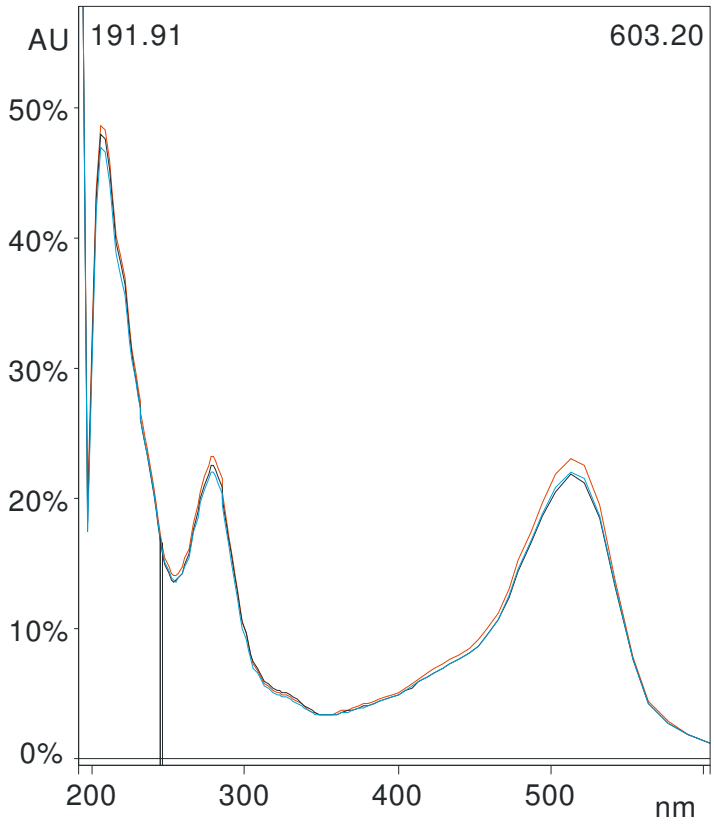
Spektri hidroksibenzojevih kiselina



Čistoća pika kvercetina iz crnog ribiza



Čistoća pika elaginske kiseline iz kupine



Čistoća pika cijanidin-3-glukozida iz borovnice

ŽIVOTOPIS

Lidija Jakobek rođena je 04.04.1977. godine u Našicama. Nakon završene osnovne škole upisala je srednju školu (Opća gimnazija) u Orahovici na kojoj je maturirala 1995 godine s izvrsnim uspjehom. Iste godine upisala je Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku. Tijekom studiranja (1999. god.) dobila je Rektorovu nagradu. Diplomirala je s izvrsnim uspjehom 2001. godine na smjeru prehrambeno inženjerstvo s ostvarenim prosjekom ocjena svih položenih ispita 4.5.

Od 2001. godine radi u svojstvu znanstvenog novaka na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku. Iste godine upisala je poslijediplomski znanstveni studij na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku, smjer prehrambeno inženjerstvo.

Tijekom dosadašnjeg rada na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu sudjelovala je u radu na dva znanstveno-istraživačka projekta financirana od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske: „Nutritivno-toksični aspekti hrane i prehrane“ (113003, voditelj prof. dr. sc. Milena L. Mandić) i „Interakcije u sustavu metalni ambalažni materijal-hrana” (113006, voditelj prof. dr. sc. Marijan Šeruga). Tijekom 2002. godine boravila je na Institutu za vina u Eisenstadtu (Austrija) s ciljem upoznavanja rada na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC). U okviru rada na projektima njena znanstveno-istraživačka problematika bila je vezana za karakterizaciju polifenolnih spojeva u voću i vinu HPLC tehnikama te istraživanja antioksidacijskih svojstava polifenola.

Do sada je kao autor objavila 2 rada u časopisu indeksiranom u CC i SCI bazama te 1 rad u časopisu indeksiranom u sekundarnim bazama podataka (CAB). Kao autor objavila je i 3 rada u Zbornicima radova s međunarodnog znanstvenog skupa te kao koautor 1 rad u Zborniku radova s domaćeg znanstvenog skupa. Sudjelovala je na 4 međunarodna i 3 domaća kongresa.