



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Milena D. Nikolić

**OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA ICP-OES METODE
I CIKLIČNE VOLTAMETRIJE ZA ODREĐIVANJE
ELEMENTNOG SASTAVA I ANTIOKSIDATIVNE
AKTIVNOSTI ODABRANIH SORTI JAGODASTOG
VOĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2022



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Milena D. Nikolić

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE ICP-OES METHOD AND CYCLIC VOLTAMMETRY FOR DETERMINATION OF THE ELEMENTAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SELECTED VARIETIES OF BERRIES

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2022



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Milena D. Nikolić

**OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA ICP-OES METODE
I CIKLIČNE VOLTAMETRIJE ZA ODREĐIVANJE
ELEMENTNOG SASTAVA I ANTIOKSIDATIVNE
AKTIVNOSTI ODABRANIH SORTI JAGODASTOG
VOĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Tekst ove doktorske disertacije stavlja se na uvid javnosti, u skladu sa članom 30., stav 8. Zakona o visokom obrazovanju ("Sl. Glasnik RS", br. 76/2005, 100/2007 – autentično tumačenje, 97/2008, 44/2010, 93/2012, 89/2013 i 99/2014)

NAPOMENA O AUTORSKIM PRAVIMA:

Ovaj tekst smatra se rukopisom i samo se saopštava javnosti (član 7. Zakona o autorskim i srodnim pravima, "Sl. Glasnik RS", br. 104/2009, 99/2011 i 119/2012).

Nijedan deo ove doktorske disertacije ne sme se koristiti ni u kakve svrhe, osim za upoznavanje sa njenim sadržajem pre odbrane disertacije.

Niš, 2022

Mentor:

dr Aleksandra N. Pavlović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu

Članovi komisije:

dr Snežana B. Tošić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu

dr Biljana M. Kaličanin, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu

dr Milan N. Mitić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu

dr Jelena Mrmošanin, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Александра Павловић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов:

Оптимизација и валидација ICP-OES методе и цикличне волтаметрије за одређивање елементног састава и антиоксидативне активности одабраних сорти јагодастог воћа

Резиме:

У оквиру ове докторске дисертације извршена је оптимизација и валидација ICP-OES методе у циљу одређивања елементног састава узорака јагода, купина, малина и боровница. Тачност ICP-OES методе је у опсегу од 94,61% до 103,6%. Прецизност методе је у опсегу од 2,48% до 7,60%. Од макроелемената, најзаступљенији је К, а потом следе Са, Р, Mg и Na. Анализирани узорци се одликују врло ниским садржајем натријума. Од микроелемената, најзаступљенији је Mn, а затим следе Fe, Cu, Zn и Si. Садржај Al, Cd и Pb у свим анализираним узорцима воћа је испод прописаних граница и не представља ризик по здравље људи. Арсен и баријум нису детектовани у анализираним узорцима. Применом UV/Vis спектофотометрије, одређен је садржај укупних полифенолних једињења, флавоноида и укупних антоцијана у киселометанолним, метанолним, 96% етанолним, 60% етанолним, воденим и ацетонским екстрактима. Највећи садржај укупних полифенолних једињења, флавоноида и укупних антоцијана забележен је у киселометанолним екстрактима. Такође, испитана је антиоксидативна активност поменутих екстраката применом спектрофотометријских тестова (ABTS, DPPH, FRAP и RP). Највећу антиоксидативну активност показали су узорци боровница, потом купина, малина и на крају јагода. Затим, извршена је оптимизација радних услова (брзине скенирања и рН вредности раствора узорака) у циљу примене електрохемијске методе - цикличне волтаметрије за одређивање антиоксидативне активности испитиваних узорака. На цикличним волтамограмима запажена су 4 пика. Први анодни пик на вредностима потенцијала између 0,310 V и 0,350 V последица је оксидације флавонола (кверцетина и његових гликозида) и кафеине киселине. Други, трећи и четврти анодни пик на потенцијалима између 0,426 V и 0,444 V, 0,524 V и 0,540 V, односно 0,638 V и 0,756 V, могу се приписати антоцијанима и хидроксициметним киселинама (ферулној и кумарној киселини). Висок степен позитивне корелације постоји између добијених резултата

антиоксидативне активности применом електрохемијске методе и спектрофотометријских *in vitro* тестова. Идентификација и квантификација појединачних полифенолних једињења (кафене, ферулне, кумарне и елагинске киселине; рутина, кемферола, кверцетина и њихових гликозида; гликозида цијанидина, пеларгонидина, делфинидина, пеонидина, петунидина и малвидина) извршена је применом течне хроматографије високих перформанси (HPLC). Испитана је кинетика термичке деградације укупних антоцијана у џемовима од јагодастог воћа са већим и мањим садржајем шећера и израчунате енергије активације (Ea) реакција термичке деградације укупних антоцијана на високим температурама (90-105 °C). Применом HPLC методе, праћена је стабилност појединачних антоцијана у воћним џемовима. У циљу диференцијације испитиваних узорака на основу садржаја елемената и појединачних полифенолних једињења, као и на основу антиоксидативне активности, примењене су статистичке методе анализе-корелациона анализа, анализа главних компонената (PCA) и кластер анализа (CA).

Научна област:

Хемија

Научна
дисциплина:

Аналитичка хемија

Кључне речи:

Јагода, малина, купина, боровница, џем, елементи, полифеноли, антиоксидативна активност, ICP-OES, циклична волтаметрија, UV/Vis спектрофотометрија, HPLC, кластер анализа, анализа главних компонената

УДК:

543.42:634.74

543.552:634.74

CERIF
класификација
:

P 003 и P 300 Хемија и Аналитичка хемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Aleksandra Pavlović, Ph.D., Full Professor, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš

Title:

Optimization and validation of the ICP-OES method and cyclic voltammetry for determination of the elemental composition and antioxidant activity of selected varieties of berries

Abstract:

Within this doctoral dissertation, the optimization and validation of the ICP-OES method was performed in order to determine the elemental composition of strawberries, blackberries, raspberries and blueberries. The accuracy of the ICP-OES method ranges from 94.61% to 103.6%. The accuracy of the method ranges from 2.48% to 7.60%. The most abundant macroelement in analyzed samples was K, followed by Ca, P, Mg and Na. The analyzed samples are characterized by a very low sodium content. The most abundant microelement was Mn, followed by Fe, Cu, Zn and Si. The content of Al, Cd and Pb in all analyzed fruit samples was below the prescribed limits and did not pose a risk to human health. The content of total polyphenolic compounds, flavonoids and total anthocyanins in acid methanolic, methanolic, 96% ethanolic, 60% ethanolic, aqueous and acetone extracts was determined by UV/Vis spectrophotometry. The highest content of total polyphenolic compounds, flavonoids and total anthocyanins was detected in acidified methanol extracts. The antioxidant activity of all mentioned extracts was examined by spectrophotometric assays (ABTS, DPPH, FRAP and RP). Blueberry samples exhibited the highest antioxidant activity, followed by blackberries, raspberries and strawberries. Optimization of working conditions (scanning speed and pH value of the sample solutions) in cyclic voltammetry was performed in order to determine the antioxidant activity of the samples by electrochemical method. There were 4 peaks observed on cyclic voltammograms. The first anodic peak at potential between 0.310 V and 0.350 V in cyclic voltammograms is due to the oxidation of flavonols (quercetin and its glycosides) and caffeic acid. The second, third and fourth anodic peaks at potentials between 0.426 V and 0.444 V, 0.524 V and 0.540 V, and 0.638 V and 0.756 V, respectively, can be attributed to anthocyanins and hydroxycinnamic acids (ferulic and coumaric acid). A high degree of positive correlation was observed between electrochemical and spectrophotometric *in vitro* methods for antioxidant activity determination. Identification and quantification of individual polyphenolic compounds (caffeic, ferulic, coumaric and ellagic acids; rutin, kaempferol, quercetin and their glycosides;

glycosides of cyanidin, pelargonidine, delphinidine, peonidine, petunidine and malvidin) was performed by HPLC method. The kinetics of thermal degradation of total anthocyanins in berry jams with higher and lower sugar content was investigated. Activation energies (E_a) of thermal degradation reactions of total anthocyanins at high temperatures (90-105 °C) were calculated. The stability of individual anthocyanins in fruit jams was monitored by HPLC. In order to differentiate the tested samples on the basis of the content of elements and individual polyphenolic compounds, as well as on the basis of antioxidant activity, correlation analysis, principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were applied.

Scientific
Field:

Chemistry

Scientific
Discipline:

Analytical Chemistry

Key Words:

Strawberry, raspberry, blackberry, blueberry, jam, elements, polyphenols, antioxidant activity, ICP-OES, cyclic voltammetry, UV/Vis spectrophotometry, HPLC, cluster analysis, principal component analysis

UDC:

543.42:634.74

543.552:634.74

CERIF
Classification
:

P 003 and P 300 Chemistry and Analytical chemistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони	
Тип документације,	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милена Д. Николић
Ментор, МН:	Александра Н. Павловић
Наслов рада, НР:	Оптимизација и валидација ICP-OES методе и цикличне волтаметрије за одређивање елементног састава и антиоксидативне активности одабраних сорти јагодастог воћа
Језик публикације,	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља	Србија
Уже географско	Србија
Година, ГО:	2022.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса,	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/	11 поглавља, 336 страна, 355 цитата, 66 табела, 124 слика/графика
Научна област, НО:	Хемија
Научна	Аналитичка хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Јагода, малина, купина, боровница, џем, елементи, полифеноли, ICP-OES, циклична волтаметрија, UV/Vis спектрофотометрија, HPLC, кластер анализа, анализа главних компонената
УДК	543.42:634.74 543.552:634.74
Чува се, ЧУ:	Библиотека

<p>Важна напомена, ВН:</p>	<p>Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројеката „Природни производи биљака и лишјајева: изоловање, идентификација, биолошка активност и примена“, евиденциони број 172047 и „Превентивни, терапијски и етички приступ преклиничким и клиничким истраживањима гена и модулатора редокс ћелијске сигнализације у имунском, инфламаторном и пролиферативном одговору ћелије”, евиденциони број 41018, као и на основу Уговора о реализацији и финансирању НИО број 451-03-68/2020-14/200124, број 451-03-9/2021-14/200124 и број 451-03-68/2022-14/200124. Истраживање у оквиру ове дисертације је финансирано и од средстава које је Министарство уплаћивало на име материјалних трошкова за покриће рада стипендисте Министарства на пројекту.</p>
<p>Извод, ИЗ:</p>	<p>У оквиру ове докторске дисертације извршена је оптимизација и валидација ICP-OES методе у циљу одређивања елементног састава узорака јагода, купина, малина и боровница. Тачност ICP-OES методе је у опсегу од 94,61% до 103,6%. Прецизност методе је у опсегу од 2,48% до 7,60%. Од макроелемената, најзаступљенији је К, а потом следе Са, Р, Mg и Na. Анализирани узорци се одликују врло ниским садржајем натријума. Од микроелемената, најзаступљенији је Mn, а затим следе Fe, Cu, Zn и Si. Садржај Al, Cd и Pb у свим анализираним узорцима воћа је испод прописаних граница и не представља ризик по здравље људи. Применом UV/Vis спектофотометрије, одређен је садржај укупних полифенолних једињења, флавоноида и укупних антоцијана у киселометанолним, метанолним, 96% етанолним, 60% етанолним, воденим и ацетонским екстрактима. Највећи садржај укупних полифенолних једињења, флавоноида и укупних антоцијана забележен је у киселометанолним екстрактима. Испитана је антиоксидативна активност поменутих екстраката применом спектрофотометријских тестова (ABTS, DPPH, FRAP и RP). Највећу антиоксидативну активност показали су узорци боровница, потом купина, малина и на крају јагода. Затим, извршена је оптимизација радних услова (брзине скенирања и рН вредности раствора узорака) у циљу примене електрохемијске методе - цикличне волтаметрије за одређивање антиоксидативне активности испитиваних узорака. На цикличним волтамограмима запажена су 4 пика. Први анодни пик на вредностима потенцијала између 0,310 V и 0,350 V последица је оксидације флавонола (кверцетина и његових гликозида) и кафеине киселине. Други, трећи и четврти анодни пик на потенцијалима између 0,426 V и 0,444 V, 0,524 V и 0,540 V, односно 0,638 V и 0,756 V, могу се приписати антоцијанима и хидроксициметним киселинама (ферулној и кумарној киселини). Висок степен позитивне корелације постоји између добијених резултата антиоксидативне активности применом електрохемијске методе и спектрофотометријских <i>in vitro</i> тестова. Идентификација и квантификација појединачних полифенолних једињења (кафеине, ферулне, кумарне и елагинске киселине; рутина, кемферола, кверцетина и њихових гликозида; гликозида цијанидина,</p>

	<p>пеларгонидина, делфинидина, пеонидина, петунидина и малвидина) извршена је применом течне хроматографије високих перформанси (HPLC). Испитана је кинетика термичке деградације укупних антоцијана у џемовима од јагодастог воћа са већим и мањим садржајем шећера и израчунате енергије активације (Ea) реакција термичке деградације укупних антоцијана на високим температурама (90-105 °C). Применом HPLC методе, праћена је стабилност појединачних антоцијана у воћним џемовима. У циљу диференцијације испитиваних узорака на основу садржаја елемената и појединачних полифенолних једињења, као и на основу антиоксидативне активности, примењене су статистичке методе анализе – корелациона анализа, анализа главних компонената (PCA) и кластер анализа (CA).</p>
<p>Датум прихватања теме, ДП:</p>	<p>30.10.2017.</p>
<p>Датум одбране, ДО:</p>	<p>}</p>
<p>Чланови комисије, КО:</p>	<p>Председник: Члан Члан Члан Члан</p>



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	Monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Milena D. Nikolić
Mentor, MN :	Aleksandra N. Pavlović
Title, TI :	Optimization and validation of the ICP-OES method and cyclic voltammetry for determination of the elemental composition and antioxidant activity of selected varieties of berries
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2022
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/picture)	11 chapters, 336 pages, 355 references, 66 tables, 124 figures/graphs
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Analytical chemistry
Subject/Key words, S/KW :	Strawberry, raspberry, blackberry, blueberry, jam, elements, polyphenols, ICP-OES, cyclic voltammetry, UV/Vis spectrophotometry, HPLC, cluster analysis, principal component analysis
UC	543.42:634.74 543.552:634.74
Holding data, HD :	Library

Note, N :	PhD research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic Serbia, within the projects "Natural products of plants and lichens: isolation, identification, biological activity and application" (No. 172047) and „Preventive, therapeutic, and ethical approach in preclinical and clinical studies of the genes and modulators of redox cell signaling in immune, inflammatory and proliferative cell response" (No. 41018), and on the basis of a contract on the realization and financing of scientific research work by SRO, No. 451-03-68/2020-14/200124, No. 451-03-9/2021-14/200124 and No. 451-03-68/2022-14/200124. Also, a part of the PhD research was funded by the Ministry within the student scholarship.
Abstract, AB :	Within this doctoral dissertation, the optimization and validation of the ICP-OES method was performed in order to determine the elemental composition of strawberries, blackberries, raspberries and blueberries. The accuracy of the ICP-OES method ranges from 94.61% to 103.6%. The accuracy of the method ranges from 2.48% to 7.60%. The most abundant macroelement in analysed samples was K, followed by Ca, P, Mg and Na. The analyzed samples are characterized by a very low sodium content. The most abundant microelement was Mn, followed by Fe, Cu, Zn and Si. The content of Al, Cd and Pb in all analyzed fruit samples was below the prescribed limits and did not pose a risk to human health. The content of total polyphenolic compounds, flavonoids and total anthocyanins in acid methanolic, methanolic, 96% ethanolic, 60% ethanolic, aqueous and acetone extracts was determined by UV/Vis spectrophotometry. The highest content of total polyphenolic compounds, flavonoids and total anthocyanins was detected in acidified methanol extracts. The antioxidant activity of all mentioned extracts was examined by spectrophotometric assays (ABTS, DPPH, FRAP and RP). Blueberry samples exhibited the highest antioxidant activity, followed by blackberries, raspberries and strawberries. Optimization of working conditions (scanning speed and pH value of the sample solutions) in cyclic voltammetry was performed in order to determine the antioxidant activity of the samples by electrochemical method. There were 4 peaks observed on cyclic voltammograms. The first anodic peak at potential between 0.310 V and 0.350 V in cyclic voltammograms is due to the oxidation of flavonols (quercetin and its glycosides) and caffeic acid. The second, third and fourth anodic peaks at potentials between 0.426 V and 0.444 V, 0.524 V and 0.540 V, and 0.638 V and 0.756 V, respectively, can be attributed to anthocyanins and hydroxycinnamic acids (ferulic and coumaric acid). A high degree of positive correlation was observed between electrochemical and spectrophotometric <i>in vitro</i> methods for antioxidant activity determination. Identification and quantification of individual polyphenolic

	<p>compounds (caffeic, ferulic, coumaric and ellagic acids; rutin, kaempferol, quercetin and their glycosides; glycosides of cyanidin, pelargonidine, delphinidine, peonidine, petunidine and malvidin) was performed by HPLC method. The kinetics of thermal degradation of total anthocyanins in berry jams with higher and lower sugar content was investigated. Activation energy (Ea) of thermal degradation reactions of total anthocyanins at high temperatures (90-105 °C) was calculated. The stability of individual anthocyanins in fruit jams was monitored by HPLC. In order to differentiate the tested samples on the basis of the content of elements and individual polyphenolic compounds, as well as on the basis of antioxidant activity, correlation analysis, principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were applied.</p>										
Accepted by the Scientific Board	30.10.2017.										
Defended on, DE:											
Defended <table border="1" data-bbox="475 801 655 1032"> <tr> <td data-bbox="475 801 655 846">President:</td> <td data-bbox="655 801 1410 846"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="475 846 655 891">Member:</td> <td data-bbox="655 846 1410 891"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="475 891 655 936">Member:</td> <td data-bbox="655 891 1410 936"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="475 936 655 981">Member:</td> <td data-bbox="655 936 1410 981"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="475 981 655 1032">Member:</td> <td data-bbox="655 981 1410 1032"></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member:		Member:		Member:		
President:											
Member:											
Member:											
Member:											
Member:											

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Katedre za analitičku i fizičku hemiju, na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije”, evidencioni broj III 41018 i „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, evidencioni broj OI 172047.

Eksperimentalni deo rada koji se odnosi na cikličnu voltametriju urađen je u laboratoriji za Analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujem dr Draganu Manojloviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Daliboru Stankoviću na saradnji i pomoći.

Bila mi je čast da saradujem sa prof. dr Aleksandom Pavlović, koja je rukovodila izradom ove disertacije i od koje sam naučila da će se za svaki problem uvek naći rešenje. Neizmerno Vam hvala na ukazanoj prilici, poverenju, strpljenju, pomoći i znanju koje ste nesebično delili.

Zahvaljujem dragoj prof. dr Snežani Tošić, na saradnji, savetima i predlozima kojima je doprinela kvalitetu ove disertacije.

Hvala prof. dr Biljani Kaličanin na angažovanju u realizaciji eksperimentalnog dela vezanog za cikličnu voltametriju i učešću u radu komisije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Milanu Mitiću, na angažovanju u realizaciji eksperimentalnog dela vezanog za HPLC analizu i tumačenju rezultata.

Dragoj prijateljici i kolegici, doc. dr Jeleni Mrmošanin, od srca zahvaljujem na izuzetnoj pomoći pri obradi i tumačenju rezultata i prelepom timskom radu.

Hvala divnim roditeljima na podršci. Hvala najboljoj sestri na svetu na ogromnoj pomoći i ohrabrujućim rečima uvek kada je bilo teško.

Na kraju, suprugu Jovici i našoj divnoj deci, Pavlu i Anđeliji, hvala na pruženoj ljubavi i zagrljajima kojima su mi ispunili život.

*Mojim anđelima,
Pavlu i Anđeliji*

Sadržaj

1. UVOD	1
2. CILJEVI RADA.....	5
3. TEORIJSKI DEO.....	7
3.1. Osnovne karakteristike jagodastog voća	8
3.1.1. <i>Fragaria ananassa</i> Dutch. – jagoda	8
3.1.2. <i>Rubus idaeus</i> L. – crvena malina	11
3.1.3. <i>Rubus</i> L. – kupina	13
3.1.4. <i>Vaccinium</i> L. – borovnica.....	14
3.2. Prerada i konzervisanje voća.....	16
3.3. Elementi - podela, nalaženje i uloga u ljudskoj ishrani	20
3.3.1. Bioakumulacija elemenata putem zemljišta i vode.....	21
3.4. Polifenolna jedinjenja.....	23
3.4.1. Fenolne kiseline	29
3.4.2. Stilbenoidi.....	30
3.4.3. Flavonoidi	31
3.4.5. Antocijani	37
3.5. Slobodni radikali i antioksidanti – mehanizam delovanja	39
3.5.1. Spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	44
3.6. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)	48
3.6.1. Osnovni princip ICP-OES tehnike.....	48
3.6.2. Optimizacija parametara ICP-OES sistema	51
3.6.3. Validacija ICP-OES metode	53
3.7. Tečna hromatografija visokih performansi	58
3.8. UV/Vis spektrofotometrija.....	62
3.9. Ciklična voltametrij.....	63
3.10. Statističke metode analize	67
3.10.1. Klaster analiza	67
3.10.2. Analiza glavnih komponenti.....	68
4. EKSPERIMENTALNI DEO	71
4.1. Uzorci.....	72
4.2. Reagensi	73
4.3. Aparati i pribor.....	74
4.4. Mineralizacija uzoraka i operativni uslovi za ICP-OES analizu.....	75

4.5. HPLC i spektrofotometrijska analiza	76
4.5.1. HPLC metoda za određivanje pojedinačnih polifenolnih jedinjenja	76
4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja metodom Folin-Ciocalteu	88
4.5.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	89
4.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih i monomernih antocijana.....	91
4.6. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti jagodastog voća.....	93
4.6.1. ABTS metoda	93
4.6.2. DPPH metoda	95
4.6.3. FRAP metoda.....	96
4.6.4. RP metoda.....	97
4.7. Elektrohemijaska analiza antioksidativne aktivnosti primenom ciklične voltametrije..	99
5. REZULTATI I DISKUSIJA	101
5.1. Optimizacija i validacija ICP OES metoda.....	102
5.1.1. Optimizacija operativnih uslova plazme.....	102
5.1.2. Matriks efekat i izbor analitičkih linija.....	106
5.1.3. Validacija ICP-OES metode	109
5.1.4. Sadržaj makro i mikroelemenata u uzorcima jagodastog voća.....	111
5.2. Spektrofotometrijska analiza jagodastog voća.....	136
5.2.1. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana	136
5.2.4. Antioksidativni kapacitet jagodastog voća	143
5.3. Optimizacija operativnih uslova za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ciklične voltametrije.....	151
5.3.1. Uticaj brzine skeniranja	151
5.3.2. Uticaj pH vrednosti.....	152
5.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti jagodastog voća primenom ciklične voltametrije	154
5.4. HPLC analiza pojedinačnih polifenolnih jedinjenja jagodastog voća	164
5.5. Kinetika termičke degradacije ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida, antocijana i pojedinačnih antocijana u džemovima od malina, kupina, borovnica i jagoda	190
5.5.1. Termička degradacija ukupnih polifenolnih jedinjenja i flavonoida	190
5.5.2. Termička degradacija ukupnih antocijana	209
5.5.3. Uticaj zagrevanja na antioksidativnu aktivnost džemova	223
5.5.4. Termička degradacija pojedinačnih antocijana.....	232
6. IZVOD	248

7. SUMMARY	257
8. PRILOG	266
9. LITERATURA.....	286
10. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM.....	306
11. PROPATNA DOKUMENTACIJA.....	313
ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ	315
ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ	316

1. Uvod

Velika pažnja u ishrani i nauci sve više je posvećena voću poput jagode, maline, kupine, borovnice, crne ribizle i aronije zbog njihovog blagotvornog uticaja na zdravlje čoveka. Zbog svoje prepoznatljive arome konzumiraju se, ne samo u svežem i zamrznutom stanju, već i u obliku džemova, želea, voćnih jogurta, sušenog ili konzerviranog voća (Seeram, 2006). Zbog sve veće potražnje na svetskom tržištu, jagodasto voće je postalo veoma značajno za privredu Republike Srbije, zahvaljujući ranom sazrevanju, brzom dostizanju pune rodnosti, brzom povraćaju investicija, prilagodljivosti na različite sisteme gajenja, kao i pogodnosti plodova za upotrebu u svežem, zamrznutom ili prerađenom obliku (Milivojević, 2018).

Jagodasto voće je preporučljivo u ishrani ljudi sa hipertenzijom, zbog vrlo niskog sadržaja natrijuma, a bogato je kalijumom, kalcijumom, fosforom, magnezijumom, gvožđem, manganom i cinkom (Hakala i sar. 2003; Khan i sar., 2010; Bagdatlioglu i sar., 2010; Guedes i sar., 2013). U malinama, jagodama i borovnicama su, pored prethodno navedenih minerala, detektovani i nikl, mangan, hrom i bakar (Grembecka i Szefer, 2013). Bakar, gvožđe, mangan i nikl nalaze se u aktivnom centru enzima superoksid-dismutaza, grupe metaloenzima koji štite ćelije od dejstva slobodnih radikala i smatraju se jednim od najvažnijih detoksikujućih enzima u ćeliji (Santos-Sánchez i sar., 2019). Rezultati nekih istraživanja ukazuju na činjenicu da su u jagodama detektovani i toksični metali poput olova i kadmijuma (Radwan i Salama, 2006).

Osim minerala, jagodasto voće sadrži vitamine, biljna vlakna (Zhao, 2007), a naročito je bogato polifenolnim jedinjenjima (Zhao, 2007; Szajdek i Borowska, 2008). Fenolne kiseline, antocijani, flavonoli i tanini povećavaju kvalitet voća jer doprinose mirisu, nutritivnim svojstvima, ukusu i boji voća (Delgado-Vargas i sar., 2000). Bioaktivne komponente u ovom voću deluju preventivno protiv nastanka nekih vrsta raka, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa II, gojaznosti i neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starenjem (Mullen i sar., 2002; Coates i sar., 2007; Paredes-López i sar., 2010). Naročito je od interesa inhibitorni efekat antocijana na nastanak i rast tumorskih ćelija putem modifikovanja redoks statusa ćelije i interferencija sa osnovnim ćelijskim funkcijama (apoptoze, inflamacije, angiogeneze, rasta i metastaze) (Kampa i sar., 2007; Dai i Mumper, 2010; Johnson i Arjmandi, 2013).

Ekstrakti kupine, maline i ogrozda dodaju se dijetetskim suplementima jer su, kao antioksidanti, veoma efikasni inhibitori slobodnih radikala (Wang i Jiao, 2000). Antioksidativna aktivnost jagoda, malina, kupina i borovnica bila je predmet istraživanja brojnih studija (Kähkönen i sar., 2001; Reyes-Carmona i sar., 2005; Heinonen, 2007;

Šavikin i sar., 2009; Sariburun i sar., 2010; Ivanović i sar., 2014; Vulić i sar., 2014; Nikolić i sar., 2019). Osim antioksidativne funkcije, polifenolna jedinjenja imaju ulogu modulatora enzimske aktivnosti i genske ekspresije (Rao i Snyder, 2010).

Ova doktorska disertacija je podeljena na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Teorijski deo, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Izvod, Summary, Prilog, Literatura, Biografija sa bibliografijom i Propratna dokumentacija.

U **Uvodu** je ukratko naveden deo biološki aktivnih jedinjenja koja se nalaze u jagodama, malinama, kupinama i borovnicama i zahvaljujući kojima jagodasto voće postaje predmet sve većeg interesovanja i potražnje, kao i naučnih istraživanja.

U delu **Ciljevi rada** je navedeno koja su istraživanja izvršena u okviru doktorske disertacije.

U **Teorijskom delu** date su građa i morfološke karakteristike samih biljaka jagode, maline, kupine i borovnice. Data je podela makro i mikroelemenata. Opisana je podela polifenolnih jedinjenja, sa posebnim osvrtom na antocijane i njihovu stabilnost, kao i njihov uticaj na ljudsko zdravlje. Objasnen je pojam antioksidanata i slobodnih radikala. Zatim su predstavljeni osnovni principi instrumentalnih tehnika koje su korišćene u radu: optička emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP-OES), ciklična voltometrija (CV), UV/Vis spektrofotometrija i tečna hromatografija visokih performansi (HPLC). Date su i osnove statističke obrade podataka (klaster analize (CA), korelacione analize i analize glavnih komponenti (PCA)).

U **Eksperimentalnom delu** su dati podaci o uzorcima, reagensima i opremi korišćenoj u radu. Opisani su načini pripreme uzoraka i postupci analize uzoraka primenom prethodno pomenutih metoda analize.

Deo **Rezultati i diskusija** obuhvata tabelarni i grafički prikaz dobijenih rezultata pri određivanju optimalnih uslova ICP-OES metode za određivanje elementnog sastava jagodastog voća, kao i optimalnih uslova za određivanje antioksidativne aktivnosti jagodastog voća primenom ciklične voltetrije. Takođe su prikazani i diskutovani rezultati određivanja: ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana, antioksidativne aktivnosti i pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u jagodastom voću i odgovarajućim džemovima primenom UV/Vis spektrofotometrije i HPLC hromatografije. Diskutovan je uticaj temperature i dodatog šećera na termičku degradaciju polifenolnih jedinjenja u toku pripreme džemova i prikazani su kinetički i termodinamički parametri reakcija termičke degradacije antocijana. Rezultati su statistički obrađeni i upoređeni sa literaturnim podacima.

Poglavlja **Izvod i Summary** obuhvataju kratki prikaz dobijenih rezultata na srpskom i engleskom jeziku.

U **Prilogu** su tabelarno prikazani dodatni rezultati.

U delu **Literatura** navedene su reference citirane u disertaciji.

U poglavlju **Biografija sa bibliografijom** prikazani su osnovni podaci o autoru, kao i spisak objavljenih radova.

Deo **Prpratna dokumentacija** podrazumeva izjave autora.

2. Ciljevi rada

Sve veća potražnja za jagodastim voćem na svetskom tržištu govori u prilog činjenici da ljudi postaju svesni značaja koji kvalitet hrane ima na njihov organizam i biraju one namirnice koje obiluju mineralima i biološki aktivnim jedinjenjima sa blagotvornim uticajem na zdravlje. Zato su postavljeni sledeći ciljevi:

- Optimizacija i validacija ICP-OES metode za određivanje elementnog sastava jagoda, malina, kupina i borovnica;
- Optimizacija uslova za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata jagoda, malina, kupina i borovnica primenom ciklične voltometrije;
- Određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana i antioksidativne aktivnosti navedenih uzoraka spektrofotometrijski;
- Nalaženje korelacije između antioksidativne aktivnosti navedenih uzoraka dobijene primenom ciklične voltometrije i antioksidativne aktivnosti dobijene primenom spektrofotometrijskih testova;
- Identifikacija pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u jagodama, malinama, kupinama i borovnicama primenom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC);
- Određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana i antioksidativne aktivnosti pripremljenih džemova od jagodastog voća;
- Ispitivanje uticaja temperature i šećera na stabilnost ukupnih antocijana u uzorcima džemova od jagodastog voća, i praćenje stabilnosti pojedinačnih antocijana u džemovima primenom HPLC hromatografije;
- Statistička obrada dobijenih podataka (korelaciona analiza, analiza glavnih komponenti i klaster analiza).

Radni zadaci su detaljno isplanirani, a ciljevi postavljeni na osnovu pregleda literaturnih podataka i sagledavanja realnih potreba za definisanjem brzih, preciznih metoda koje će lako i uspešno biti primenjene u analizi kvaliteta jagodastog voća.

3. Teorijski deo

3.1. Osnovne karakteristike jagodastog voća

Botanička klasifikacija biljaka podrazumeva podelu na redove, a zatim dalje na familije, potfamilije, rodove i vrste. Međutim, u voćarstvu je, iz praktičnih razloga, svrsishodnija podela na osnovu tipa i upotrebne vrednosti ploda, tzv. pomološka klasifikacija. Prema pomološkoj klasifikaciji, svo kontinentalno voće razvrstano je u četiri grupe (Keserović i sar., 2016):

- jabučasto voće - jabuka, kruška, mušmula, dunja, oskoruša i glog;
- koštičavo voće - šljiva, breskva, kajsija, trešnja, višnja i dren. U ovu grupu spada svo voće sa jestivim, sočnim plodovim, omotačem i čvrstom košticom koja štiti semenku;
- jezgrasto voće - voće iz različitih familija sa čvrstom ljuskom oko jestivog jezgra: orah, pitomi kesten, leska i badem;
- jagodasto voće - sitno voće jagodastog ploda: jagoda, malina, kupina, borovnica, ribizla, ogrozd, dud, kivi, brusnica, aronija itd.

Kao što se može primetiti, prema pomološkoj klasifikaciji, voće iz različitih botaničkih familija može biti svrstano u istu grupu.

3.1.1. *Fragaria ananassa* Dutch. – jagoda

Jagoda je višegodišnja, zeljasta biljka. U sistematici biljaka, jagoda zauzima sledeće mesto (Milivojević, 2018):

- Odeljak:** *Spermatophyta* (semenice)
- Pododeljak:** *Magnoliophytina* (*Angiospermae*, skrivenosemenice)
- Klasa:** *Magnoliatae* (*Dicotyledoneae*, dikotile)
- Potklasa:** *Rosidae* (*Rosiflorae*, ruže)
- Nadred:** *Rosanae* (ruže)
- Red:** *Rosales* (ruže)
- Familija:** *Rosaceae* (ruže)
- Potfamilija:** *Rosoideae* (jagodaste voćke)
- Rod:** *Fragaria* L.

Baštenska jagoda (*Fragaria ananassa* Dutch.) je nastala hibridizacijom čileanske i virdžinijske jagode u 18. veku, kada je i započeto sa gajenjem ove vočke (Mratinić, 2018). Intenzivnim radom na ukrštanju sorti u cilju dobijanja biljaka koje daju plodove željenih karakteristika, do danas je u svetu stvoreno više od 15 000 sorti jagode (slika 3.1).



(a)

(b)

(c)

Slika 3.1. Različite sorte jagode: Alba (a), Zenga Zengana (b) i šumska jagoda (c)

Koren jagode je žiličast i veoma razgranat, sa velikim brojem korenovih dlačica. Korenove dlačice intenzivno upijaju vodu i u njoj rastvorene mineralne materije. Stablo jagode je male visine i sastoji se od više bočnih izboja. Ima ulogu u transportu vode i mineralnih materija od korena do listova, kao i u transportu vode i u njoj rastvorenih organskih materija od listova do korena. List jagode se sastoji od lisne osnove, lisne drške i najčešće 3, a retko 4 ili 5, liski. Na osnovu morfoloških osobina listova (veličina, oblik, nazubljenost, nervatura) može se identifikovati sorta jagode. Cvet je kod privredno značajnih sorti baštenske jagode dvopolan (hermafroditan) – sastoji se od tučkova (520 do 580), prašnika (5 do 10) i oko njih spiralno raspoređenih belih kruničnih listića i zelenih čašičnih listića. Plod jagode je zbirna orašica koja se sastoji od peteljke, čašice i velikog broja ahenija koje su utisnute u sočnu, jestivu cvetnu ložu. Boja ploda jagode, u zavisnosti od sorte, može biti bela, svetlocrvena, narandžasto crvena, tamnocrvena, a stvorene su i sorte koje daju crne plodove. (Milivojević, 2018).

Za normalan razvitak biljke, od makroelemenata su najznačajniji kalijum, fosfor i azot. Kalijum ima ulogu u regulisanju nagomilavanja ugljenih hidrata i njihovom kretanju kroz organizam voćaka. Takođe, utiče na poboljšanje boje, sjaja i ukusa ploda. Fosfor pospešuje razvitak korenovog sistema, učestvuje u sintezi ugljenih hidrata i formiranju i funkciji cvetova, plodova i semena. Azot je neophodan za rast i razvoj biljaka, utiče na

formiranje cvetnih pupoljaka, zametanje i rast plodova (Milivojević, 2018). Isplativost proizvodnje jagode zavisi od vrste jagode (genotipa), primenjenih agrotehničkih mera, spoljašnjih uslova, kao i trenutnog stanja na tržištu (Milivojević i Nikolić, 2015).

Prema zvaničnim podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu za 2019. godinu (FAO – *Food and Agriculture Organization*), jagoda je u Srbiji gajena na 6512 ha, sa prinosom od 19 608 tona. Na slici 3.2 prikazan je uređen, rentabilan, jednogodišnji zasad jagoda na folijama na otvorenom.



Slika 3.2. Zasad jagoda u leskovačkom kraju (poljoprivredno gazdinstvo Anđelković)

Ukupna proizvodnja jagode na svetu iznosi 8,885 miliona tona, dok su najveći proizvođači Kina, SAD, Španija, Meksiko i Turska (FAOSTAT, 2019).

Jagode u ishrani predstavljaju dobar izvor polifenolnih jedinjenja i to: fenolnih kiselina (galna, protokatehinska, kafena, elaginska i kumarna), flavonola (kvercetin i kemferol), antocijana (najzastupljeniji su glikozidi pelargonidina) (Häkkinen i Törrönen, 2000; Lopes da Silva i sar., 2007; Pavlović i sar., 2013). Prema *United States Department of Agriculture (USDA, 2016)*, 100 g svežih jagoda sadrži 32 kcal; 90,95 g vode; 0,67 g proteina; 0,3 g ukupnih masti; 7,68 g ugljenih hidrata; 2 g vlakana; 58,8 mg vitamina C; 0,024 mg vitamin B1; 0,022 mg vitamina B2; 0,386 mg vitamina B3; 0,125 mg vitamina B5; 0,047 mg vitamina B6; 0,29 mg vitamina E; 153 mg kalijuma; 24 mg fosfora; 16 mg

kalcijuma; 13 mg magnezijuma; 1 mg natrijuma; 0,41 mg gvožđa; 0,386 mg mangana; 0,14 mg cinka; 0,048 mg bakra; 0,4 µg selena (USDA, 2016).

3.1.2. *Rubus idaeus* L. – crvena malina

Malina je žbunasta biljka sa višegodišnjim korenom i dugim, dvogodišnjim izdancima (slika 3.3). U sistematici biljaka zauzima sledeće mesto (Milivojević, 2018):

- Odeljak:** *Spermatophyta* (semenice)
- Pododeljak:** *Magnoliophytina* (*Angiospermae*, skrivenosemenice)
- Klasa:** *Magnoliatae* (*Dicotyledoneae*, dikotile)
- Potklasa:** *Rosidae* (*Rosiflorae*, ruže)
- Nadred:** *Rosanae* (ruže)
- Red:** *Rosales* (ruže)
- Familija:** *Rosaceae* (ruže)
- Potfamilija:** *Rosoideae* (jagodaste voćke)
- Rod:** *Rubus* (Tourn.) L. (malina i kupina)
- Podrodovi:** *Idaeobatus* W. O. Focke (malina)
Cylactis (arktička malina)
Anoplobatus (cvetna malina)

U svetu postoji više od 200 vrsta malina, od kojih je najznačajnija crvena malina (*Rubus idaeus* L.) Koren maline je višegodišnji i sastoji se od velikog broja vlaknastih, vegetativnih korenova, koji iz zemljišta apsorbuju vodu i u njoj rastvorene hranljive supstance. Koren biljci služi i za skladištenje aminokiselina, a učestvuje i u oksidoredukcionim procesima. Stablo maline raste u toku prve godine, dok se u drugoj godini u pazuhu listova razvijaju rodne grančice. Visina stabla može varirati od nekoliko desetina centimetara (kod dvorodnih sorti malina), do nekoliko metara (kod jednorodnih sorti). Nakon plodonošenja u drugoj godini, dolazi do sušenja izdanaka, koji se iz zasada uklanjaju.

Listovi maline su neparnoperasti, sa 3 ili 5 liski. Listovi su na stablu spiralno raspoređeni, čime je biljci omogućeno maksimalno iskorišćenje sunčeve svetlosti u procesu fotosinteze. Cvet maline je dvopolan i sastoji se od većeg broja prašnika i tučkova koji su okruženi sa pet belih kruničnih i pet zelenih čašičnih listića. Plod je zbirna koštunica, koja može biti žute, svetlocrvene, crvene, tamnocrvene ili crne boje. Karakteristike ploda zavise

od sorte maline, oprašivača, primenjenih agrotehničkih mera i spoljašnjih činilaca (Milivojević, 2018). Prema podacima za 2019. godinu, proizvodnja maline u svetu iznosi 822 493 tona, a najveći proizvođači su Rusija, Meksiko, Srbija, SAD i Poljska. Malina se u Srbiji gaji na površini od 23 249 ha, sa prinosom od 120 058 tona (FAOSTAT, 2019).



Slika 3.3. Dvogodišnji izdanci sa plodovima sorte maline Willamette u zasadu malina na obroncima Babičke gore (poljoprivredno gazdinstvo Ivanović)

Od polifenolnih jedinjenja, u malinama su prisutne hlorogenska, kafena, *p*-kumarna i elaginska kiselina; zatim rutin, miricetin, kvercetin i njegovi derivati (glukuronid, ramnozid, heksozid i ksilopiranozid), kemferol i njegovi derivati (heksozid, malonilheksozid i kumaroilheksozid); antocijani (zastupljeniji glikozidi cijanidina, a u manjoj meri glikozidi pelargonidina) (Ancos i sar., 1999; Pavlović i sar., 2013, Flores i Ruiz del Castillo, 2015). Prema United States Department of Agriculture (USDA, 2016), 100 g svežih malina sadrži 52 kcal, 85,75 g vode; 1,20 g proteina; 0,65 g ukupnih masti; 11,94 g ugljenih hidrata; 6,5 g vlakana; 26,2 mg vitamina C; 0,032 mg vitamin B1; 0,038 mg vitamina B2; 0,598 mg vitamina B3; 0,329 mg vitamina B5; 0,055 mg vitamina B6; 0,87 mg vitamina E; 151 mg kalijuma; 29 mg fosfora; 25 mg kalcijuma; 22 mg magnezijuma; 1 mg natrijuma; 0,69 mg gvožđa; 0,67 mg mangana; 0,42 mg cinka; 0,090 mg bakra; 0,2 µg selen (USDA, 2016).

3.1.3. *Rubus* L. – kupina

U sistematici biljaka kupine zauzimaju sledeće mesto (Milivojević, 2018):

- Odeljak:** *Spermatophyta* (semenice)
Pododeljak: *Magnoliophytina* (*Angiospermae*, skrivenosemenice)
Klasa: *Magnoliatae* (*Dicotyledoneae*, dikotile)
Potklasa: *Rosidae* (*Rosiflorae*, ruže)
Nadred: *Rosanae* (ruže)
Red: *Rosales* (ruže)
Familija: *Rosaceae* (ruže)
Potfamilija: *Rosoideae* (jagodaste voćke)
Rod: *Rubus* (Tourn.) L. (malina i kupina)
Podrodovi: *Eubatus*, *Caesii*, *Suberecti* i *Corylifolii* (kupine)



Slika 3.4. Zreli plodovi kupine

Kupine su višegodišnje, polužbunaste ili žbunaste biljke (slika 3.4), sa veoma razgranatim korenovim sistemom. Koren je žiličast i prodire u dubinu do 1 m. Stabla sa spiralno raspoređenim listovima obrazuju izdanke, koji rastu u toku prve vegetacije, a u drugoj godini donose plodove. Nakon berbe se izdanci suše i potrebno je ukloniti ih iz zasada kako ne bi usporavali rast novih, mladih izdanaka. Izdanci mogu dostići visinu od 2 do 4 metra, što zavisi od sorte i spoljašnjih uticaja. Listovi su neparno perasto složeni, sa 3 ili 5 liski na lisnoj dršci. Cvet je dvopolan i sastoji se od većeg broja prašnika i tučkova,

okruženih belim kruničnim i zelenim čašičnim listićima. Plod je zbirna koštunica, ljubičastocrne ili crne boje. (Milivojević, 2018).

Prema *Anketi* Republičkog zavoda za statistiku, kupina je u 2018. godini u Srbiji gajena na 5833 ha, a proizvedeno je 35 062 tone. Prosečan prinos po hektaru je oko 6 tona (*Anketa o strukturi poljoprivrednih gazdinstava*, 2018).

U kupinama je zabeleženo prisustvo fenolnih kiselina (galna, hlorogenska, protokatehinska i kafena), flavonola (kvercetin i kemferol), antocijana (glikozidi cijanidina) (Fang-Chiang i Wrolstad, 2005; Pavlović i sar., 2013). Prema *United States Department of Agriculture (USDA)*, 2016), 100 g svežih kupina sadrži 43 kcal, 88,15 g vode; 1,39 g proteina; 0,49 g ukupnih masti; 9,61 g ugljenih hidrata; 5,3 g vlakana; 21 mg vitamina C; 0,020 mg vitamin B1; 0,026 mg vitamina B2; 0,646 mg vitamina B3; 0,276 mg vitamina B5; 0,030 mg vitamina B6; 1,17 mg vitamina E; 162 mg kalijuma; 22 mg fosfora; 29 mg kalcijuma; 20 mg magnezijuma; 1 mg natrijuma; 0,62 mg gvožđa; 0,646 mg mangana; 0,53 mg cinka; 0,165 mg bakra; 0,4 µg selena (USDA, 2016).

3.1.4. *Vaccinium* L. – borovnica

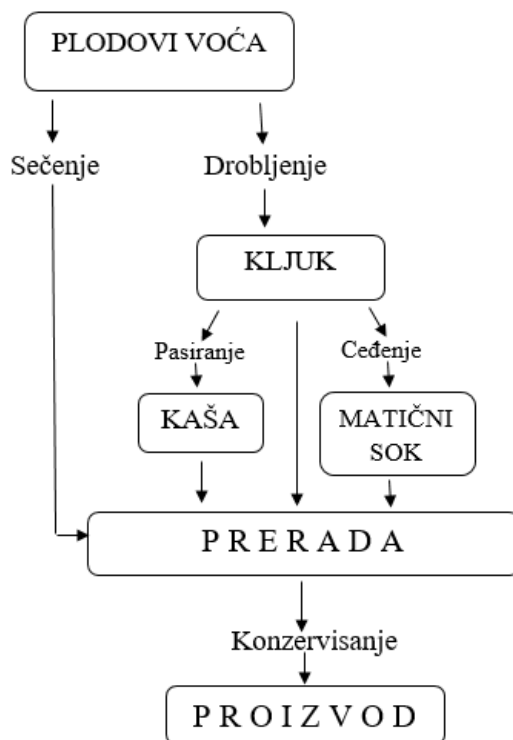
Rod *Vaccinium* L. obuhvata preko 400 vrsta (Galleta i Ballington, 1996). Borovnice su žbunaste, višegodišnje biljke, koje u sistematici biljaka zauzimaju sledeće mesto (Milivojević, 2018):

- Odeljak:** *Spermatophyta* (semenice)
- Pododeljak:** *Magnoliophytina* (*Angiospermae*, skrivenosemenice)
- Klasa:** *Magnoliatae* (*Dicotyledoneae*, dikotile)
- Potklasa:** *Dillaniidae*
- Nadred:** *Ericanae*
- Red:** *Ericales*
- Familija:** *Ericaceae*
- Potfamilija:** *Vacciniaceae* (borovnice)
- Rod:** *Vaccinium* L. (borovnica)
- Podrodovi:** *Cyanococcus* A. Gray, *Myrtillus* Dumort

Prema FAOSTAT podacima za 2019. godinu, u svetu je proizvedeno 823 328 tona borovnica, pri čemu su najveći proizvođači SAD, Kanada, Peru, Španija i Meksiko.

3.2. Prerada i konzervisanje voća

Da bi se obezbedila dostupnost voća van sezone, primenjuju se različite tehnološke operacije i vrši prerada u cilju dobijanja poluproizvoda ili gotovih proizvoda, kao i njihovo konzervisanje (slika 3.6). Glavni cilj konzervisanja je sprečavanje negativnih promena (kvarenja), uz što bolje očuvanje hranljive vrednosti polaznih sirovina (Zlatković, 2003).



Slika 3.6. Šema prerade voća (Zlatković, 2003)

Pravilnikom o kvalitetu voćnih džemova, želea, marmelade, pekmeza i zaslađenog kesten pirea (Službeni glasnik RS, 101/2015), definisani su zahtevi koji se odnose na kategorije i naziv proizvoda, kao i na fizička, hemijska i senzorska svojstva proizvoda dobijenih preradom voća: džema, ekstra džema, želea, ekstra želea, marmelade, žele marmelade, domaće marmelade, pekmeza i zaslađenog kesten pirea. Prilikom stavljanja u promet prethodno navedenih proizvoda, njihovi nazivi se moraju dopuniti nazivima upotrebljenog voća, po opadajućem redosledu, a u zavisnosti od mase sirovina.

Džemom se smatra proizvod odgovarajuće želirane konzistencije, proizveden od šećera, voćne pulpe ili voćne kaše (pirea) dobijene od jedne ili više vrsta voća i vode. Ekstra džem je proizvod odgovarajuće želirane konzistencije, proizveden od šećera, nekoncentrisane voćne pulpe jedne ili više vrsta voća i vode.

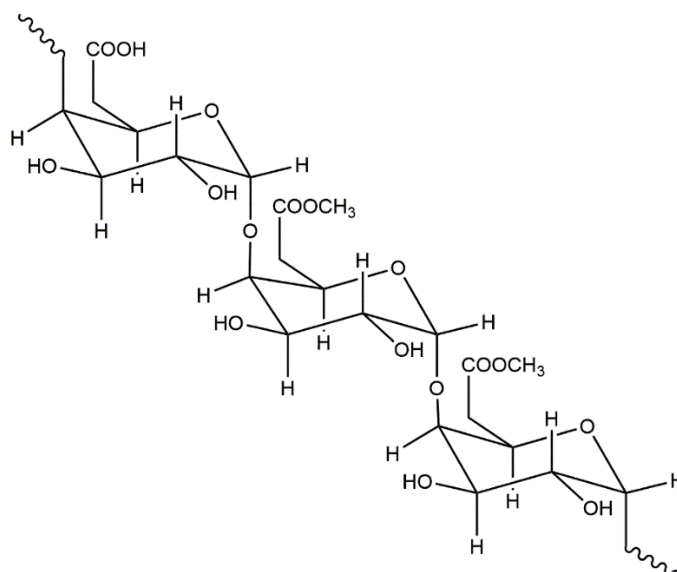
Žele i ekstra žele su proizvodi odgovarajuće želirane konzistencije, proizvedeni od voćnog soka ili vodenog ekstrakta voća i šećera, pri čemu količina voćnog soka ili vodenog ekstrakta upotrebljenog za proizvodnju 1000 g proizvoda, ne sme biti manja od količine propisane za proizvodnju džema, tj. ekstra džema. Količine soka/ekstrakta su izračunate nakon oduzimanja mase vode, koja je bila upotrebljena za proizvodnju vodenog ekstrakta.

Marmelada je proizvod odgovarajuće želirane konzistencije, dobijen od proizvoda od citrusnog voća (voćna pulpa, kaša, sok i kora), šećera i vode. Pri proizvodnji 1000 g marmelade, količina citrusnog voća ne sme biti manja od 200 g. Naziv „žele marmelada” se odnosi na proizvod koji, osim malih količina fino usitnjene kore, ne sadrži nerastvorljive sastojke. Domaća marmelada je proizvod odgovarajuće želirane konzistencije, proizveden od voćne kaše/pirea jedne ili više vrsta kontinentalnog voća, vode i šećera. Pekmez je proizvod odgovarajuće zgusnute konzistencije, proizveden ukuvavanjem voćne pulpe ili voćnog pirea, sa ili bez dodatka šećera, pri čemu količina dodatog šećera ne sme prelaziti 25% u odnosu na ukupnu količinu voća (*Pravilnik o kvalitetu voćnih džemova, želea, marmelade, pekmeza i zaslađenog kesten pirea, Službeni glasnik RS, 101/2015*).

Priprema džemova, pekmeza i marmelada predstavlja tradicionalni način čuvanja sezonskog voća. Prema *Baker i sar.*, (2005), osnovni sastojci u proizvodnji džema su voće, šećer, pektini i kiselina, pri čemu se, po želji, mogu dodavati začini, pufferi, konzervansi ili sredstva protiv penušanja.

Pektini su visokomolekularni polimeri, prisutni u biljkama, koji učestvuju u izgradnji ćelijskog zida. Osnova pektina se sastoji od monomera – molekula galakturonske kiseline, koji su povezani α (1→4) glikozidnom vezom (slika 3.7). Galakturonska kiselina može biti delimično ili potpuno esterifikovana metanolom, pa se tako razlikuju visoko esterifikovani pektini (stepen esterifikacije >50%) i nisko esterifikovani pektini (stepen esterifikacije <50%) (*Kazemi i sar.*, 2019). Pektini mogu sadržati različite šećere (arabinozu, ksilozu, ramnozu) (*Vanitha i Khan*, 2019).

Pod pojmom pektin podrazumeva se veći broj polimera koji se međusobno razlikuju po molekularnoj masi, konfiguraciji i stepenu polimerizacije. Molekulska masa pektina može biti veća od 200 000, što odgovara stepenu polimerizacije od preko 1000 monomera (*Flutto*, 2003). Stepenu esterifikacije i različite strukturne modifikacije određuju konačne funkcionalne osobine pektina (*Vanitha i Khan*, 2019).



Slika 3.7. Struktura pektina (Ali i sar., 2015)

Za dobijanje komercijalnih pektina koriste se kaša (eng. *pomace*) od jabuka ili od citrusnog voća. U prehrambenoj industriji, pektini se koriste kao emulgatori, zgušnjivači, gelirajući agensi i zamena za masti i šećer u namirnicama sa malo kalorija (Vanitha i Khan, 2019). Zahvaljujući gelirajućim svojstvima, pektini stabilizuju prehrambene proizvode, uz istovremeno postizanje željene teksture proizvoda (Schmidt i sar., 2015). Pektini se, kao dijetalna vlakna, ne mogu enzimski svariti u želucu i tankom crevu, već do njihove degradacije dolazi u debelom crevu, pod dejstvom crevne flore (Leclere i sar., 2013).

U tabeli 3.1. dat je pregled nekih od biljaka koje su korišćene kao sirovina za ekstrakciju pektina.

Tabela 3.1. Biljni izvori pektina

Biljna vrsta	Materijal	Sadržaj pektina (% suve materije)	Referenca
Mango	Kora	20,8	Sudhakar i Maini, 2000
Marakuja	Kora	2,25-14,60	Liew i sar., 2014
Pitaja	Kora	14,96-20,14	Ismail i sar., 2012
Krompir*	Pulpa/srž	4,08-14,34	Yang i sar., 2018
Plavi patlidžan	Kora	33,64	Kazemi i sar., 2019
Limun	Kaša (pomace) / ceo plod, bez soka	10,33-13,13	Azad i sar., 2014

Narandža	Kora	7,30-52,90	<i>Tiwari i sar.</i> , 2017
Banana	Kora	15,49-24,08	<i>Khamsucharit i sar.</i> , 2018
Batat	Kora	10,98-16,78	<i>Zaidel i sar.</i> , 2017
	Pulpa	18,05-74,43	<i>Zaidel i sar.</i> , 2015
Jabuka	Kaša od celih plodova	14,55-18,79	<i>Kumar i Chauhan</i> , 2010
Paradajz	Otpad nakon prerade svežeg paradajza	15,1-21,1	<i>Grassino i sar.</i> , 2016
Breskva	Kaša od celih plodova	2,22-12,40	<i>Pagán i Ibarz</i> , 1999
Suncokret	Glava suncokreta bez semenki	7,4-11,6	<i>Iglesias i Lozano</i> , 2004
Pomelo	Kora	16,07-16,74	<i>Roy i sar.</i> , 2017

*prikazani rezultat se odnosi na svežu materiju

Ispitano je dejstvo pektina izolovanog iz biljke *Linum grandiflorum* Desf. protiv parazitnog oboljenja šistosomijaze, koje se odlikuje krvarenjima, hepatotoksičnošću, nefrotoksičnošću, bolovima u abdomenu, nakupljanjem tečnosti u trbušnoj duplji. Laboratorijski miševi, koji su bili inficirani parazitom *Shistosoma mansoni*, tretirani su intraperitonealno pektinom. Zabeleženo je poboljšanje funkcije jetre i bubrega, kao i povećanje nivoa glukoze i glikogena u oštećenom tkivu jetre (*Ali i sar.*, 2015).

Osim hemijski nemodifikovanog pektina, medicinski značaj imaju pH modifikovani i termički modifikovani pektini. U istraživanjima na laboratorijskim pacovima, primećeno je smanjenje broja metastaza u plućima kod mužjaka koji su imali rak prostate, nakon oralne primene pH modifikovanih citrusnih pektina, pri čemu smanjenje zavisi od doze pektina (*Pienta i sar.*, 1995). Pektini izolovani iz jabuka i citrusa smanjuju kancerogenezu raka debelog creva kod pacova koji su bili izloženi dejstvu azoksimetana, putem smanjenja aktivnosti enzima β -glikuronidaze, enzima fekalnih bakterija, čija je aktivnost dovedena u vezu sa razvojem raka debelog creva (*Ohkami i sar.*, 1995). Oralno primenjeni pektini smanjuju rizik od intestinalnih infekcija i dijareje kod dece, favorizujući rast „dobrih“ bakterija u debelom crevu (*Lactobacillus* i *Bifidobacteria*) (*Olano-Martin i sar.*, 2002).

3.3. Elementi - podela, nalaženje i uloga u ljudskoj ishrani

Pojmovi element i mineral se često naizmenično koriste, ali treba ukazati na razliku. Elementi su čiste supstance, sačinjene od samo jedne vrste atoma, koje se hemijskim reakcijama ne mogu razložiti na jednostavnije komponente, pri čemu je svaka pojedinačna vrsta atoma definisana atomskim brojem. Minerali su čvrste, neorganske, kristalne supstance, sačinjene od većeg broja elemenata. Postoje i minerali sačinjeni od samo jednog elementa poput dijamanta (ugljenik) ili elementarnog zlata.

Na osnovu zastupljenosti, *Lippert (2020)* je izvršio podelu elemenata na:

- makroelemente, prisutne u velikim koncentracijama;
- mikroelemente, prisutne u malim koncentracijama i
- elemente prisutne u tragovima (*Lippert, 2020*).

Makroelementi (Na, K, P, Ca i Cl) su neophodni za život jer učestvuju u velikom broju fizioloških procesa u organizmu. Unose se u telo u obliku soli, dok svoju ulogu ispoljavaju u obliku jona (*Lippert, 2020*). U tabeli 3.2 prikazani su izvori makroelemenata u ishrani, oblik aktivnog jona/jedinjenja, kao i fiziološka funkcija koju obavljaju.

Tabela 3.2. Makroelementi u ishrani i njihov fiziološki značaj (*Lippert, 2020*)

Makroelement	Fiziološka uloga	Jon/jedinjenje od značaja ili suplement	Izvor
Kalcijum, Ca	Učestvuje u izgradnji kostiju i zuba, ćelijskoj signalizaciji, vaskularnoj dilataciji, funkcionisanju mišića, neuralnoj transmisiji (<i>L'Abbe, 2003; U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2011</i>)	Ca ²⁺ , kompleksi Ca-proteini, Ca-citrat, Ca-fosfati, Ca-laktat, Ca-karbonat	Mleko i mlečni proizvodi, povrće, mahunarke, jaja, meso, riba
Kalijum, K	Glavni katjon intracelularne tečnosti, osmotski aktivan, esencijalan za nervni, kardiovaskularni, mišićni, respiratorni, digestivni i bubrežni trakt (<i>Navarro i Vaguero, 2003</i>)	K ⁺ , KHCO ₃ , KCl	Voće, povrće, mahunarke, riba, meso, mleko i mlečni proizvodi
Natrijum, Na	Glavni katjon ekstracelularne tečnosti, osmotski aktivan, utiče na osmotsku ravnotežu između intracelularne i ekstracelularne tečnosti (<i>Michell, 2003</i>)	Na ⁺ , NaHCO ₃ , NaCl	Kuhinjska so, industrijske namirnice
Fosfor, P	Učestvuje u izgradnji kostiju i zuba, ćelijskoj signalizaciji,	PO ₄ ³⁻ , organofosforna	Meso, hrana bogata proteinima,

	regulaciji sinteze proteina, nukleinskih kiselina, fosfolipida, izvor energije (ATP-adenozin-3-fosfat) (<i>Anderson, 2003; Goretti Penido i Alon, 2012</i>)	jedinjenja, neorganski fosfati: Na_3PO_4 , K_3PO_4 , polifosfati	mleko i mlečni proizvodi
Hlor, Cl	Glavni anjon ekstracelularne tečnosti, učestvuje u regulaciji osmotskog pritiska, acido-bazne ravnoteže i hidratacije (<i>Stahl-Peke i Hesecker, 2014</i>)	Cl^- , KCl, NaCl	Kuhinjska so, povrće, industrijske namirnice

Mikroelemenata, poput gvožđa, ima u mnogo manjoj koncentraciji i potreban dnevni unos ovih elemenata je reda veličine nekoliko miligrama po danu (*Lynch i Duckworth, 2020*). Prema *Svetskoj zdravstvenoj organizaciji* (1996) (eng. *World Health Organization - WHO*), elementi u tragovima su, na osnovu fiziološke uloge, podeljeni na:

- esencijalne (hrom, molibden, bakar, jod, gvožđe, selen, kobalt, cink);
- verovatno esencijalne (molibden, silicijum, nikl, bor, vanadijum) i
- neesencijalne elemente, koji mogu ispoljiti toksični efekat (fluor, olovo, kadmijum, živa, aluminijum, litijum, arsen, kalaj).

Svi ovi elementi u organizam dospevaju putem lanca ishrane, tj. preko namirnica biljnog i životinjskog porekla, zatim putem vode i vazduha.

3.3.1. Bioakumulacija elemenata putem zemljišta i vode

Bioakumulacija predstavlja nagomilavanje različitih hemijskih vrsta (teških metala, pesticida) u tkivima živog sveta. Teški metali su sastavni deo Zemljine kore. Na kontaminaciju voća i povrća teškim metalima može uticati više faktora: zagađena zemljišta i vode za navodnjavanje, primena fertilizera i pesticida koji sadrže teške metale, industrijska emisija i potonja depozicija čestica teških metala iz vazduha na plantažama, transport, proces ubiranja plodova, način skladištenja, kao i mesta distribucije do krajnjih potrošača (*Maleki i Zarasvand, 2008*). Biljke usvajaju esencijalne i neesencijalne elemente iz zemljišta u zavisnosti od koncentracionog gradijenta, koji je pak, uslovljen selektivnim usvajanjem jona od strane korenovog sistema i difuzijom jona kroz zemljište. Nivo akumulacije elemenata je različit, u zavisnosti od biljne vrste (*Huang i Cunningham, 1996*). U skladu s tim, biljke su podeljene u tri grupe (*Baker, 1981*):

- *ekskluderi* (biljke koje rastu na zagađenom zemljištu, ali u izdancima zadržavaju nisku koncentraciju metala, sve do granične koncentracije metala u zemljištu, kada može doći do određenog transporta metala preko korenovog sistema do izdanaka);
- *akumulatori* (kod ovih biljaka dolazi do akumulacije metala u nadzemnom delu biljke) i
- *indikator* (kod ovih biljaka su usvajanje metala i transport do izdanaka regulisani tako da koncentracija metala u biljci odražava koncentraciju metala u zemljištu na kome je biljka gajena).

Za sistem zemljište-biljka, definisan je prag nutritivne toksičnosti teških metala, koji predstavlja najveću dozvoljenu koncentraciju teških metala u zemljištu (ukupnu ili biodostupnu koncentraciju), a koja neće rezultovati fitotoksičnim efektom ili akumulacijom metala u jestivim delovima biljke, iznad granica koje su propisane zdravstvenim standardima (*Islam i sar.*, 2007). Na prag nutritivne toksičnosti utiču brojni faktori: vrsta zemljišta, pH zemljišnog rastvora, sadržaj organskih materija, minerali gline, biohemijske karakteristike zemljišta, kao i tendencija biljaka ka akumuliranju teških metala u biljnim tkivima, što je uslovljeno genetskim faktorima same biljne vrste. Takođe, prisustvo mikroorganizama koji se razvijaju na korenovim sistemima različitih biljnih vrsta i zemljišta ima važnu ulogu u transportu teških metala iz zemljišta do jestivih delova biljaka (*Islam i sar.*, 2007).

U vodenim sistemima, prisutne količine metalnih jona zavise od ambijentalne distribucije, vremenskih činilaca i izluživanja elemenata iz zemljišta u same vodene recipijente (*Mansour*, 2014). Hemijske karakteristike vode (pH vrednost, količina prisutne organske materije), takođe su od izuzetne važnosti za predviđanje i određivanje potencijalnih interakcija jona teških metala sa prisutnim jedinjenjima u rekama i jezerima (*Mannio i sar.*, 1995; *Skjelkvåle i sar.*, 2001). Teški metali u vodenim basenima bivaju adsorbovani na sedimentima, odakle postepeno mogu migrirati, usled izmene jona između vode, sedimenata i živog sveta kroz različite hemijske i biološke procese (*Mansour*, 2014).

Kako je čovek na vrhu lanca ishrane, jasno je da postoji realna opasnost od prekomernog unošenja teških metala putem hrane biljnog porekla koja je gajena na zagađenom zemljištu. Takođe, kod životinja koje se hrane takvim biljkama, dolazi do akumulacije teških metala u tkivima.

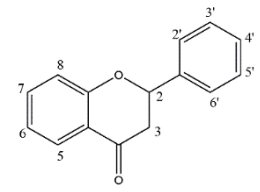
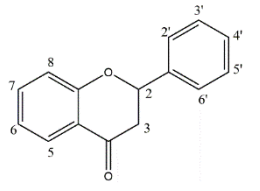
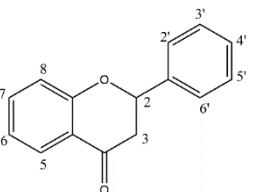
3.4. Polifenolna jedinjenja

Polifenolna jedinjenja su organska jedinjenja koja sadrže jednu ili više hidroksilnih grupa vezanih za fenolni prsten. Prisutna su u voću, povrću, cveću, kori drveća i dr. Polifenolna jedinjenja su izuzetno raznolika grupa jedinjenja i obuhvataju nekoliko klasa – od najjednostavnijih, poput fenolnih kiselina i stilbena, do kompleksnih polimernih molekula, poput tanina (*Tsao, 2010*). Sastav polifenolnih jedinjenja u biljkama je veoma promenljiv, kako u kvantitativnom, tako i u kvalitativnom smislu. Određena jedinjenja su široko rasprostranjena u biljnom svetu (proantocijanidini, antocijani), dok su neka jedinjenja karakteristična samo za određenu biljnu vrstu (izoflavoni u mahunarkama) (*Belščak-Cvitanović i sar., 2018*). Prisustvo polifenolnih jedinjenja utiče na senzorna i nutritivna svojstva namirnica koja sadrže biljne komponente. Biljni pigmenti, antocijani i karoteni (crveni, plavi, ljubičasti, narandžasti), nalaze se u laticama cveća i plodovima biljaka. Prirodna polifenolna jedinjenja vanilin i eugenol, izuzetno su intenzivnog i privlačnog mirisa. Od polifenola potiče gorka percepcija ukusa, kao i adstrigensni osećaj u ustima, što je prvenstveno izazvano prisustvom proantocijanidina i kondenzovanih tanina (*Lesschaeve i Noble, 2005*).

Polifenolna jedinjenja imaju veoma važnu ulogu u privlačenju oprašivača, kao i u odbrambenim mehanizmima biljaka protiv delovanja virusa, bakterija, gljivica i biljojeda. Biosinteza polifenolnih jedinjenja počinje od šikimske kiseline, i teče preko aromatičnih aminokiselina tirozina ili fenilalanina (*Cutrim i Cortez, 2018*).

Polifenolna jedinjenja su efikasni antioksidanti koji neutrališu slobodne radikale doniranjem elektrona ili vodonikovih atoma. Mehanizmi antioksidativnog dejstva polifenolnih jedinjenja zasnivaju se na direktnom „hvatanju“ slobodnih radikala, helatiranju jona metala koji učestvuju u formiranju slobodnih radikala i inhibiciji enzima potrebnih za nastanak slobodnih radikala (*Belščak-Cvitanović i sar., 2018*). Na osnovu hemijske strukture, polifenolna jedinjenja mogu biti podeljena u 3 velike klase: flavonoide, stilbene i fenolne kiseline (tabela 3.3) (*Papuc i sar., 2017*).

Tabela 3.3. Polifenolna jedinjenja – klase, potklase i izvori (prilagođeno iz *Papuc i sar.*, 2017)

Klasa, potklasa i osnovna struktura	Primer	Položaj hidroksilnih grupa/ supstituisanih hidroksilnih grupa/drugih supstituenata												Izvor	Referenca
1. FLAVONOIDI															
Flavoni 	Luteolin	H	H	-	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Endivija, lucerka, cvet indijske trube, bajkalska kapica	<i>Chen i sar.</i> , 2003; <i>El-Shafey i Abdelgawad</i> , 2012; <i>Mishima i sar.</i> , 2015; <i>Zhao i sar.</i> , 2016
	Apigenin	H	H	-	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H		
	Hrizin	H	H	-	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H		
	Baikalein	H	H	-	OH	OH	OH	H	H	H	H	H	H		
Flavanoni 	Hesperetin	H	H	-	OH	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	H	Kora grejpfruta i citrusa	<i>Mullen i sar.</i> , 2008
	Narigenin	H	H	-	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H		
Flavonoli 	Kvercetin	H	OH	-	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Propolis, med, kamilica, lipa, Gingko biloba, eukaliptus	<i>Chan i sar.</i> , 2007; <i>Şanlı i Lunte</i> , 2014;
	Kemferol	H	OH	-	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H		
	Galangin	H	OH	-	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H		
	Fisetin	H	OH	-	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	H		
	Miricetin	H	OH	-	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H		
	Morin	H	OH	-	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	H		
	Hiperozid	H	O-Gal	-	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H		
	Heliozin	H	O-diGal	-	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H		

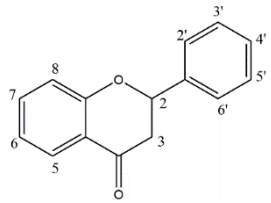
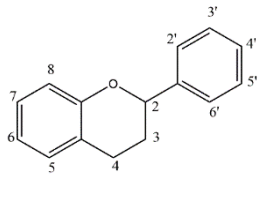
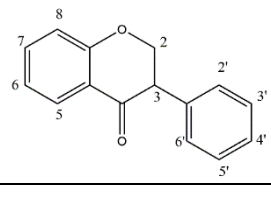
Flavanonoli 	Taksifolin	H	OH	-	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Dahurski ariš, kinesko drvo laka	Kim i sar., 2010; Liu i sar., 2014;
	Fustin	H	OH	-	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	H		
Flavan-3-oli 	Monomeri													Zeleni i crni čaj, kakao	Subhashini i sar., 2010; Gadkari i Balaraman, 2015;
	(+)-Katehin	H	βOH	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H		
	(-)-Epikatehin	H	αOH	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H		
	(-)-Epigalokatehin	H	αOH	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H		
	(-)-Epikatehin-3-galat	H	αO-Galat	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H		
	(-)-Epigalokatehin-3-galat	H	αO-Galat	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H		
Polimeri Proantocijanidini (kondenzovani tanini)	Proizvod oksidativne kondenzacije monomernih (flavan-3-ol) jedinica između C4 i C6 ili C8 atoma												Drvenaste biljke, voće, vino, pivo		
Izoflavoni 	Genistein	H	H	-	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	Soja, crvena detelina	Kuligowski i sar., 2017; Kim i sar., 2012;
	Genistin	H	H	-	OH	H	OGL	H	H	H	OH	H	H		
	Daidzein	H	H	-	H	H	OH	H	H	H	OH	H	H		
	Daidzin	H	H	-	H	H	OGL	H	H	H	OH	H	H		
	Biohanin A	H	H	-	OH	H	OH	H	H	H	OCH ₃	H	H		
	Formononetin	H	H	-	H	H	OH	H	H	H	OCH ₃	H	H		

Tabela 3.3. Nastavak

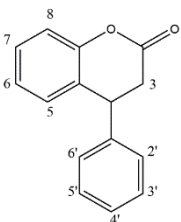
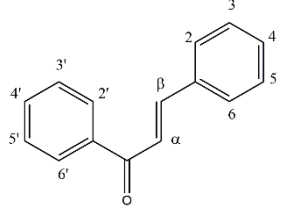
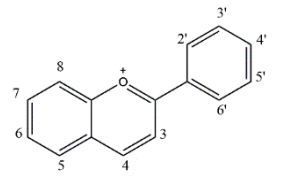
Neoflavonoidi (4-fenilkumarini) 	Dalbergin	-	H	H	H	OH	OCH ₃	H	H	H	H	H	H	Široko rasprostranjeni u biljnom svetu	Garazd i sar., 2003
	Kalofilolid	Kompleksna struktura													
	Inofilumi B, P, G, F	Kompleksna struktura													
Halkoni 	Izolikvirigenin	H	H	OH	H	H	α H	β H	OH	H	OH	H	H	Jabuke, cveće, hmelj, pivo	Suwito i sar., 2014
	Flavokavain A	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃		
	Flavokavain B	H	H	H	H	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃		
	Flavokavain C	H	H	OH	H	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃		
	Gimnoramen	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	OH		
Antocijanidini 	Cijanidin	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	Crvene i plave latice cveća, voće i povrće	Khoo i sar., 2017; Mattioli i sar., 2020
	Pelargonidin	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H		
	Peonidin	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	OH	H	H		
	Delfinidin	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H		
	Petunidin	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OCH ₃	H		
	Malvidin	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H		

Tabela 3.3. Nastavak

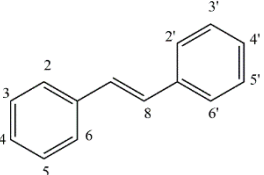
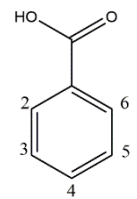
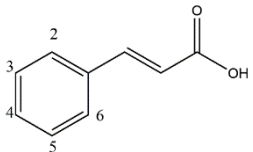
2. STILBENOIDI															
Stilbenoidi 	<i>trans</i> -Resveratrol	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	OH	H	H	Crveno grožđe, vino, borovnice, kikiriki, crna čokolada, sirak, gungo grašak	Zhang <i>i sar.</i> , 2012; Counet <i>i sar.</i> , 2006
	<i>trans</i> -Piceatanol	H	OH	OH	H	H	H	H	H	OH	H	OH	H		
	<i>trans</i> -Piceid	H	Ogl	H	OH	H	H	H	H	H	OH	H	H		
	<i>trans</i> -Pterostilben	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	OH	H	H		
	Cajanoton	C ₅ H ₉	OCH ₃	H	OH	H	H	OH	H	H	H	H	-		
	Cajanamid	C ₅ H ₉	OCH ₃	H	OH	CO	NH	H	H	H	H	H	H		
3. FENOLNE KISELINE															
Benzoeve kiseline 	Monomeri													Voće i povrće	Manach <i>i sar.</i> , 2004
	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	H	H	OH	H	H	-	-	-	-	-	-	-		
	Galna kiselina	H	OH	OH	OH	H	-	-	-	-	-	-	-		
	Protokatehinska kiselina	H	OH	OH	H	H	-	-	-	-	-	-	-		
	Elaginska kiselina	Dilakton galne kiseline												Kineska rabarbara	Jourdes <i>i sar.</i> , 2013
Polimeri Hidrolizabilni tanini (galotnini i elagitanini)	Derivati galne ili elaginske kiseline														

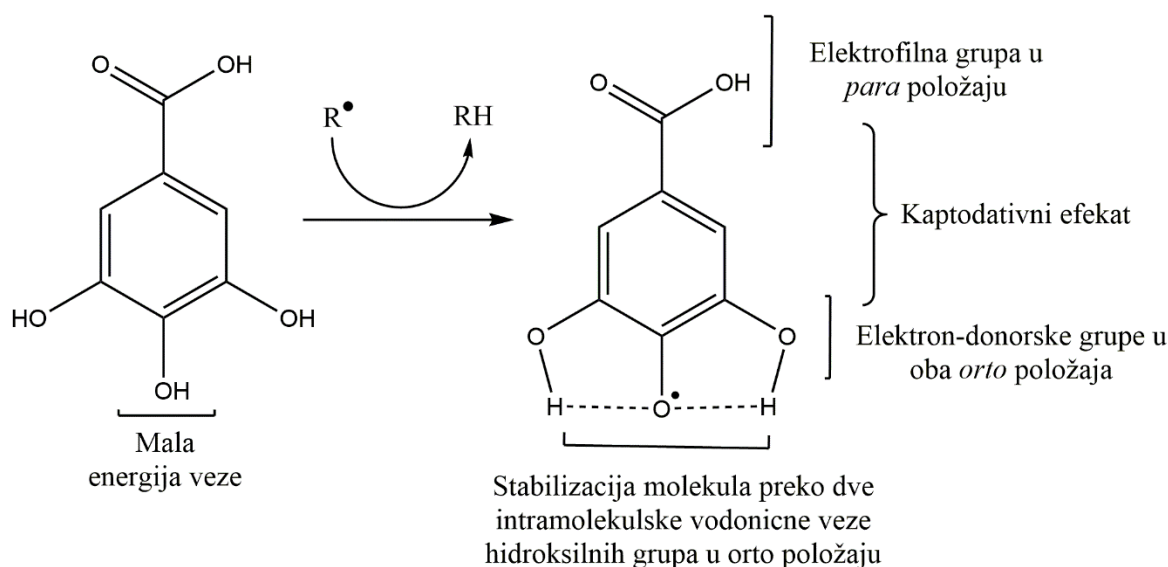
Tabela 3.3. Nastavak

Hidroksicimetne kiseline 	Kafena kiselina	H	OH	OH	H	H	-	-	-	-	-	-	-	Voće i povrće, kafa	Guzman, 2014	
	<i>p</i> -Kumarna kiselina	H	H	OH	H	H	-	-	-	-	-	-	-			-
	Ferulna kiselina	H	OCH ₃	OH	H	H	-	-	-	-	-	-	-			
	Sinapinska kiselina	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Kurkumin	Proizvod kondenzacije dva molekula ferulne kiseine preko metil-grupe												Kurkuma	Gupta i sar., 2013	
	Hlorogenske kiseline Kafeoilferuloilhininske kiseline	Estri hidroksicimetnih kiselina sa hininskom kiselinom Estri kafene i ferulne kiselina sa hininskom kiselinom												Voće, kafa, hibiskus	Liang i Kitts, 2016; Tajik i sar., 2017;	

3.4.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su derivati benzoeve ili cimetine kiseline. U voću i povrću, hidoksibenzoeve kiseline su zastupljene u malim količinama, naročito u slobodnom obliku. Crna rotkva i crni luk su važan izvor slobodnih hidoksibenzoevih kiselina. U žitaricama i semenju biljaka, hidoksibenzoeve kiseline su u obliku estara. Polimeri hidoksibenzoevih kiselina su hidrolizabilni tanini (galotanini u mangu i elagitanini u jagodama, malinama i kupinama) (Clifford i Scalbert, 2000).

Lišće čajevca sadrži značajne količine galne kiseline (Manach i sar., 2004), koja je efikasan antioksidant. Vrsta, broj i raspored supstituenata određuju antioksidativne osobine svih polifenolnih jedinjenja. Kvantni proračuni su pokazali da su u molekulu galne kiseline, tri hidroksilne grupe koplanarne, dok je karboksilna grupa pozicionirana od ravni benzenovog prstena (Mohammed-Ziegler i Billes, 2002). Dve intramolekulske vodonične veze između tri hidroksilne grupe doprinose stabilizaciji molekula. Prilikom formiranja anjona ili anjon-radikalnih vrsta, elektronski oblak je delokalizovan preko benzenovog prstena i kiseonikovih atoma, što rezultuje snažnijim intramolekulskim vodoničnim vezama (slika 3.8). Ulogu u stabilizaciji radikala ima i kaptodativni efekat, koji se odlikuje sinergističkim delovanjem elektrofilne karboksilne grupe u *para* položaju i elektron-donorskih hidroksilnih grupa u *orto* položajima u odnosu na hidroksilnu grupu koja je donor vodonika (Leopoldini i sar., 2004).



Slika 3.8. Faktori koji utiču na efikasnost molekula galne kiseline kao antioksidanta

Istraživanja derivata galne kiseline su pokazala da konformeri njenih estara imaju planarnu geometriju. Uzrok tome je stabilizirajući efekat delokalizacije π elektronskog oblaka između benzenovog prstena i karbonilne grupe, što je favorizovno kada leže u istoj ravni (Fiuza i sar., 2004).

Za razliku od hidroksibenzoevih kiselina, hidroksicimetne kiseline su dosta zastupljenije u biljnom svetu. Mogu se naći u svim delovima biljaka, mada su najveće koncentracije detektovane u spoljnim delovima zrelih voćaka. Njihova količina se smanjuje u toku zrenja, ali i povećava sa povećanjem veličine ploda (Manach i sar., 2004). Kafena, ferulna, sinapinska i kumarna kiselina se retko mogu naći u slobodnom obliku, osim u prerađenim namirnicama, koje su podlegle fermentaciji, zamrzavanju ili sterilizaciji. Hidroksicimetne kiseline su prisutne u obliku glikozilovanih derivata ili estara sa hininskom, šikiminskom i vinskom kiselinom. Estar kafene i hiniske kiseline je hlorogenska kiselina, koja je u velikim koncentracijama prisutna u kafi (Clifford, 1999).

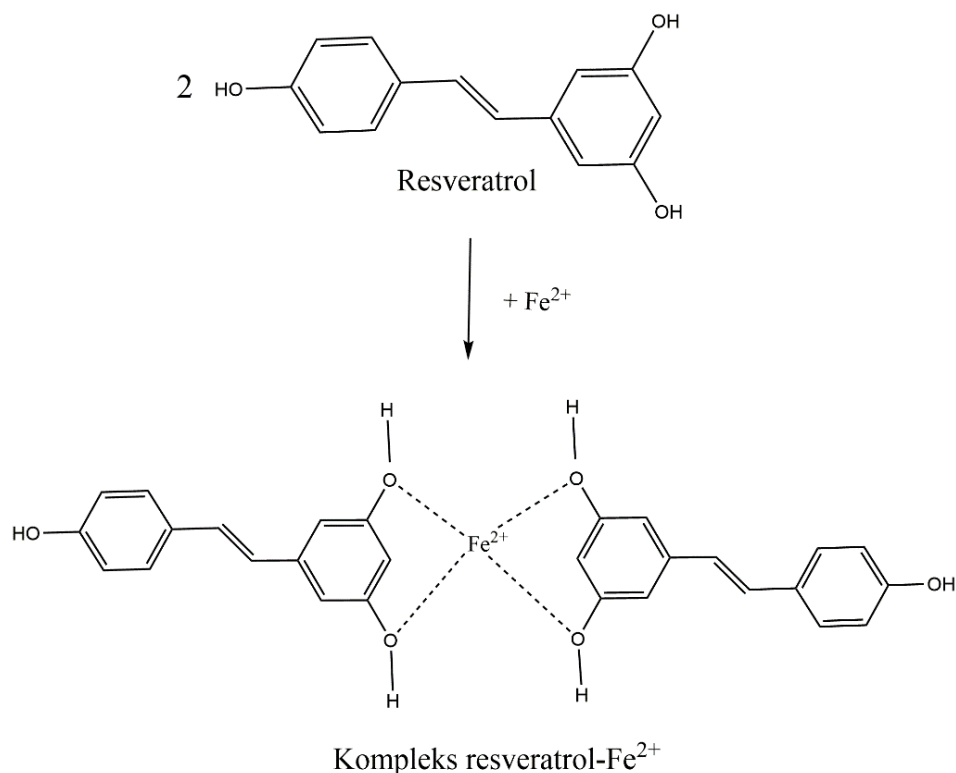
Kafena kiselina, kako slobodna, tako i esterifikovana, najzastupljenija je fenolna kiselina i predstavlja 75-100% ukupnih hidroksicimetnih kiselina u većini vrsta voća. Ferulna kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u zrnlju žitarica, skoncentrisana u spoljnim slojevima zrna. Perikarp može sadržati i do 98% ukupne količine ferulne kiseline, koja je esterifikovana arabinoksilanima (Manach i sar., 2004).

Elaginska kiselina je lakton galne kiseline. Prisutna je u biljkama u obliku hidrolizabilnih tanina – elagitanina, kao strukturna komponenta ćelijskog zida i ćelijske membrane. Elagitanini su estri glukoze sa elaginskom kiselinom koji, kada hidrolizuju, daju elaginsku kiselinu. Pokazalo se da je elaginska kiselina moćno antikancerogeno sredstvo, a jedan od glavnih mehanizama antikancerogenog dejstva je modifikacija metabolizma toksina iz životne sredine u organizmu (Vattem i Shetty, 2005). Nakon oralne primene, elaginska kiselina je pokazala hepatoprotektivnu funkciju protiv dejstva ugljen-tetrahlorida u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Singh i sar., 1999).

3.4.2. Stilbenoidi

Stilbenoidi su hidroksilovani derivati stilbena. Postoje u obliku monomera, oligomera i polimera. Glavni predstavnik ove grupe neflavonoidnih polifenolnih jedinjenja je 3, 4', 5-trihidroksistilben – resveratrol, koji ispoljava antioksidativno, antitumorsko i antibakterijsko dejstvo, a zastupljen je u crvenom vinu, kakaou, grožđu (Papuc i sar. 2017).

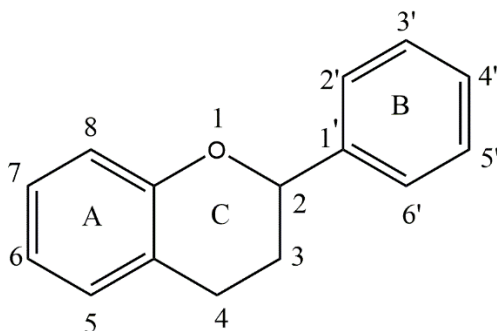
Značajna je i uloga resveratrola kao helatnog agensa u vezivanju jona metala u biološkim sistemima, jer se na taj način smanjuje raspoloživa koncentracija metala koji u reakcijama lipidne peroksidacije učestvuju kao katalizatori. Resveratrol može helatirati Fe^{2+} jon svojim dvema hidroksilnim grupama, pri čemu se formiraju četiri koordinativne veze (slika 3.9) (Gülçin, 2010).



Slika 3.9. Helatizacija jona Fe^{2+} resveratrolom

3.4.3. Flavonoidi

Osnovnu hemijsku strukturu flavonoida predstavlja difenil-propan, koga čini 15 C atoma (slika 3.10). Pritom, dva benzenova prstena (A i B) međusobno su povezani sa 3 C atoma, koji mogu sačinjavati treći prsten (C), ali ne u svim slučajevima (izuzetak su halkoni). Najzastupljenija su flavonoidna jedinjenja kod kojih je benzenov prsten A kondenzovan sa heterocikličnim piranskim prstenom, a benzenov prsten B je u položaju 2 ili 4 (Karak, 2019). Različite klase flavonoida se razlikuju po stepenu oksidacije i supstituciji na piranskom C prstenu, dok se pojedinačna jedinjenja unutar samih klasa razlikuju po vrsti i položaju supstituenata na prstenovima A i B (Kumar i Pandey, 2013).



Slika 3.10. Osnovna struktura flavonoida

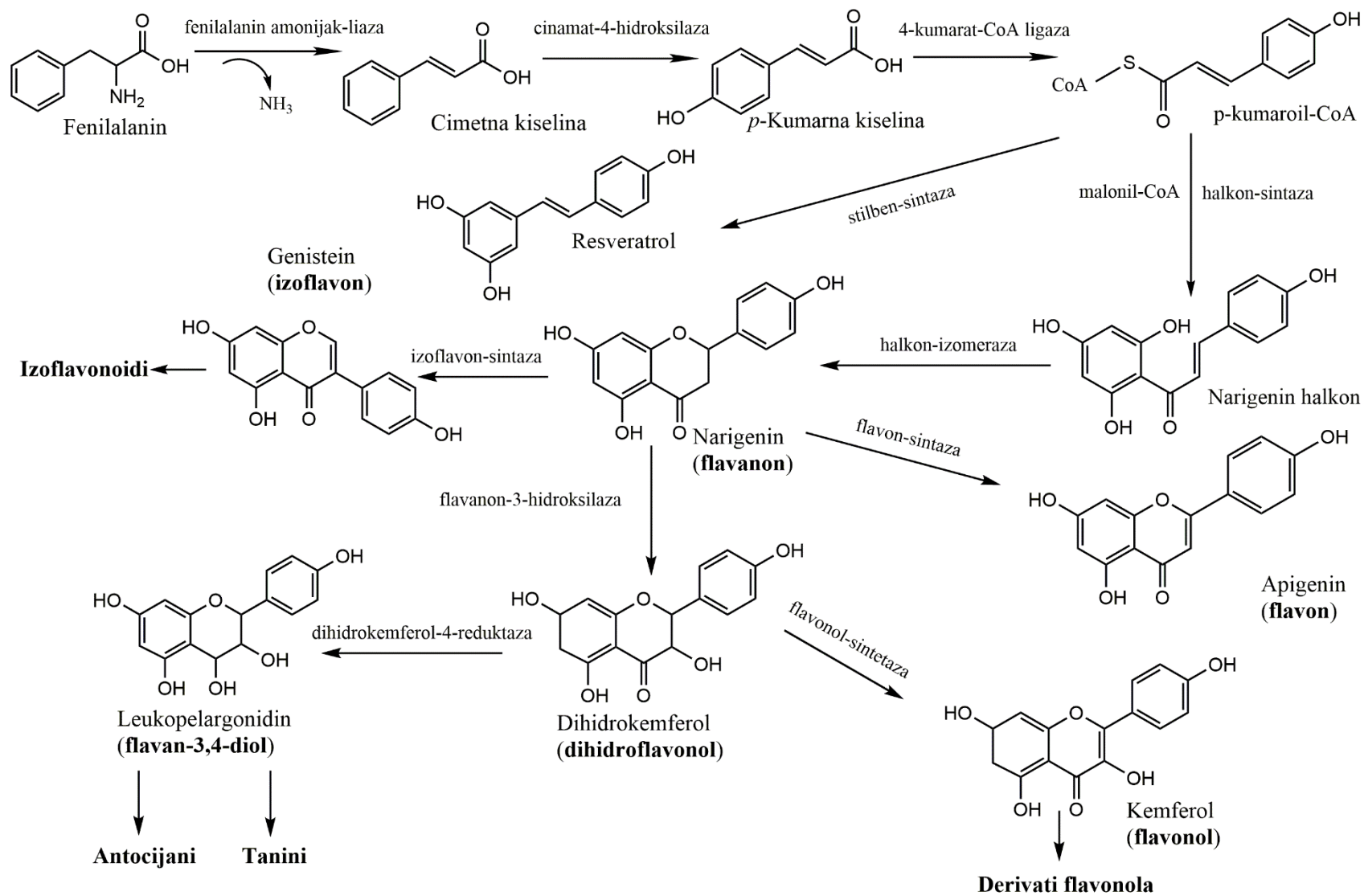
Flavonoidi su sekundarni metaboliti, prisutni u svim delovima biljaka, a naročito u ćelijama sa intenzivnom fotosintetičkom aktivnošću (Kumar i Pandey, 2013). Biosinteza flavonoida započinje od aminokiseline fenilalanina i protiče uz učešće brojnih enzima, do sinteze flavonona (naringenin). Flavononi su ključni intermedijeri u biosintezi flavonoida, iz kojih dalje nastaju specifična polifenolna jedinjenja (slika 3.11) (Horinouchi, 2008).

Flavonoidi su u biljkama zastupljeni u obliku aglikona, glikozida i metilovanih derivata. Osnovna struktura flavonoida, predstavljena na slici 3.10. predstavlja aglikon. Flavonoidi su hidroksilovani najčešće u položajima 3, 5, 7, 2', 3', 4' i 5'. Pri formiranju glikozida, glikozidna veza je obično u položajima 3 ili 7, a ugljeni hidrati su najčešće D-glukoza, L-ramnoza, glukoramnoza, galaktoza, arabinoza (Kumar i Pandey, 2013). Takođe, flavonoidi mogu formirati komplekse sa oligosaharidima, mastima, aminima i organskim kiselinama (Duthie i sar., 2003).

Spektroskopska ispitivanja flavonoida olakšala su spektralnu karakterizaciju potklasa. Tako je nađeno da flavoni i flavonoli imaju dve intenzivne apsorpcione trake: traka I (cinamoil traka, 320-385 nm) potiče od apsorpcije zračenja na B prstenu, dok traka II (benzoil traka, 250-285 nm) potiče od apsorpcije zračenja od strane A prstena. Prisustvo funkcionalnih grupa može uzrokovati pomeranje apsorpcionih traka u spektru. Tako prisustvo dodatnih hidroksilnih grupa dovodi do batohromnog pomeranja apsorpcionog maksimuma trake I na 367 nm kod kemferola (hidroksilne grupe u položajima 3,5,7,4'), na 371 nm kod kvercetina (hidroksilne grupe u položajima 3,5,7,3',4') i na 374 nm kod miricetina (hidroksilne grupe u položajima 3,5,7,3',4',5'). Odsustvo hidroksilne grupe u položaju 3 kod flavona, razlikuje ih od flavonola i rezultuje hipsokromnim pomeranjem apsorpcionog maksimuma za 20-30 nm. Tako se, na primer kod apigenina, traka I javlja na kraćim talasnim dužinama (337 nm). U apsorpcionom spektru flavonona se uočava veoma intenzivna traka II, između 270 i 295 nm. Kod naringenina je maksimum apsorpcije na 288 nm, a kod taksifolina na 285 nm, pri čemu se za traku I uočavaju pikovi malog intenziteta

na 326 nm, odnosno 327 nm. U jedinjenjima sa monosupstituisanim B prstenom, traka II se javlja kao jedan pik na oko 270 nm, dok se kod di-, tri- i *o*-supstituisanog B prstena, javlja u obliku dva pika, višeg na 258 nm i nižeg na 272 nm. Kod antocijana je prepoznatljiva traka I na 450-560 nm i traka II na 240-280 nm, pa se u zavisnosti od broja i položaja hidroksilnih grupa, razlikuje i boja pojedinačnih antocijana (*Wollenweber i Dietz, 1981*).

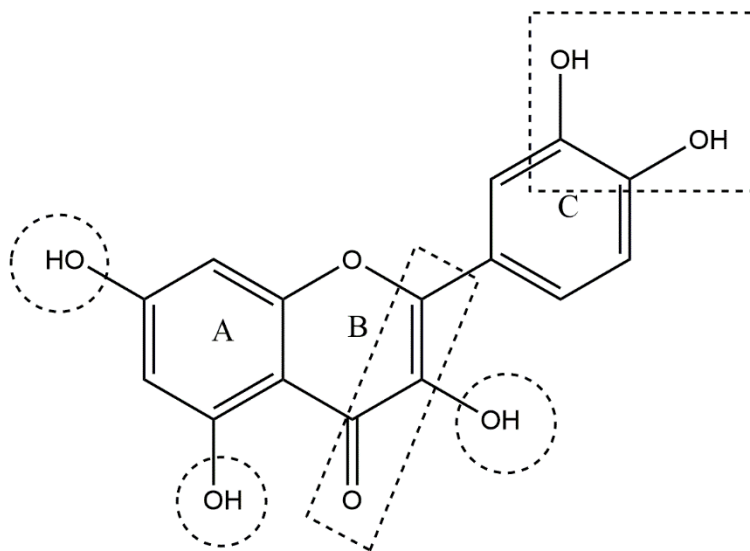
Flavonoidi doprinose zdravlju ljudi, smanjujući rizik od nastanka brojnih bolesti (*Kumar i Pandey, 2013*). Smatra se da oksidativne modifikacije LDL holesterola (eng. *low density cholesterol*) imaju ključnu ulogu u nastanku ateroskleroze. Izoflavan glabridin, izolovan iz biljke sladić (*Glycyrrhiza glabra, Fabaceae*), inhibira oksidaciju LDL holesterola hvatanjem slobodnih radikala (*Fuhrman, 1997*). Flavonoidi iz bobičastog voća imaju pozitivan efekat u borbi protiv Parkinsonove bolesti i pomažu u poboljšanju pamćenja kod starijih osoba. Unos flavonoidnih antioksidanata povezan je sa smanjenjem rizika od nastanka demencije (*Commenges i sar., 2000*).



Slika 3.11. Biosinteza flavonoida u biljkama (Horinouchi, 2008)

Antioksidativna aktivnost flavonoida bila je predmet interesovanja brojnih istraživanja (*Heim i sar.*, 2002; *Yao i sar.*, 2004; *Prochazkova i sar.*, 2011; *Bubols i sar.*, 2013; *Banjarnahor i Artanti*, 2013; *Kumar i Pandey*, 2013). Postoje tri osnovna segmenta u strukturi flavonoida koja su prepoznata kao značajna za antioksidativnu aktivnost i prikazani su na slici 3.12:

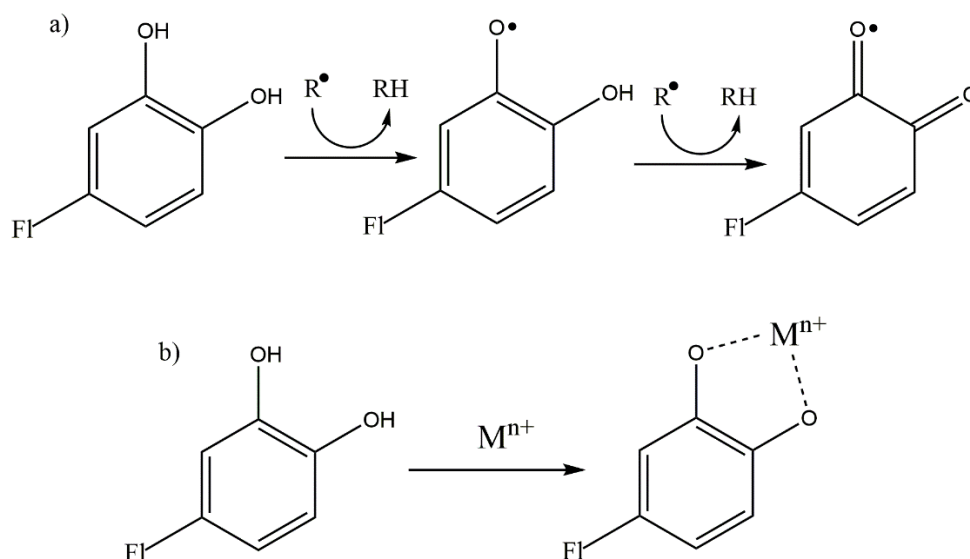
- hidroksilne grupe na prstenovima A i C, u položajima 3, 5 i 7;
- hidroksilne grupe u *orto* položajima 3' i 4' (katehol) na B prstenu, pogodne za delokalizaciju elektrona - na ovaj način se stabilizuje flavonoidni radikal. Flavonoidni radikal može reagovati sa još jednim slobodnim radikalom, pri čemu nastaju stabilni hinoni (slika 3.13a). Takođe, na ovom mestu može doći do helatiranja jona metala (slika 3.13b);
- dvostruka veza u položaju 2-3 na piranskom prstenu C konjugovana sa 4-keto grupom, omogućava delokalizaciju elektrona sa aromatičnog prstena B. Time se, usled rezonancije, stabilizuje flavonoidni radikal koji nastaje u reakciji flavonoida sa slobodnim radikalima. Između 4-keto grupe i hidroksilnih grupa u položajima 3 i 5 može doći do formiranja intramolekulske vodonične veze, a u ovom položaju takođe može doći do helatiranja jona metala (*Bubols i sar.*, 2013) (slika 3.14).



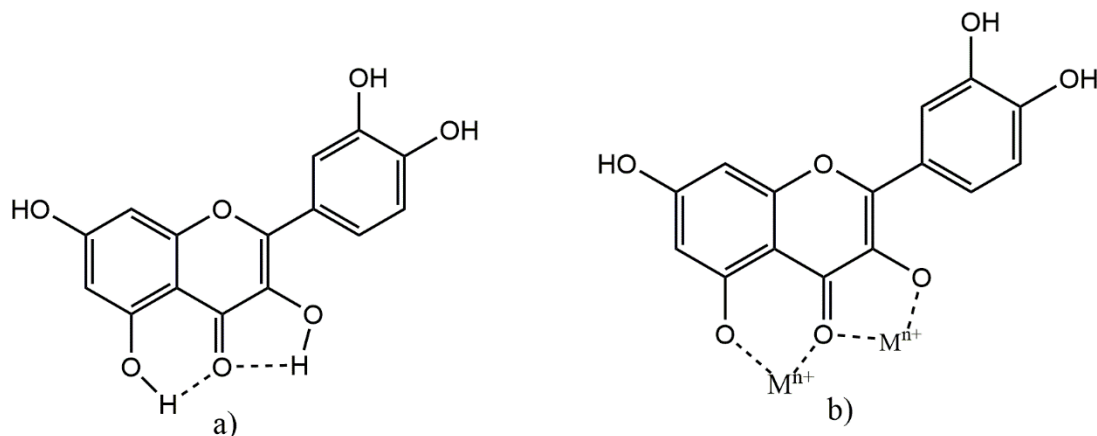
Slika 3.12. Funkcionalne grupe flavonoida značajne za antioksidativnu aktivnost

Konfiguracija, supstitucija i broj hidroksilnih grupa utiče na sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i heliranja jona metala. Hidroksilne grupe na B prstenu su najznačajnije za hvatanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i reaktivnih azotnih vrsta (eng. *Reactive Nitrogen Species*, RNG) jer doniraju vodonik ili elektron

hidroksil-, peroksil-, peroksinitril- radikalima, pri čemu nastaju relativno stabilni flavonoidni radikali (Cao i sar., 1997).



Slika 3.13. Doniranje vodonika (a) i helatiranje jona metala (b) hidroksilnim grupama na B prstenu u položajima 3' i 4'



Slika 3.14. Intramolekulske vodonične veze (a) i helatiranje jona metala (b) između 4-keto grupe i hidroksilnih grupa u položajima 3 i 5

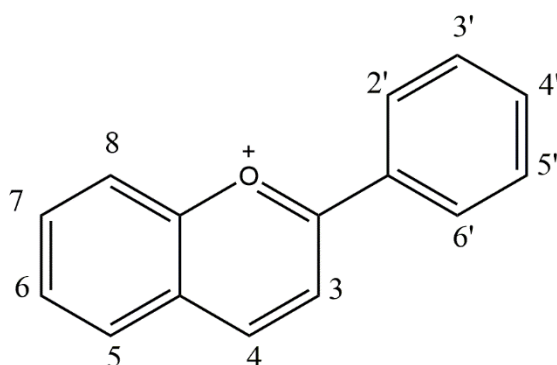
Helatiranjem jona gvožđa i bakra, koji učestvuju kao katalizatori u reakcijama nastanka slobodnih radikala u biološkim sistemima, flavonoidi onemogućavaju nastanak pojedinih radikalskih vrsta (Prochazkova i sar., 2011). Važna uloga flavonoida je i u inhibiranju dejstva različitih oksidaza, koje katalizuju nastanak slobodnih radikala.

Flavonoidi inhibiraju ksantin oksidazu i protein kinazu C, koji su odgovorni za nastanak superoksid-anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) (Hanasaki i sar., 1994). Takođe je pokazano da mogu inhibirati dejstvo ciklooksigenaze, lipoksidaze, mikrozomalne sukcin-oksidge i NADH-oksidge (Brown i sar., 1998; Korkina i Afanas'Ev, 1996).

3.4.5. Antocijani

Antocijani su hidrosolubilni biljni pigmenti koncentrisani u vakuolama. Od antocijana potiču razne nijanse crvene i plave boje cvetova biljaka i plodova voća i povrća. Imaju važnu ulogu u privlačenju insekata i životinja, čime se pospešuje oprašivanje cvetova i raznošenje semena. Antocijani sprečavaju oštećenja biljnih tkiva izazvana prekomernim zračenjem, jer apsorbuju UV zračenje (Mattioli i sar., 2020).

Antocijani su glikozidi antocijanidina (aglikona). Antocijanidini su podeljeni u 3 grupe: 3-hidroksiantocijanidine, 3-deoksiantocijanidine i *O*-metilovane antocijanidine, dok antocijani postoje u obliku glikozida antocijanidina i acilovanih antocijana. Osnovnu strukturu antocijana predstavlja flavilijum katjon (slika 3.15), hidroksilovan u različitim položajima (3,5,6,7,3',4' i 5'). Hidroksilna grupa u položaju 3 je mesto u flavilijum katjonu na kome najčešće dolazi do glikozilacije, pa su tako u biljnom svetu najzastupljeniji 3-*O*- β -glikozidi cijanidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina, peonidina i petunidina (Kho i sar., 2017).



Slika 3.15. Struktura flavilijum katjona

Stabilnost antocijana zavisi od brojnih faktora: strukture samog antocijanidina, vrste kopigmenta, temperature, svetlosti, prisustva enzima, metalnih jona i kiseonika (Turturicā i sar., 2015). Boja antocijana posledica je apsorpcije UV/Vis zračenja i delokalizacije

elektrona, dok su sama jonizacija i preraspodela elektrona u molekulu uslovljeni koncentracijom jona vodonika, tj. pH vrednošću sredine (*Castañeda-Ovando i sar.*, 2009). U kiseloj sredini ($\text{pH} < 3$), antocijani su u obliku stabilnog flavilijum katjona, zbog čega su vrlo rastvorljivi u vodi. Sa porastom pH vrednosti, odvijaju se dve konkurentne reakcije. Prva je reakcija hidratacije flavilijum katjona, što za posledicu ima stvaranje bezbojne karbinol pseudobaze, otvaranje prstena i nastanak halkon pseudobaze. U drugoj reakciji nastaju hinonoidalne baze, usled transfera protona na hidroksilne grupe aglikona. Hinonoidalni anjoni, stabilizovani rezonancijom, nastaju pri pH vrednostima 6-7, kada dolazi do deprotonovanja hinonoidalnih baza (*Fossen i sar.*, 1998).

Osim pH, na stabilnost antocijana utiče i kopigmentacija aglikona, koja predstavlja stabilizaciju antocijanidina metalnim jonima ili flavonoidima. Kopigmentacija stabilizuje boju lišća, cvetova i plodova biljaka (*Trouillas i sar.*, 2016). Utvrđeno je da prisustvo metalnih jona stabilizuje karbinol pseudo-bazne strukture u ravnotežnoj smeši delfinidina i obezbeđuje plave nijanse. Kopigmentacija antocijanidina sa flavonoidima, glikozilacija i acilovanje antocijanidina povećavaju intenzitet boje cvetova (*Khoo i sar.*, 2017).

Temperatura je značajan faktor koji utiče na stabilnost antocijana. Prisustvo kiseonika ubrzava degradaciju antocijana, putem direktne okidacije i delovanjem oksidujućih enzima. U prisustvu kiseonika, enzim polifenol-oksidaza katalizuje oksidaciju hlorogenske kiseline u odgovarajuće hinone, koji reaguju sa antocijanima, gradeći kondenzacione proizvode braon boje. Osim antocijana i ostala polifenolna jedinjenja podležu degradaciji u prisustvu enzima polifenol-oksidaze. Pomenuti enzim se može inaktivisati blanširanjem (blagim zagrevanjem do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tako su *Skrede i saradnici* (2000) pokazali da dodatak blanširanog ekstrakta pulpe borovnice soku od borovnice ne uzrokuje smanjenje sadržaja antocijana u soku. U istoj studiji, dodatak neblanširanog ekstrakta rezultovao je gubitkom od 50% u sadržaju ukupnih antocijana u soku, čime je istaknuta funkcija enzima u degradaciji antocijana.

Temperatura i dužina zagrevanja imaju značajan uticaj na sadržaj antocijana u krajnjem proizvodu. *Sadilova i saradnici* (2006) su zabeležili da posle 3 sata zagrevanja na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, samo 50% ukupnih antocijana zove biva očuvano. U studiji *Brownmiller-a i saradnika* (2008), blanširanje ($95\text{ }^{\circ}\text{C}/3\text{ min}$) u kombinaciji sa pasterizacijom borovnice rezultovalo je gubitkom od 43% u sadržaju ukupnih monomernih antocijana. Prilikom kuvanja džema od jagode duže od 15 minuta, dolazi do smanjenja u sadržaju ukupnih antocijana od 80% (*Garcia-Viguera i Zafrilla*, 2001). Blanširanje, kuvanje u vodi i kuvanje na pari uzrokuju smanjenje u sadržaju ukupnih antocijana od 59%, 41% i 29% u crvenom

kupusu (Volden i sar., 2008).

Blagotvorni uticaj antocijana na zdravlje ljudi predmet je mnogih istraživanja. Delfinidin ispoljava antimikrobno dejstvo protiv bakterije *Staphylococcus aureus*, deluje kao antiflogistik (protiv zapaljenja) i imunosupresiv (Roewer i Broschet, 2013a; Roewer i Broschet, 2013b).

Pelargonidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid i delfinidin-3-glukozid, kao i njihovi aglikoni, ispoljavaju snažno antioksidativno dejstvo u lipozomalnom sistemu i smanjuju nastanak malonil-aldehida, koji nastaje kao posledica UVB zračenja. Pritom, pelargonidin je najefikasniji u hvatanju hidroksilnih radikala, dok je delfinidin efikasniji u inhibiciji lipidne peroksidacije i hvatanju superoksidnih radikala (Tsuda i sar., 1996).

Antocijani ispoljavaju antiangiogenezni efekat. Angiogeneza predstavlja rast novih krvnih sudova, iz već postojećih kapilara ili vena, a ćelije endotela imaju ključnu ulogu u ovom fiziološkom procesu. Međutim, narušavanje ravnoteže u organizmu može dovesti do angiogeneze i u slučajevima kada ona nije poželjna (nastanak kancera, kardiovaskularnih bolesti, retinopatije i nefropatije izazvane dijabetesom) (Xue i sar., 2010). Ekstrakti borovnica, jagoda i brusnica, bogati antocijanima, imaju supresivni efekat na vaskularni endotelijalni rast humanih keratinocita, koji je izazvan dejstvom multifunkcionalnog citokina TNF- α (eng. *Tumor Necrosis Factor* - TNF) (Roy i sar., 2002).

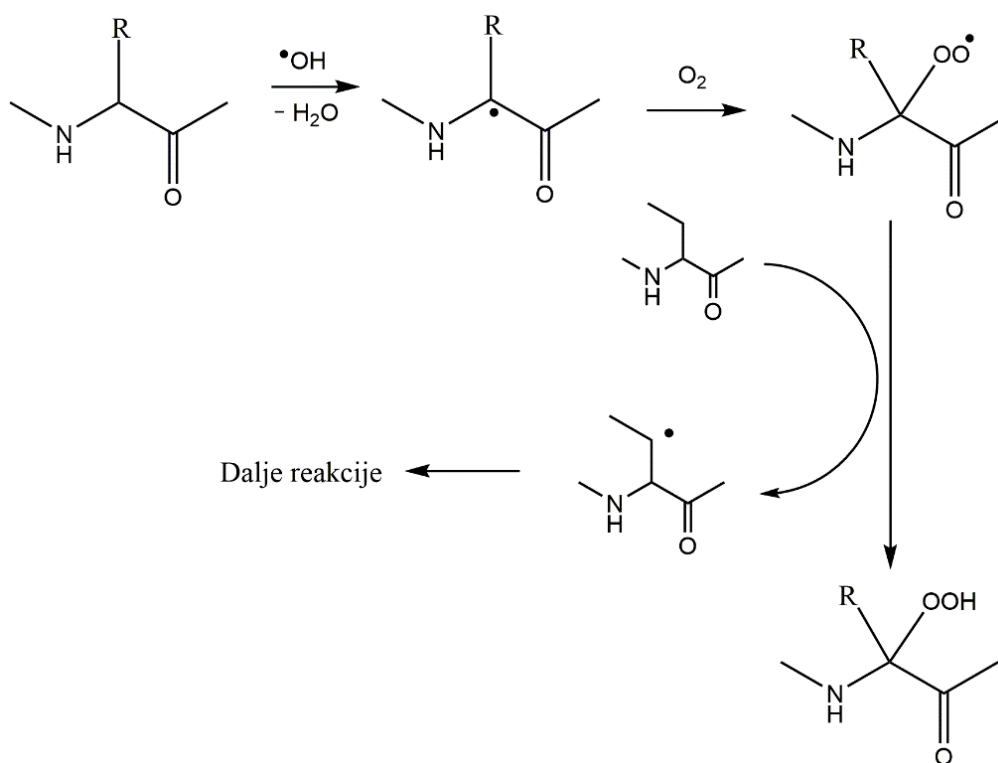
Antocijani utiču blagotvorno i na kardiovaskularni sistem, ispoljavajući vazorelaksantni efekat (Bell i Gochenaur, 2006). U *in vitro* uslovima, primećeno je anti-trombocitno dejstvo (Rechner i Kroner, 2005).

Ekstrakti crnog pirinča, bogati antocijanima, u *in vitro* i *in vivo* uslovima, indukuju ćelijsku apoptozu (vid ćelijske smrti, genetski programiran mehanizam za kontrolu broja ćelija) i dovode do supresije angiogeneze, što rezultuje antitumorskim efektom (Hui i sar., 2010). Antidijabetično dejstvo pelargonidin-3-galaktozida, cijanidin-3-glukozida i delfinidin-3-glukozida ogleda se u pospešivanju izlučivanja insulina, smanjenju nivoa glukoze u krvi i prevenciji nastanka insulinske rezistencije (Li i sar., 2015).

3.5. Slobodni radikali i antioksidanti – mehanizam delovanja

Slobodni radikali su hemijske vrste sa nesparenim elektronom, nestabilne i visoko reaktivne. Slobodni radikali mogu nastati usled egzogenih uticaja, kao što je sunčevo zračenje, kada UV zračenje dovodi do homolitičkog raskidanja veza u molekulima.

Stvaranje slobodnih radikala jedan je od odbrambenih mehanizama ćelije na štetne uticaje iz spoljne sredine. Koncentracija slobodnih radikala se povećava u slučajevima hemijske intoksikacije organizma, u cilju konverzije toksina u manje štetne supstance. Zapaljenski procesi su endogeni faktor koji stimuliše nastanak slobodnih radikala u telu. Oni su prisutni u fagocitnim ćelijama (makrofagi, monociti, neutrofil), gde uništavaju patogene mikroorganizme (*Santos-Sánchez i sar.*, 2019). Polimerizacija aminokiselina, kada nastaju proteini, protiče uz učesće slobodnih radikala (*Dean i sar.*, 1997) (slika 3.16). Slobodni radikali su neophodni i za katalitičku aktivaciju enzima ksantin-oksidade, aldehyd-oksidade, monoamin-oksidade, ciklooksigenaze, lipoksigenaze (*Fridovich*, 1976).



Slika 3.16. Reakcija hidroksilnog radikala sa α -aminokiselinama

(*Santos-Sánchez i sar.*, 2019)

Antioksidativni enzimi efikasno kontrolišu slobodne radikale u većini slučajeva. Međutim, do oštećenja ćelija i tkiva dolazi kada koncentracija slobodnih radikala i reakcije u kojima učestvuju postanu prekomerne, pa dolazi do patofizioloških promena, poput mutageneze, nastanka kancera, arterioskleroze, dijabetesa, infarkta miokarda, zapaljenskih bolesti, disfunkcije centralnog nervnog sistema i starenja ćelija (*Rice-Evans*, 1995; *Halliwell*, 1996). Oštećenja ćelija rezultat su (*Nakamura i sar.*, 1997):

- lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membranama;
- promene ćelijskih funkcija koje su povezane sa aktivnošću interleukina i formiranjem prostaglandina, hormona i neurotransmitera;
- inaktivacije ili denaturacije proteina i
- modifikovanja baza u nukleinskim kiselinama, što rezultuje mutagenezom ili karcinogenezom.

Za navedene procese, radikalske vrste od značaja su: superoksid-anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoksil-radikal (HO_2^{\bullet}), hidroksil-radikal (HO^{\bullet}), azot oksid (NO^{\bullet}), azot dioksid (NO_2^{\bullet}), nitrozoperoksikarbonat ($ONOOCO_2^-$) i peroksnitrit ($ONOO^-$). U tabeli 3.4. predstavljeni su slobodni radikali u biološkim sistemima, način na koji nastaju i funkcija koju vrše.

Tabela 3.4. Slobodni radikali koji nastaju u biološkim sistemima (*Santos-Sánchez i sar., 2019*)

Slobodni radikal	Izvor	Funkcija
$O_2^{\bullet-}$	Enzimski procesi, reakcije autooksidacije, reakcije neenzimskog transfera elektrona	Oksiduje askorbinsku kiselinu i α -tokoferol, redukuje komplekse gvožđa, poput citohroma-C
HO_2^{\bullet}	Protonovanje $O_2^{\bullet-}$	Inicira peroksidaciju masnih kiselina
HO^{\bullet}	Nastaje iz H_2O_2 Fentonovom reakcijom, katalizovanom jonima metala	Reaguje sa neorganskim i brojnim organskim molekulima (DNK, proteinima, lipidima, ugljenim hidratima)
NO^{\bullet}	Dejstvo azot-oksida sintetaze na arginin, uz NADPH kao izvor elektrona	Stimuliše enzim protein-kinazu i učestvuje u relaksaciji glatkih mišića
NO_2^{\bullet}	Homolitička fragmentacija $ONOOCO_2^-$	Učestvuje u antioksidativnim reakcijama, smanjuje koncentraciju askorbata i α -tokoferola u plazmi
$ONOO^-$	Reakcija O_2 sa NO^{\bullet}	Učestvuje u oksidovanju i nitrovanju metionina i tirozina; oksiduje DNK kada nastaje nitroguanin
$CO_3^{\bullet-}$	Intermedijer u reakciji superoksid-dismutaza- Cu^{2+} - OH^{\bullet}	Oksiduje biomolekule poput proteina i nukleinskih kiselina

ONOOCO ₂ ⁻	Reakcija ONOO ⁻ sa CO ₂	Učestvuje u nitrovanju tirozinskih fragmenata oksihemoglobina
----------------------------------	---	---

Oksidativni stres je kompleksan proces koga karakteriše neravnoteža između produkcije slobodnih radikala i sposobnosti organizma da eliminiše ove reaktivne vrste putem endogenih i egzogenih antioksidanata.

Antioksidanti su supstance koje u malim koncentracijama odlažu ili sprečavaju oksidaciju supstrata. Endogeni antioksidanti mogu biti enzimski (superoksid-dismutaze, katalaza, glutation-peroksidaza) i neenzimski (bilirubin, albumin). Egzogeni antioksidanti se u telo unose putem hrane i suplemenata (cink, selen, flavonoidi).

Superoksid-dismutaze su grupa metaloenzima koji predstavljaju prvu liniju odbrane ćelije od ROS i katalizuju reakciju dismutacije super-oksid anjon radikala (O₂^{•-}) do molekulskog kiseonika i H₂O₂. Ova reakcija je praćena oksido-redukcijom jona metala (bakar, gvožđe, mangan, nikl), koji se nalaze u aktivnom centru enzima (Younus, 2018). Smatraju se jednim od najvažnijih detoksikujućih enzima u ćeliji (Santos-Sánchez i sar., 2019). Katalaza katalizuje redukciju H₂O₂ do molekulskog kiseonika i vode, čime se kompletira proces detoksikacije koji započinju superoksid-dismutaze. Katalaza je u ćeliji skoncentrisana u peroksizomima, a aktivni centar ovog enzima sadrži jone gvožđa ili mangana (Chelikani i sar., 2004). Glutation-peroksidaze su grupa koju čini najmanje 8 enzima, a za čiju aktivnost je neophodan selen (Morón i Castila-Cortázar, 2012). Ovi enzimi imaju važnu ulogu u inhibiciji lipidne peroksidacije, a nalaze se u mitohondrijama i citozolima (Gill i Tuteja, 2010). Flavonoidi prisutni u hrani mogu interagovati sa reaktivnim vrstama, formirajući stabilne komplekse, ili mogu imati funkciju ko-supstrata u katalitičkim reakcijama antioksidativnih enzima (Santos-Sánchez i sar., 2019).

Glavna karakteristika antioksidanata je mogućnost prevencije ili detekcija oksidativne propagacije, kada reaguju sa slobodnim radikalima, stabilizuju ih i tako sprečavaju oksidativna oštećenja ćelija. Prema Gordonu (1990), postoje dva glavna tipa antioksidanata:

- primarni (hvatači slobodnih radikala, koji zaustavljaju lančane reakcije) i
- sekundarni ili preventivni (vrše deaktivaciju metalnih jona, lipidnih peroksida, regeneraciju primarnih antioksidanata i eliminaciju singletnog kiseonika) (Gordon, 1990).

Antioksidanti deluju putem nekih od sledećih mehanizama (Marković, 2016):

- 1) prenos atoma vodonika (eng. *hydrogen atom transfer* - HAT) sa molekula

antioksidanta na slobodni radikal:



2) prenos protona kuplovan sa prenosom elektrona (*proton coupled electron transfer* - PCET), gde u prvom stupnju dolazi do prenosa elektrona sa molekula antioksidanta na slobodnoradikalske vrste, a u drugom stupnju dolazi do deprotonovanja katjon-radikala antioksidanta:



3) gubitak protona praćen prenosom elektrona (*sequential proton loss electron transfer* - SPLET), koji započinje deprotonovanjem antioksidanta i formiranjem antioksidativnog anjona, a zatim nastali anjon gubi elektron:



Polaran i protičan rastvarač obezbeđuje dobru solvataciju nastalog anjona, pa će tako ovaj mehanizam biti dominantan u vodenoj sredini, ali ne i u lipidnoj fazi u biološkim sistemima.

4) prenos elektrona praćen prenosom protona (*single electron transfer - proton transfer* - SET-PT), gde u prvom stupnju dolazi do jonizacije molekula antioksidanta i formiranja odgovarajućeg radikal-katjona, a u drugom stupnju do njegovog deprotonovanja:



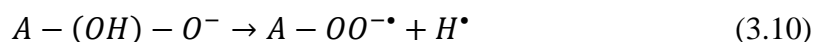
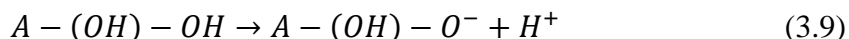
U ovom slučaju, neophodno je prisustvo polarnog protičnog rastvarača u cilju stabilizacije nastalog intermedijera. SET-PT mehanizam je mnogo manje zastupljen od HAT i PCET mehanizama, zbog prvog stupnja, koji je izuzetno spor.

5) formiranje radikalskog adukta (*radical adduct formation* - RAF) između molekula antioksidanta i slobodnog radikala:



Ovaj mehanizam antioksidativnog dejstva uslovljen je strukturom oba molekula. Reakcije između antioksidanata sa dvostrukim ili trostrukim vezama u molekulu i elektrofilnih slobodnih radikala mogu se odvijati po RAF mehanizmu.

6) gubitak protona praćen prenosom atoma vodonika (*sequential proton loss hydrogen atom transfer* - SPLHAT):



gde u prvom stupnju dolazi do deprotonovanja antioksidanta i formiranja antioksidativnog anjona, a u drugom stupnju dolazi do eliminacije vodonikovog atoma iz nastalog anjona.

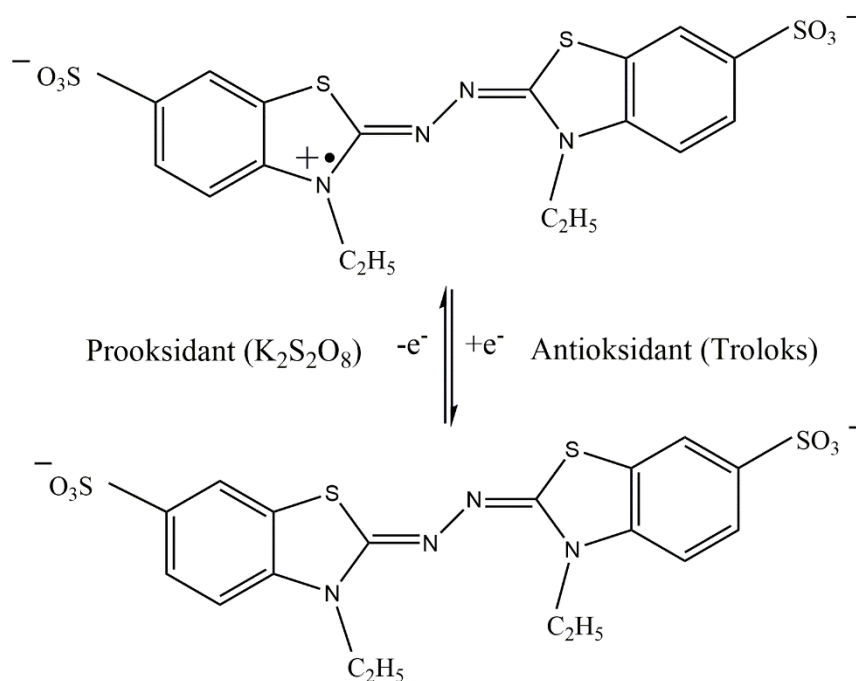
Pojedini antioksidanti mogu reagovati putem jednog mehanizma ili putem više njih, u zavisnosti od reakcionog sistema i izvora radikala ili oksidanta.

3.5.1. Spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

ABTS je supstrat peroksidaze koji, pri oksidaciji peroksilnim radikalima ili drugim oksidantima u prisustvu H₂O₂, daje metastabilan, ABTS radikal katjon koji je intenzivno zeleno obojen. Antioksidativni kapacitet se meri kao sposobnost ispitivanih jedinjenja za smanjenje intenziteta boje pri reakciji sa ABTS katjon radikalom i izražava se u odnosu na Troloks (Roginsky i Lissi, 2005). ABTS^{•+} je rastvorljiv i u vodenoj i organskoj fazi i na njega ne utiče jonska jačina rastvora, pa se antioksidativni kapacitet može meriti zahvaljujući hidrofilnim i lipofilnim svojstvima jedinjenja (Arnao, 2000). Metodom koja se zasniva na oksidaciji ABTS u prisustvu H₂O₂ i metmioglobina mogu se određivati samo hidrofilni antioksidanti. Filtriranje rastvora ABTS kroz prah mangan-dioksida omogućava određivanje lipofilnih antioksidanata poput karotenoida i tokoferola. ABTS radikalna aktivnost se može lako kvantitativno pratiti zahvaljujući karakterističnim maksimumima apsorpcionog spektra pri 414, 417, 645, 734 i 815 nm. Najčešće se posmatraju oni na 414-417 nm i 730-734 nm, gde su izrazito visoki molarni apsorpcioni koeficijenti (36000 dm³/molcm i 15000 dm³/molcm).

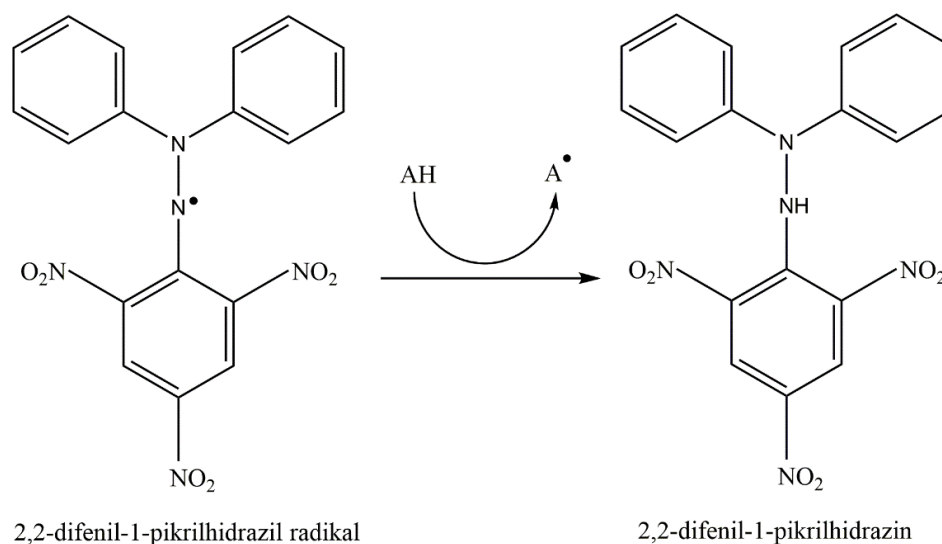
U različitim rastvaračima, maksimumi apsorpcije ABTS radikala se malo pomeraju zbog solvatohromnog efekta: u metanolu 744–745 nm, u etanolu 753 nm i u 1-propanolu

757 nm (Ilyasov i sar., 2020). Pri reakciji ABTS sa antioksidantom (slika 3.17), dolazi do obezbojavanja, koje je proporcionalno količini antioksidanta, a sama reakcija može biti praćena spektrofotometrijski na 734 nm (Re i sar., 1999; Arts i sar., 2004).



Slika 3.17. Reakcija ABTS katjon radikala sa antioksidantom

DPPH je stabilan slobodni radikal, a zahvaljujući delokalizaciji nesparenog elektrona nad molekulom u celini, molekuli ne dimerizuju, kao većina drugih slobodnih radikala. Rastvor DPPH je tamno ljubičaste boje sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Mešanjem rastvora DPPH sa supstancom koja može donirati atom vodonika, nastaje redukovani oblik (pikrazin), što je praćeno gubitkom ljubičaste boje (slika 3.18).



Slika 3.18. Redukcija DPPH radikala

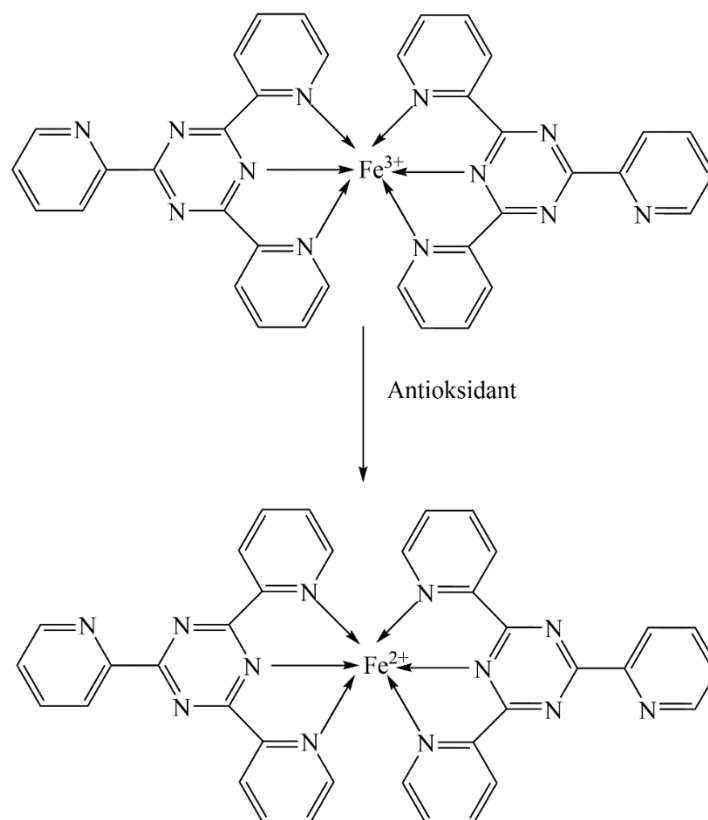
To je brza, jednostavna, jeftina i često korišćena metoda za merenje sposobnosti jedinjenja da deluju kao hvatači slobodnih radikala ili donori vodonika, kao i za procenu antioksidativne aktivnosti hrane. Takođe se može koristiti za kvantifikaciju antioksidanata u složenim biološkim sistemima, za čvrste ili tečne uzorke. Ova metoda je uspešno korišćena za ispitivanje antioksidativnih svojstava zrna pšenice i mekinja, povrća, bilja, jestivih ulja semena i brašna u nekoliko različitih sistema rastvarača, uključujući etanol, voda/acetona, metanol, voda/alkohol i benzen (Yu, 2001; Parry *i sar.*, 2005). DPPH metoda se može koristiti u vodenim i nepolarnim organskim rastvaračima i može se koristiti za ispitivanje hidrofилnih i lipofilnih antioksidanata (Prior *i sar.*, 2005).

FRAP metoda je relativno jednostavna, brza i jeftina metoda određivanja ukupne antioksidativne aktivnosti redukcionih antioksidanata (Benzie *i Strain*, 1996, 1999). Test se zasniva na redukciji kompleksa gvožđe(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) do gvožđe(II)-piridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) u kiselj sredini, što za posledicu ima promenu boje rastvora. Fe^{3+} -TPTZ se može redukovati antioksidantima koji doniraju elektrone, a čiji je redoks potencijal manje pozitivan od potencijala polureakcije $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (Benzie *i Strain* 1996, 1999; Halliwell *i Gutteridge*, 2007). Kako je Fe^{3+} -TPTZ u reakcionj smeši u velikom višku, limitirajući faktor je ukupna sposobnost doniranja elektrona redukcionih antioksidanata prisutnih u uzorku.

Antioksidanti koji reaguju u testu FRAP su oni koji mogu redukovati, pod primenjenim reakcionim uslovima, žuti Fe^{3+} -TPTZ kompleks do plavo obojenog Fe^{2+} -TPTZ oblika (slika 3.19), pri čemu se apsorbanca na 593 nm povećava. Ovde spadaju askorbinska

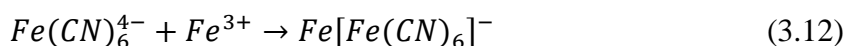
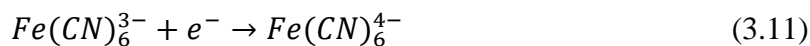
kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), mokraćna kiselina, bilirubin i polifenolna jedinjenja kao što su katehini i drugi flavonoidi u biljnoj hrani (Benzie i Devaki, 2017).

Prednost ove metode je što su reagensi stabilni i niske toksičnosti, osetljivost i preciznost metode su visoki, stehiometrijski faktori reagujućih antioksidanata su konstantni u širokom rasponu koncentracija, a test je robustan, tako da male razlike u radnim uslovima ne utiču značajno na rezultate.



Slika 3.19. Redukcija Fe^{3+} -TPTZ (žute boje) do Fe^{2+} -TPTZ (plave boje)

RP metoda se još naziva i PFRAP (eng. *Potassium Ferricyanide Reducing Antioxidant Power*). Metoda se zasniva na redukciji kalijum-heksacijanoferat(III) $K_3[Fe(CN)_6]$, do kalijum-heksacijanoferat(II) $K_4[Fe(CN)_6]$, koji potom reaguje sa gvožđe hloridom, $FeCl_3$, u kiseloj sredini, dajući kompleksno jedinjenje tamno plave boje $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ - prusko plavo, sa maksimumom apsorpcije na 700 nm. Molekuli antioksidanata su u ovom slučaju donori elektrona.



3.6. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)

3.6.1. Osnovni princip ICP-OES tehnike

Optička emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom je analitička tehnika koja se primenjuje u cilju određivanja elementnog sastava različitih uzoraka. Suština je izlaganje uzoraka izuzetno visokoj temperaturi plazme, čime se postiže desolvatacija, a zatim atomizacija i jonizacija atoma uzoraka. Dovođenjem dovoljne količine energije elektroni prelaze u više pobuđeno elektronsko stanje. Pri povratku na osnovni nivo, emituju fotone specifičnih talasnih dužina, karakterističnih za svaki element, na osnovu čega se vrši identifikacija elemenata. Intenzitet emitovane svetlosti proporcionalan je koncentraciji elementa, čime se vrši kvantitativno određivanje elemenata u uzorcima. Osnovni delovi ICP optičkog emisionog spektrometra prikazani su na slici 3.20.

Plazma može biti generisana korišćenjem argona (Vogt i sar., 2017), azota (Muller i sar., 2020) ili mešavine prethodno navedenih gasova (Scheffler i sar., 2019). Najčešće se koristi argon zbog svojih hemijskih karakteristika: plemeniti, monoatomski gas, hemijski inertan, sa visokom energijom jonizacije (15,76 eV), lako dovodi do atomizacije, pobuđivanja i jonizacije većine elemenata periodnog sistema. U cilju dobijanja plazme, primenjuje se radiofrekventni signal velike snage (Ariga i sar., 2017) ili mikrotalasno zračenje (Poirier i sar., 2017), što uzrokuje jonizaciju gasa, nastajanje elektrona i jona u samom matriksu plazme, njihovo zagrevanje i dodatno ubrzavanje. Interakcije između plazme i molekula uzorka su od presudne važnosti za uspešnost analize, pa je sama priprema uzoraka izuzetno značajna. Zato se svaki uzorak (u čvrstom, tečnom ili gasovitom stanju), prevodi u odgovarajući rastvor, a zatim pomoću raspršivača (nebulajzera) prevodi u aerosol (Ido i sar., 2020).



Slika 3.20. Osnovni delovi ICP optičkog emisionog spektrometra

Nakon uspešnog prevođenja u aerosol, interakcije između plazme visoke energije i uzoraka rezultuju degradacijom uzoraka na sastavne elemente, od kojih svaki poseduje karakterističan optički signal koji se može detektovati spektroskopski. Međutim, iako svaki pojedinačni element apsorbira, a potom i emituje zračenje karakteristične talasne dužine, može se dogoditi da se signali većeg broja elementa preklapaju, što predstavlja izazov u tumačenju dobijenih rezultata. Svetlost iz spektra koji emituje izvor plazme, pada na difrakcioni element – ešelnu rešetku sa velikim brojem ureza, dok se u nekim spektrometrima kao pomoćni difrakcioni elementi nalaze difrakcione rešetke ili prizme. Odabir adekvatnog načina posmatranja plazme - aksijalni ili radijalni, od velikog je značaja i dodatno utiče na tačnost analize. Aksijalna plazma pruža mogućnost za niže granice detekcije, dok je kod radijalnog načina posmatranja manja osetljivost.

Nakon razdvajanja analitičkih linija od interesa, za obradu spektralnih informacija i određivanje konačnog sastava uzorka, neophodni su detektori – najčešće fotomultiplikatori ili, u novije vreme, uređaji sa kuplovanim naelektrisanjem, CCD detektori (eng. *Charge coupled device* – CCD) (Barnard i sar., 1993).

Glavne prednosti primene ICP-OES tehnike su visoka preciznost, selektivnost i osetljivost, veliki linearni dinamički opseg i niska granica detekcije (niža nego kod atomske apsorpcione spektrometrije – AAS) (Mermet, 1998). Značajna je mogućnost istovremene multielementne analize složenih uzoraka, što je u naučnoj literaturi opisano, gde 19 elemenata može istovremeno biti određeno u jezgrastom voću (Tošić i sar., 2015), 20 elemenata u jagodastom voću (Nikolić i sar., 2016), 25 elemenata u uzorcima crne čokolade (Mrmošanin i sar., 2018). ICP-OES se pokazala izuzetno efikasnom kod uzoraka kod kojih nije moguća analiza primenom drugih tehnika, poput sirove nafte (Oliveira Souza i sar., 2015), kontaminiranog zemljišta (Battsengel i sar., 2020) i elektronskog otpada koji sadrži teške i plemenite metale i elemente retke zemlje (Tunali i sar., 2021). Mogu se određivati i radioaktivni nuklidi (^{226}Ra , ^{232}Th , ^{40}K) sa posebnim merenjima stepena radioaktivnosti, zahvaljujući detektorima na bazi germanijuma visoke čistoće (Alseroury i sar., 2018).

Mali broj elemenata periodnog sistema ne može se određivati primenom ICP-OES tehnike, poput argona/azota, ako je plazma argonska/azotna, ili ugljenika, kiseonika i vodonika, ako su kao rastvarači korišćeni organski rastvarači ili voda. Spektralne, kao i nespektralne interference (matriks efekat) posledica su prisustva različitih elemenata u kompleksnim uzorcima. Takođe treba imati na umu da je ovo po uzorke destruktivna analitička procedura, i da se nakon analize ne mogu povratiti. Zato se ova tehnika ne preporučuje za uzorke kojih nema dovoljno za ponavljanje analize.

Razvoj ICP-OES metode zahteva dosta vremena jer podrazumeva sledeće postupke (Katakam i Aboul-Enein, 2020):

- izvođenje grube analize složenih uzoraka u cilju sagledavanja i postavljanja pretpostavke o mogućem elementnom sastavu, uz adekvatnu pripremu uzorka, koja će obezbediti efikasnu aerosolizaciju;
- selekcija talasnih dužina na osnovu prethodno pomenutog koraka;
- analiza i eliminacija spektralnih interferenci, bez uticaja na signale koji potiču od ciljanih analita;
- optimizacija performansi sistema i validacija metode.

U zavisnosti od tipa uzorka, moguće je primeniti različite postupke u cilju adekvatne pripreme: suva mineralizacija za jezgrasto voće (Tošić i sar., 2015); mokra mineralizacija za uzorke kontaminiranog zemljišta (Battengel i sar., 2020), soka od šećerne trske (Souza i sar., 2019); mikrotalasna digestija za jagodasto voće (Nikolić i sar., 2016), morske alge (Larrea-Marrín i sar., 2010), suve godži bobice (Rodrigues Sá i sar., 2018), pirea, žitarice i mleka za bebe (da Silva i sar., 2018), ananas, jabuke, limun, narandže, mango (Li i sar., 2019), ugalj i sedimente (Low i Zhang, 2012), vunu (Aydin, 2008). Ultrazvučna ekstrakcija se može primeniti za pripremu uzoraka za ICP-OES analizu bibera (Gamela i sar., 2020), čokoladica (Villa i sar., 2015) ili u kombinaciji sa mikrotalasnom digestijom za multielementnu analizu leguminoza (Santos i sar., 2009). Kako se u postupcima mokre mineralizacije i mikrotalasne digestije primenjuju jaka oksidaciona sredstva (konc. H_2O_2 , HNO_3 , HF , $HClO_4$) i njihove mešavine, poželjno je pronaći dovoljno efikasne, a ekološki prihvatljivije, alternative. Prednost primene ultrazvuka ogleda se u skraćanju vremena i primeni blažih uslova (temperature i pritiska) za pripremu uzoraka, povećanju prinosa ekstrakcije, kao i mogućnosti primene rastvora razblaženih kiselina (Tiwari, 2015). Fundamentalni značaj primene razblaženih kiselina ogleda se u smanjenju količine otrovnog otpada, čime se doprinosi razvoju „zelene“ hemije, održivih i netoksičnih metoda ekstrakcije, kao i zaštiti životne sredine (Gamela i sar., 2020).

Spektralne interference moguće je korigovati zahvaljujući ICP-OES sistemskom softveru i primenom spektrometara visoke rezolucije. Nespektralne interference zahtevaju optimizaciju i validaciju metode, ali nemoguće je eliminisati ih u potpunosti. Mali matriks efekat je skoro uvek prisutan, što može rezultovati netačnom detekcijom (Mermert, 1998).

3.6.2. Optimizacija parametara ICP-OES sistema

Optimizacija ICP-OES sistema podrazumeva variranje i odabir eksperimentalnih uslova pri kojima se dobijaju najbolji analitički signali. Neophodno je postići robusne uslove plazme, pri kojima je ona stabilna, a signal analita ne podleže promenama izazvanim spoljašnjim uticajima. Stepem jonizacije elemenata determiniše osetljivost sistema, pa je zato neophodan efikasan transfer energije između plazme i atoma uzoraka. Sa robusnom, visokotemperaturnom plazmom postiže se veća osetljivost i niže granice detekcije, naročito kod slabo jonizujućih elemenata kod kojih je prva energija jonizacije u opsegu od 8 do 11 eV (Be, As, Se, Cd, Hg, Sb, Zn). Promena temperature plazme značajnije se odražava na jonizaciju elemenata sa višom, nego sa nižom energijom jonizacije. Tako na primer barijum jonizuje 100% ($E_{i1}(\text{Ba})=5,21$ eV), bez obzira na temperaturu plazme. S druge strane, kadmijum jonizuje više od 80% na temperaturi od 7800 K, dok na temperaturi od 6800 K jonizuje manje od 40% ($E_{i1}(\text{Cd})=8,99$ eV).

Postizanje optimalnih uslova, kada se pretpostavlja postojanje lokalne termodinamičke ravnoteže, procenjuje se na osnovu odnosa emisionih linija određenih elemenata pri variranju sledećih uslova: snaga radiofrekventnog generatora, brzina raspršivačkog gasa, brzina unošenja uzorka, koncentracija kiselina korišćenih za pripremu uzoraka. Može se posmatrati odnos atomskih i emisionih linija: Cd (II) 226,502 nm/Cd (I) 228,802 nm, Cr (II) 267,716 nm/Cr (I) 357,868 nm, Ni (II) 231,604 nm/Ni (I) 232,138 nm, Pb (II) 220,353 nm/Pb (I) 217,000 nm, Zn (II) 206,200 nm/Zn (I) 213,857 nm. Najčešće se u praksi posmatra odnos intenziteta linija magnezijuma Mg (II) 280,270 nm/Mg (I) 285,213 nm jer su talasne dužine relativno bliske, intenziteti atomskih i jonskih linija su iste veličine, i vrednosti verovatnoće prelaza su poznate sa prihvatljivom tačnošću za izračunavanje teorijskog odnosa (*Dennaud i sar*, 2001).

Tabela 3.5. Temperatura (K), elektronska gustina (n_e , m^{-3}) i odnos intenziteta spektralnih linija Mg II 280,270 nm/Mg I 285,213 nm (*Dennaud i sar.*, 2001)

T (K)	$n_e \times 10^{-20}$ (m^{-3})	I_i/I_a^*
6500	1,01	10,8
7000	2,83	11,4
7500	6,90	12,1
8000	15,1	12,7
8500	30,1	13,4

9000	55,7	14,1
9500	97,0	14,8
10000	160	15,4

* I_i – intenzitet jonske linije (Mg II), I_a – intenzitet atomske linije (Mg I)

Teorijski odnos I_i/I_a (Mg (II)/Mg (I)) se određuje kao funkcija n_e . Kada je sistem u stanju lokalne termodinamičke ravnoteže, ovaj odnos varira između 10 i 14 za odgovarajući raspon vrednosti n_e . Eksperimentalni odnos se kreće od 1 do 14. Kada je odnos iznad 10, postignuti su robusni uslovi plazme, što znači da dolazi do procesa potpune atomizacije i jonizacije (Mermet, 1991). Takođe, Dennaud i saradnici (2001), su na osnovu svojih istraživanja došli do zaključka da kada je odnos Mg (II)/Mg (I) manji od 10 isti može da se pomnoži korekcionim faktorom ϵ ($B_{285}/B_{280} = \epsilon$, B - intenzitet emisije pozadine) koji iznosi 1,8, uzimajući u obzir karakteristike ešelne rešetke i solid-state detektora.

Povećanje snage radiofrekventnog generatora rezultuje jonizacijom argona, ubrzavanjem jona i elektrona i povećanjem temperature u plazmi. Pri nižim temperaturama plazme, manji je šum, tj. dobija se bolji odnos signal/pozadina, dok je pri višim temperaturama smanjena osetljivost, ali je efikasnija jonizacija elemenata. Optimalna snaga generatora zavisi od konstrukcije aparata i vrste uzoraka koji se analiziraju, a u istraživanjima se kreće u intervalu od 750 W do 1400 W (1400 W za analizu uranijuma u uzorcima kamenja (Li i sar., 2021), 1300 W za ostatke baruta (Vanini i sar., 2015), 1200 W za analizu PM₁₀ čestica u vazduhu (Seares i sar., 2021), 1150 W za analizu jagodastog voća (Nikolić i sar., 2016) i jezgrastog voća (Tošić i sar., 2015)).

Brzina protoka gasa za raspršivanje i brzina unošenja uzoka, obrnuto su srazmerni vremenu koje čestice uzoraka provode u plazmi. Pri manjoj brzini, manja je količina uzorka koja se unese u plazmu. Pri velikim brzinama u plazmu se unosi velika količina uzorka, a vreme koje čestice provedu u plazmi je skraćeno, pa ne dolazi do efikasnog transfera energije u cilju jonizacije atoma analita. U oba slučaja, osetljivost je narušena, pa se optimalna vrednost mora pronaći, u skladu sa primenom. U istraživanjima je optimalni protok gasa za raspršivanje u opsegu od 0,5 l/min do 1,2 l/min (Tošić i sar, 2015; Mrmošanin i sar., 2018; Seares i sar., 2021; Vanini i sar., 2015).

Koncentracija i vrsta kiseline korišćene za pripremu uzoraka utiču na signal analita. Primećeno je povećanje intenziteta signala pri koncentracijama kiselina manjim od 1% v/v, dok se pri većim koncentracijama intenzitet signala smanjuje (Mermet, 1998). Sumporna i fosforna kiselina povećavaju viskoznost rastvora, smanjuju efikasnost nebulajzera i dovode do formiranja krupnijih kapljica u aerosolu. Prema Dubuisson i sar., (1998), sirćetna

kiselina vodi formiranju finijih čestica aerosola i poboljšanju intenziteta signala. Azotna, perhlorna i hlorovodonična kiselina utiču na procese atomizacije i jonizacije u plazmi (Marichy i sar., 1990).

3.6.3. Validacija ICP-OES metode

Koren reči validacija potiče od latinske reči *validus*, što znači snažan. U prenesenom značenju odnosi se na nešto istinito, pouzdano, korisno i po zadovoljavajućim standardima. Međunarodna organizacija za standardizaciju (eng. *International Organization for Standardization - ISO*), definiše validaciju kao potvrdu ispitivanja i pružanja objektivnih dokaza da su određeni zahtevi za specifične namene ispunjeni (ISO, 1994). Ova definicija podrazumeva da je sprovedeno detaljno istraživanje i daje dokaze da analitička metoda, kada se ispravno primenjuje, daje rezultate koji odgovaraju nameni, i potvrđuje efikasnost analitičke metode sa visokim stepenom tačnosti (Araujo, 2009). Važnost validacije metode istaknuta je od kasnih 1940-ih kada su Američko hemijsko društvo i Merck & Co., ukazali na činjenicu da su matematika i statistika neophodan preduslov za uspešan razvoj i primenu novih analitičkih metoda. Do tada je kroz niz radova o razvoju analitičkih metoda uočeno da nisu vršena poređenja sa drugim ili sličnim metodologijama radi provere tačnosti u preglednim člancima. Osim toga, istaknuto je da je statistička analiza podataka segment koji je zanemaren od strane hemičara koji razvijaju eksperimentalne metode. Početkom 70-ih naglašena je potreba za primenom doslednog skupa definicija za utvrđivanje performansi i karakteristika razvijenih analitičkih metoda i upoređivanje prednosti i nedostataka sve većeg broja prijavljenih analitičkih metoda.

U današnje vreme postoji nekoliko renomiranih međunarodnih organizacija i regulatornih agencija koje nude smernice o validaciji metoda i srodnim temama: Udruženje analitičkih hemičara (eng. *Association of Official Analytical Chemists - AOAC*), Američko društvo za testiranja i materijale (eng. *American Society for Testing and Material (ASTM)*), Kodeks komiteta za metode analize i uzorkovanja (eng. *Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling - CCMAS*), Evropski komitet za normalizaciju (eng. *European Committee for Normalization - CEN*), Međunarodna saradnja za doslednost u analitičkoj hemiji (eng. *Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry - CITAC*), Evropska organizacija za akreditaciju (eng. *European Cooperation for Accreditation - EA*), Organizacija za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agricultural Organization - FAO*),

Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (eng. *United States Food and Drug Administration* - FDA), Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization* - WHO), Međunarodna organizacija za standardizaciju (eng. *International Organization for Standardization* - ISO), Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (eng. *International Union for Pure and Applied Chemistry* - IUPAC) (Araujo, 2009).

Strategija razvoja analitičkih metoda zahteva sistematski pristup i podrazumeva optimizaciju eksperimentalnih uslova, kao i validaciju metoda kako bi se potvrdila pouzdanost i mogućnost primene metoda za rutinske analize. Postupak validacije podrazumeva (*Eurachem Guide*, 2015):

- validaciju uzorka i uzorkovanja;
- validaciju metodologije;
- validaciju podataka.

Validacija uzorka i uzorkovanja

Uzorkovanje je deo analitičkog procesa kojim se izdvaja jedna ili više porcija iz materijala za analizu. Uzorkovanje treba da bude usklađeno sa postavljenim analitičkim problemom. Svrha validacije uzorka je da se dobije reprezentativan i autentičan uzorak. Ako je uzorak homogen, bilo koji deo ispitivanog materijala daće reprezentativan uzorak. Budući da većina realnih uzoraka nije homogena, potrebno je prikupiti niz uzoraka kako bi se osigurala reprezentativnost. Postupak uzorkovanja određen je i agregatnim stanjem i matriksom uzorka (organski, neorganski, biološki uzorci...), kao i koncentracijom analita. U planiranju treba definisati postupak uzorkovanja i uzeti u obzir hoće li se analiza izvoditi na mestu uzorkovanja (*in situ*) ili u laboratoriju. Da bi se osigurala reprezentativnost, takođe treba odrediti mesto uzorkovanja, broj i veličinu uzorka kao i njegovu stabilnost i na osnovu tih saznanja organizovati njegov transport i skladištenje do trenutka analize.

Validacija metodologije

Validacija metodologije podrazumeva određivanje sledećih parametara: selektivnosti, tačnosti, preciznosti, linearnosti, dometa, granice detekcije, granice kvantifikacije i efekta matriksa uzorka.

Selektivnost se odnosi na stepen primene metode za određivanje analita u kompleksnom uzorku, bez interferenci koje potiču od drugih komponenata uzorka. Specifičnost predstavlja 100%-tnu selektivnost, tj. mogućnost određivanja analita u

prisustvu ometajućih komponenti. Selektivnost podleže gradaciji i može se opisivati kao loša, dobra ili odlična, za razliku od specifičnosti, koja ili postoji ili ne.

Tačnost predstavlja stepen slaganja između eksperimentalne vrednosti dobijene višestrukim merenjima i sertifikovane vrednosti. Tačnost se procenjuje izračunavanjem “recovery” vrednosti - analiziranjem analita i sertifikovanog referentnog materijala, a zatim poređenjem dobijenog rezultata sa sertifikovanom vrednošću. Takođe, može se primeniti metoda standardnog dodatka ili se može porediti rezultat dobijen metodom koja se validira sa rezultatom dobijenim referentnom metodom. Tačnost se izražava u procentima, a računa po formuli:

$$recovery = \left(1 - \frac{(dobijena\ vrednost - sertifikovana\ vrednost)}{sertifikovana\ vrednost}\right) \times 100 \quad (3.13)$$

Preciznost predstavlja stepen slaganja rezultata niza merenja, izvedenih pod definisanim uslovima. Određivanje ovog parametra jedan je od osnovnih koraka u procesu postizanja reproduktivnosti pri validaciji metode. Procenjivanje preciznosti podrazumeva numeričko izražavanje slučajne greške ili stepena disperzije skupa pojedinačnih merenja računanjem standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD). Što je njihova vrednost manja, preciznost je veća.

U analitičkoj hemiji se koristi standardna devijacija ograničenog broja merenja i data je izrazom:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.14)$$

gde je n – ograničen broj merenja, $n-1$ – broj stepena slobode, \bar{x} je srednja vrednost niza merenja, x_i je i -ta vrednost merenja.

Relativna standardna devijacija (RSD) definisana je izrazom:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.15)$$

Linearnost predstavlja mogućnost sistema da na promene u koncentraciji analita reaguje proporcionalnom promenom intenziteta signala. Uobičajena je praksa da se primenom linearne regresije izrazi jednačina prave ($y=ax+b$), a potom se linearnost kalibracione prave ispituje računanjem koeficijenta korelacije (r), i što je njegova vrednost bliža jedinici, smatraće se da kalibraciona prava ima odličnu linearnost.

Domet ili raspon analitičke procedure se može definisati kao interval između gornje i donje koncentracije analita za koje je potvrđena određena preciznost, tačnost i linearnost. Radni ili analitički raspon opisuje interval između najniže (granica detekcije) i najviše koncentracije gde se signal može povezati sa koncentracijom za procenu slučajnih i sistematskih grešaka. Linearni ili dinamički opseg odgovara intervalu funkcionalne zavisnosti signala od koncentracije ili mase koja se obično određuje metodom najmanjih kvadrata, što zauzvrat pretpostavlja homoscedastičnost (homogenost varijanse) merenja u odnosu na linearni opseg.

Granica detekcije (eng. *Limit of Detection* – LOD) se definiše kao najmanja koncentracija analita koja se može detektovati u uzorku, ali ne nužno i kvantitativno odrediti. Izračunava se na osnovu izraza:

$$LOD = \frac{3,3s}{a} \quad (3.16)$$

gde je s - standardna devijacija serije merenja signala detektora bez analita, a - nagib kalibracione prave.

Granica kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification* – LOQ) definisana je kao najniža koncentracija analita koja se može odrediti sa prihvatljivim nivoom tačnosti i preciznosti. Izračunava se na osnovu izraza:

$$LOQ = \frac{10s}{a} \quad (3.17)$$

gde je s – standardna devijacija serije merenja signala detektora bez analita, a - nagib kalibracione prave.

Efekat matriksa uzorka utiče na tačnost određivanja. Jedan od postupaka koji obezbeđuje izbor talasne dužine sa minimumom efekta matriksa je postupak upoređivanja nagiba kalibracione prave dobijene iz standardnih rastvora i kalibracione prave kod koje su standardi „spajkovani” određenom zapreminom rastvora uzorka (n_{kal}/n_{uz}). Što je dobijeni odnos bliži jedinici to je na toj talasnoj dužini najmanji uticaj matriksa. U cilju ispitivanja matriks efekta neki autori predlažu metodu unutrašnjeg standarda ili metodu standardnog dodatka (*Stapan i sar.*, 2001; *Todoli i sar.*, 2002). Prema literaturnim podacima, kalibracione prave za izabrane talasne dužine ispitivanih elemenata, su „spajkovane” određenom zapreminom uzorka, tako da je nivo „spajkovanih” koncentracija za većinu elemenata bio 1 – 10 mg/dm³, osim za Pb, Se, Mo, Ni, Cd i Cr, za koje je nivo spajkovanja bio 0,1 – 1 mg/dm³ (*U.S. Food and Drug Administration*, 2015; *Sharpless i sar.*, 2007). *Naozuka i saradnici* (2011) su efekat matriksa ispitivali tako što su standardni rastvor

koncentracije 10 mg/dm³ svakog analita dodavali uzorcima. Na osnovu izgleda emisionih linija birali su najbolju analitičku liniju sa najvećim “signal-to-background” odnosom. Nakon toga vršena je manuelna “background” korekcija za kvantitativno određivanje.

Validacija podataka

Validacija podataka predstavlja proces prihvatanja ili odbacivanja podataka pre njihovog konačnog iskazivanja. Validacija se zasniva na statističkoj proceni mernih rezultata i uključuje odbacivanje grubih grešaka, određivanje značajnosti pojedinih odstupanja mernih podataka statističkim testovima, analizu varijanse, izbor kalibracijskih postupaka, sprovođenje regresione analize i slično. Validacija podataka je završni korak i zahteva dokumentovanost od uzorkovanja do prikazivanja podataka. Validacija obuhvata:

- proveru ispravne identifikacije uzorka;
- proveru svih grešaka;
- proveru sastava uzoraka;
- hemometrijsku analizu i proveru svih podataka.

Laboratorija zajedno sa uzorcima koje analizira, u obavezi je da analizira i kontrolne uzorke (referentne materijale, standardne rastvore, slepe probe), a dobijene vrednosti unosi u kontrolnu kartu (*Santovac i Markićević, 2012*). Uzorci za kontrolu kvaliteta mogu biti (*NT Technical Report, 2011; Rajković i sar., 2019*):

- Kontrolni uzorak tip I, sintetički uzorak (laboratorijski referentni materijal ili sertifikovani referentni materijal (CRM)). Upotrebljava se isti uzorak (poznate koncentracije) u svakoj grupi uzoraka. Koristi se za izradu X-karte (karta srednje vrednosti), X-bar i R-karte (karta opsega);
- Kontrolni uzorak tip II, stabilan prirodni uzorak, odabran slučajno iz serije uzoraka za analizu. Koristi se različit uzorak u svakoj seriji uzoraka, nepoznate koncentracije. Koristi se za izradu R-karte. Daje realnu sliku unutarserijske slučajne greške za prirodne uzorke;
- Kontrolni uzorak tip III, prirodan uzorak slučajno odabran među uzorcima serije za analizu, sa standardnim dodatkom. Koristi se različit uzorak u svakoj grupi uzoraka, sa poznatom koncentracijom dodate supstance. Koristi se za izradu D-karte (karta tačnosti). Ovaj kontrolni uzorak otkriva uticaj matričnih smetnji na veličinu rezultata;

- Kontrolni uzorak tip IV, uzorak slepe probe. Koristi se za izradu X-bar i R-karte. Ovaj tip uzorka je neophodan za praćenje limita detekcije, kao i za otkrivanje kontaminacije ili grešaka u pripremi reagenasa. Greške u blank uzorcima uzrokuju sistematske greške na nivou niskih koncentracija;
- Kontrolni uzorak tip V, prirodni uzorak odabran slučajno od uzoraka za ispitivanje, za vrlo nestabilan parametar. Koristi se različit uzorak u svakoj seriji uzoraka. Koncentracija uzorka je nepoznata i može da se promeni tokom vremena koje je potrebno da se analizira grupa uzoraka. Koristi se za izradu R-karte. Daje uvid u preciznost.

Referentni materijal (eng. *International Atomic Energy Agency - IAEA*, 2003), je materijal određenog sastava čija je deklarirana vrednost oslobođena od sistematskih grešaka i može se upotrebiti za:

- kalibraciju instrumenata;
- validaciju metoda;
- procenu odstupanja pri merenju;
- edukaciju;
- internu kontrolu kvaliteta.

Postoji nekoliko tipova referentnog materijala: čiste supstance, standardni rastvori ili smeše i referentni materijali u matriksu. Kada je referentni materijal skup, često se pribegava tome da se pravi u laboratoriji, pa se takav referentni materijal naziva „internim referentnim materijalom“. Pritom, on mora da bude homogen kako bi poduzorci dobijeni iz njega bili reprezentativni i svi isti (*Kaštelan-Macan*, 2003).

3.7. Tečna hromatografija visokih performansi

Hromatografija predstavlja zajednički naziv za grupu analitičkih tehnika za razdvajanje i analizu kompleksnih uzoraka, kao i identifikaciju jedinjenja. Tečna hromatografija visokih performansi (eng. *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*) predstavlja usavršenu hromatografiju na koloni, gde se odvija proces razdvajanja komponenata smeše, tako što se tečni uzorak ubrizgava u mlaz rastvarača (mobilna faza) koji pod pritiskom protiče kroz hromatografsku kolonu napunjenu separacionim

materijalom (stacionarna faza). Komponente uzorka se razdvajaju procesom diferencijalne migracije dok teku kroz kolonu, usled različitog afiniteta koji komponente ispoljavaju ka stacionarnoj fazi.

Dve najčešće varijante su HPLC na normalnoj i obrnutoj fazi. Kod normalno-fazne HPLC, kolona je ispunjena sitnim česticama silicijum-dioksida i nepolarnim rastvaračem, npr. heksanom. Tipična kolona ima unutrašnji prečnik od 4,6 mm ili manji i dužinu od 150 do 250 mm. Napolarna jedinjenja u smeši će brže prolaziti kroz kolonu, jer će polarna jedinjenja duže biti vezana za polarni silicijum-dioksid nego nepolarna jedinjenja.

Kod obrnuto-fazne HPLC veličina kolone je ista i ispunjena je česticama silicijum-dioksida čija je površina modifikovan dugim ugljovodoničnim lancima (8-18 C atoma). Koristi se polarni rastvarač (mešavina vode i alkohola). Polarna jedinjenja u smeši će brže prolaziti kroz kolonu zbog snažnih interakcija između polarnog rastvarača i polarnih molekula u smeši. Napolarni molekuli su usporeni na svom putu kroz kolonu. Oni formiraju različite stepene privlačenja sa ugljovodoničnim grupama prvenstveno putem van der Waalsovih disperzionih sila i hidrofobnih interakcija. Takođe su manje rastvorljivi u komponentama vodene mobilne faze, što olakšava njihovu interakciju sa ugljovodoničnim grupama. HPLC sa obrnutom fazom je najčešće korišćen oblik HPLC-a.

U izradi kolona danas se primenjuje *core-shell* (jezgro-ljuska) tehnologija. Čestice jezgra i ljuska sastoje se od čvrstog jezgra obloženog slojem poroznog silicijum-dioksida koji se taloži u slojevima ili u jednom premazu, u zavisnosti od proizvođača. Prečnik čvrstog jezgra i poroznog sloja variraju kod različitih proizvođača i željene veličine čestica. Čestica od 2,7 μm može, na primer, da se sastoji od čvrstog jezgra od 1,7 μm i prevlake od 0,5 μm . Kolone sa jezgrom i ljuskom sada su komercijalno dostupne sa veličinama čestica u rasponu od 1,3 do 5 μm . Ključna karakteristika *core-shell* kolona je znatno uža distribucija veličine čestica koja se može postići tokom proizvodnje, tipično sa 3–6% RSD u poređenju sa 10–30% RSD koja je tipična za potpuno porozne materijale.

Na osnovu van Deemter-ove jednačine predviđa se optimalna brzina protoka mobilne faze pri kojoj se postiže maksimalna efikasnost razdvajanja kolone:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad (3.18)$$

gde je:

HETP – visina ekvivalenta teorijskog poda;

A – koeficijent vrtložne difuzije koji zavisi od načina pakovanja čestica u koloni i dimenzija čestica;

B – koeficijent longitudinalne difuzije, čiji je uticaj na HETP veći što je manja brzina protoka mobilne faze;

u – brzina protoka mobilne faze;

C – član koji definiše otpor transferu mase iz mobilne faze (C_m) u stacionarnu (C_s) i obrnuto.

U početku, povećanje efikasnosti *core-shell* kolona pripisano je smanjenju otpora prenosa mase (član C u van Deemter-ovoj jednačini). Međutim, utvrđeno da je za analite manje od 500 daltona, povećanje efikasnosti posledica smanjenja vrtložne difuzije (član A u van Deemter-ovoj jednačini) kojoj doprinosi distribucija putanja kroz čestice materijala kojim je kolona ispunjena i razlike u brzini kretanja analita između čestica i zidova kolone.

Veličina čestica materijala za pakovanje nije od presudne važnosti samo za određivanje povratnog pritiska u koloni, već je i dominantni faktor odgovoran za zagrevanje usled trenja. Ako se smanji veličina čestica materijala za pakovanje, zagrevanje usled trenja će se povećati, što je ograničilo performanse visokoefikasnih potpuno poroznih materijala, čija je veličina čestica manja od 2 μm , posebno pri većim brzinama. Pokazano je da čestice *core-shell* imaju poboljšana svojstva rasipanja toplote u poređenju sa potpuno poroznim, pa se mogu koristiti pri većoj linearnoj brzini eluenta pre nego što zagrevanje usled trenja počne da utiče na hromatografiju (Taylor, 2014).

Prilikom analize farmaceutskih preparata i prehrambenih namirnica, kao mobilna faza često se koriste smeše više rastvarača (vode, metanola, acetonitrila, mravlje kiseline), kojima se dodaju puferski rastvori za održavanje pH na skoro konstantnoj vrednosti. U HPLC analizi, puferi se obično koriste za kontrolu sekundarnih interakcija koje se u hromatografiji generalno smatraju nepoželjenim. Takođe se koriste za kontrolu jonizacionog stanja analita kako bi se osiguralo da nije prisutan u više od jednog jonizovanog oblika. Primenom HPLC-a, može se izvršiti kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka.

Kod kvalitativne analize razlikuju se slučajevi gde:

- komponente uzorka su poznate i pikovi na hromatogramu moraju biti pripisani poznatim komponentama, i

- sastav uzorka je nepoznat i potrebno je identifikovati njegove sastavne komponente.

U prvom slučaju, identifikacija pikova u hromatogramu vrši se na osnovu retencionog vremena standarda, čiji je hromatogram snimljen pri istim uslovima, tj. po istoj metodi, kao i hromatogram uzorka. Postojanje selektivnog detektora (UV ili fluorescentnog) može puno pomoći u identifikaciji pikova. U drugom slučaju, često je neophodno koristiti detektore kao što su maseni spektrometri. Takođe, može biti neophodno prikupljanje frakcija eluenta koje sadrže pikove od interesa za karakterizaciju primenom IC spektroskopije ili NMR spektroskopije.

Jedan od načina za identifikaciju pikova na hromatogramu uzorka je taj da se ubrizgaju standardni rastvori pod identičnim analitičkim uslovima. Upoređivanjem retencionog faktora (k) i odziva odgovora pika u hromatogramu standardnog rastvora, sa hromatogramom uzorka, pikovi se mogu uslovno identifikovati. Važno je i vrlo poželjno da se koncentracija standardnog rastvora uskladi sa rastvorom uzorka što je bliže moguće, čime se izbegava potencijalno pogrešna identifikacija pika zbog efekata oblika pika. Za što precizniju identifikaciju pikova važno je da se analiza izvede i pod različitim uslovima. Analiza se sprovodi u obrnutoj fazi korišćenjem različite kolone i mobilne faze, a retencioni faktor i odziv se ponovo upoređuju. Ako se pronađe podudaranje, onda je identifikacija pika pouzdanija.

Tehnika „spajkovanja“ uzorka podrazumeva dodavanje poznatog referentnog materijala u matricu uzorka, kako bi se potvrdio identitet neke komponente uzorka. Recimo, postoji sumnja da je insulin jedna od komponenti uzorka. Tom uzorku se dodaje rastvor insulina, približne koncentracije kao što je komponenta uzorka. Ako se intenzitet nekog pika povećava, onda taj pik može biti insulin. Ako se vidi novi hromatografski pik, ili ako se kod bilo kog pika primeti „rame“, onda je malo verovatno da je bilo koji od pikova na hromatogramu posledica insulina u uzorku.

Identifikacija pikova na hromatogramu uzorka jedino na osnovu retencionog vremena može biti nepouzdana. Upotreba selektivnih detektora i spektrometara može u velikoj meri povećati pouzdanost identifikacije. Detektorski sistemi kao što su UV/Vis, fluorescentni ili maseni spektrometri mogu da snime jedinstvene spektre za svaki pik u okviru hromatograma uzorka. Spektar dobijen od nepoznatog pika upoređuje se sa spektrom standarda ili sa spektrima iz biblioteke koja se čuva u sistemu hromatografskih podataka.

Kvantitativna HPLC analiza podrazumeva da su pikovi koji se kvantifikuju prethodno identifikovani, tako da se može pripremiti serija standardnih rastvora i snimiti kalibraciona prava, na osnovu koje se vrši izračunavanje.

Na tačnost kvantifikacije utiču rezolucija pikova, simetrija pikova i oblik bazne

linije. Dobro razdvojeni pikovi mogu se lako i ponovljivo integraliti jer drugi pikovi ne utiču na visinu i površinu. Reproducibilno integraljenje pikova koji eluiraju na kosim baznim linijama može biti teško.

Pojava „ramena“ ili „repa“ ispred (eng. *fronting*) ili iza pika (eng. *tailing*) mogu biti rezultat dva nepravilno razdvojena jedinjenja, a ramena pikova je teško reproducibilno integraliti. Integraljenje hromatografskog pika podrazumeva postupak merenja površine ispod hromatografskog pika. Merenje je zasnovano na integralnoj tehnici razdvajanja pika na veliki broj pravougaonika, koji se zatim sabiraju da bi se dobila procena ukupne površine ispod pika – mera kumulativnog signala „apsorbanca u odnosu na vreme“.

Potrebno je definisati dve ključne tačke da bi sistem izvršio proračun, a to su početak i kraj pika – oni će biti određeni podešavanjem praga i širine pika u sistemu podataka. Bazna linija se zatim povlači između početne i krajnje tačke pika. Za većinu HPLC analiza, površine pikova se koriste za kvantitativne proračune, iako se u većini slučajeva, mogu postići ekvivalentni rezultati sa visinom pika. Površina pika je posebno korisna jer HPLC pikovi mogu biti zaobljeni. U ovom slučaju, iako visine pikova mogu da variraju, površina će ostati konstantna.

3.8. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je optička apsorpciona metoda, koja se zasniva na merenju intenziteta apsorbovane ili propuštene svetlosti kroz ispitivani uzorak. Apsorpcija zračenja, ultraljubičastog (eng. *Ultraviolet* – UV) ili vidljivog (eng. *Visible* – Vis) vodi pobuđivanju elektrona i prelasku iz osnovnog u pobuđeno stanje. Energije apsorbovanih fotona su vrlo bliske, pa se zato apsorpcioni spektri javljaju kao kontinualne apsorpcione trake. Na osnovu apsorpcionog spektra može se vršiti kvantitativna i kvalitativna analiza supstance. Na osnovu položaja apsorpcionih pikova u UV/Vis oblasti, može se utvrditi prisustvo hromofora u organskim molekulima. Kod neorganskih molekula, gde su apsorpcione trake široke, kvalitativna analiza se svodi na određivanje molarnog apsorpcionog koefijenta (a) na određenoj talasnoj dužini, na osnovu Lambert-Beer-ovog zakona i zatim poređenjem dobijene vrednosti sa tabličnim vrednostima. Kvantitativna spektrofotometrijska analiza se takođe zasniva na Lambert-Beer-ovom zakonu, zahvaljujući činjenici da je apsorbanca ispitivane supstance proporcionalna koncentraciji i debljini sloja kroz koji svetlost prolazi.

$$A = a \times b \times c \quad (3.19)$$

gde je:

A – apsorbanca ispitivanog transparentnog rastvora;

a – molarni apsorpcioni koeficijent (dm^3/molcm);

b – debljina sloja kroz koji svetlost prolazi (cm);

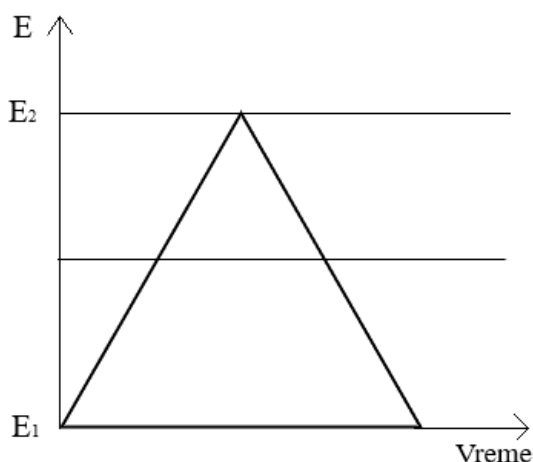
c – koncentracija supstance (mol/dm^3).

Za analizu se bira talasna dužina koja odgovara maksimalnoj apsorbanici ispitivane supstance. Ovaj izbor osigurava maksimalnu osetljivost jer se postiže najveći odziv za određenu koncentraciju analita. Za analizu podataka, konstruiše se kalibraciona prava, grafik zavisnosti apsorbanice u odnosu na koncentraciju. Što je veći nagib kalibracione prave, osetljivost je veća.

Aditivnost apsorbanice je od izuzetnog značaja u kvantitativnoj analizi jer omogućava analizu višekomponentnih smeša, u slučajevima kada analiti međusobno ne reaguju (*Todorović i sar.*, 1997). Radi pouzdanosti, eksperimente i očitavanja treba ponoviti. Kada se ponavlja ispitivanje uzorka, uobičajena su najmanje tri ponavljanja.

3.9. Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija (CV) je moćna i popularna elektrohemijaska tehnika koja se koristi za proučavanje mehanizama reakcije koji uključuju prenos elektrona. Metoda podrazumeva linearnu promenu potencijala elektrode od katodne granice do anodne granice i nazad, tj. od potencijala E_1 do potencijala E_2 i nazad do vrednosti E_1 tokom vremena, (slika 3.21), pri određenoj brzini skeniranja, uz praćenje struje koja se razvija u elektrohemijaskoj ćeliji.



Slika 3.21. Periodična promena potencijala sa vremenom kod ciklične voltametrije

Analiza se izvodi u uslovima u kojima je napon veći od onog predviđenog Nernst-ovom jednačinom (3.20)

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (3.20)$$

gde je:

E^0 – standardni elektrodni potencijal (V);

R – univerzalna gasna konstanta (8,314 J/molK);

T – termodinamička temperatura (K);

F – Faradejeva konstanta (96485 C/mol);

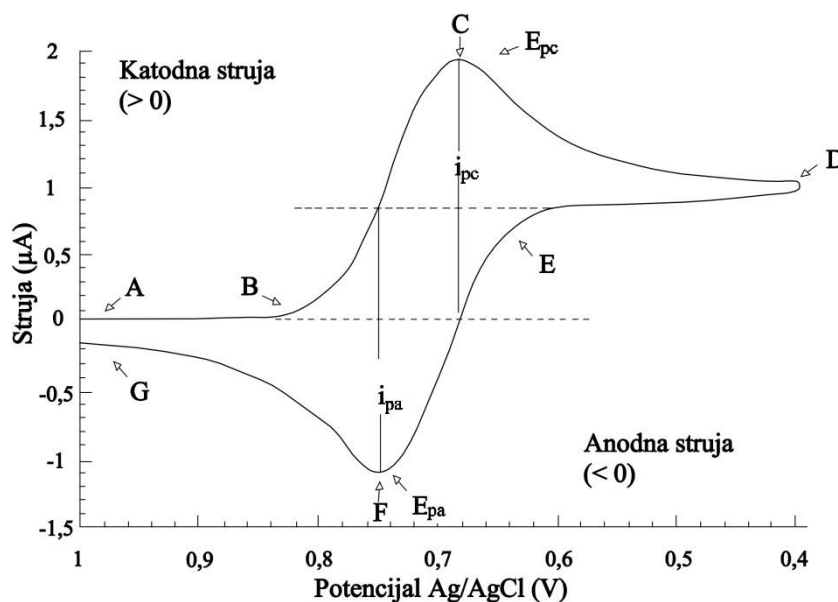
n – broj razmenjenih elektrona;

a_{ox} , a_{red} – aktivitet oksidovane, odnosno redukovane elektrohemijske vrste.

Analiza podrazumeva primenu periodične promene vrednosti potencijala koji se od spolja nameće na elektrodu uronjenu u rastvor elektrolita koji sadrži jedinjenje od interesa. Za proces oksidacije se elektrodni potencijal podešava tako da u rastvoru nema oksidacije, pa se potencijal menja prema pozitivnijim vrednostima, dok se za proces redukcije podešava tako da u rastvoru nema redukcije, a potencijal se menja prema negativnijim vrednostima.

Uslovi za elektrohemijsku polarizaciju nastaju kada se postigne izvesna vrednost potencijala, dovoljna da se aktivira neki elektrodni proces, pa struja počinje naglo da se povećava. Zatim se povećanje struje ublažava, doseže maksimum, i pada na početnu

vrednost. Grafički prikaz zavisnosti struje od potencijala je ciklični voltamogram (slika 3.22) (Mitić, 2008).



Slika 3.22. Izgled cikličnog voltamograma za reverzibilni redoks proces

Potencijal elektrode je dat jednačinom:

$$E_t = E_i - vt \quad (3.21)$$

gde je:

E_i – početni (inicijalni) potencijal elektrode;

v – brzina promene potencijala;

t – vreme.

Nakon što dostigne određenu maksimalnu vrednost (pik), posle određenog vremena, potencijal se obrće i znak vt se menja, pa je potencijal nakon promene smeru dat jednačinom:

$$E_t = E_i + vt \quad (3.22)$$

Postoje tri glavne karakteristike ciklične voltametrijske krive: struja pika (I_p), potencijal pika (E_p) i poluširina pika ($E_p - E_{p/2}$).

Struja pika je proporcionalna koncentraciji ispitivane elektrohemijske vrste, a zavisi od svih parametara u datom izrazu:

$$I_p = kn^{3/2}AD^{1/2}v^{1/2}c \quad (3.23)$$

gde je:

I_p – struja pika (A);

A – površina elektrode (cm^2);

D – difuzioni koeficijent (cm^2/s);

v – brzina promene potencijala (V/s);

c – koncentracija oksidovanog oblika (mol/dm^3).

Potencijal pika E_p , jednak je:

$$E_p = E_{1/2} - 1,109 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} - \frac{28,5}{n} mV \quad (3.24)$$

gde je $E_{1/2}$ polutaladni potencijal polarografskog talasa elektrohemijskog procesa.

Poluširina pika data je jednačinom:

$$E_p - E_{p/2} = 2,20 \frac{RT}{nF} = \frac{56,5}{n} mV \quad (3.25)$$

Za određivanje E_p se kao referentna tačka uzima potencijal koji odgovara polovini visine pika, $E_{p/2}$. $E_{p/2}$ je potencijal na kojem struja postiže polovinu svoje maksimalne vrednosti. Na osnovu jednačine 3.23. zapaža se da je parametar koji utiče na intenzitet struje brzina promene potencijala, tj. brzina skeniranja. Zato se u cilju optimizacije operativnih uslova kod ciklične voltametrije, vrši variranje brzine skeniranja, iz dva glavna razloga:

1) zbog uticaja na intenzitet struje, pri čemu se može videti da li je redoks proces kontrolisan difuzijom ili adsorpcijom (ako je struja proporcionalna kvadratnom korenu brzine skeniranja, proces se može smatrati difuziono kontrolisanim; ako je proporcionalna brzini skeniranja (linearno), onda je kontrolisan adsorpcijom);

2) zbog uticaja na potencijal, odakle se može zaključiti da li je proces reverzibilan ili ireverzibilan (brz ili spor prenos elektrona). U reverzibilnim procesima potencijal se ne menja sa strujom.

Elektrode koje se koriste u cikličnoj voltametriji su radna elektroda, referentna elektroda i pomoćna elektroda. Radna elektroda se može posmatrati kao medijum čija se reduktivna ili oksidativna snaga može eksterno prilagoditi veličinom primenjenog potencijala. Kako se potencijal linearno povećava ili smanjuje u odnosu na vreme, radna elektroda postaje jači oksidant, odnosno reduktor. Zbog toga radna elektroda, koja se tipično sastoji od hemijski inertnog provodnog materijala, poput platine, deluje kao donator ili akceptor elektrona. Referentna elektroda, srebro/srebrohloridna ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$) ili kalomelova ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$), ima potencijal dovoljno konstantan da se može smatrati referentnim, a u odnosu na koji će biti meren potencijal radne elektrode. Potencijal se meri

između referentne i radne elektrode, a struja se meri između radne i pomoćne elektrode. Upotrebljava se pomoćna elektroda koja omogućava precizna merenja između radne i referentne elektrode. Uloga pomoćne elektrode je da osigura da struja ne prolazi kroz referentnu elektrodu jer bi takav tok promenio potencijal referentnih elektroda. Promena potencijala od početnog do konačnog vrši se pomoću generatora signala. Napon se na radnu elektrodu primenjuje pomoću potenciostata, koji je spoljni izvor napajanja (*Elgrishi i sar.*, 2018).

3.10. Statističke metode analize

3.10.1. Klaster analiza

Klaster analiza (eng. *Cluster analysis* – CA), predstavlja skup alata i algoritama koji se koristi za klasifikaciju različitih podataka u grupe tako da je sličnost između njih maksimalna ako pripadaju istoj grupi, a u suprotnom minimalna. U biologiji, klaster analiza je bitan alat za taksonomiju (klasifikaciju živih i izumrlih organizama). U kliničkoj medicini može se koristiti za identifikaciju pacijenata koji imaju bolesti sa zajedničkim uzrokom, pacijenata koji bi trebalo da dobiju isti tretman ili pacijenata koji bi trebalo da imaju isti nivo odgovora na terapiju. U epidemiologiji, klaster analiza ima primenu u pronalaženju smislenih konglomerata regija, zajednica ili naselja sa sličnim epidemiološkim profilima kada su uključene mnoge varijable, a prirodne grupe ne postoje.

Kad god je potrebno klasifikovati velike količine informacija u mali broj značajnih kategorija, klaster analiza može biti korisna. Istraživači se često suočavaju sa zadatkom da razvrstavaju posmatrane podatke u smislene strukture. Klaster analiza je induktivna istraživačka tehnika u smislu da otkriva strukture bez objašnjenja razloga za njihovo postojanje. To je tehnika koja generiše hipoteze, a ne tehnika za testiranje hipoteza. Za razliku od diskriminatorne analize, gde se objekti dodeljuju već postojećim grupama na osnovu statističkih pravila raspodele, klaster analiza generiše grupe ili otkriva skrivenu strukturu grupa unutar podataka.

Tehnike analize klastera mogu se klasifikovati kao hijerarhijske, ako rezultujuće grupisanje ima sve veći broj ugnežđenih klasa koje liče na filogenetsku klasifikaciju, ili nehijerarhijske, ako su rezultati izraženi kao jedinstvena particija čitavog skupa objekata.

Hijerarhijski algoritmi mogu biti razdelni ili aglomerativni. Metoda razdvajanja počinje sa svim slučajevima u jednoj grupi. Taj klaster se postepeno razlaže na sve manje. Aglomerativne tehnike obično počinju jednočlanim klasterima koji se sukcesivno spajaju sve dok se ne formira jedan veliki klaster. U početnom koraku, dva objekta sa najmanjom udaljenošću (ili najvećom sličnošću) se kombinuju u grupu. U sledećem koraku identifikuje se i proučava objekat sa najmanjom udaljenošću do bilo koje od prve dve. Ako je bliže četvrtom objektu nego bilo kom od prva dva, treći i četvrti objekat postaju druga grupa od dva slučaja; u suprotnom, treći objekat je uključen u prvu grupu. Proces se ponavlja, dodavanjem slučajeva postojećim klasterima, stvaranjem novih klastera ili kombinovanjem onih koji su se pojavili sve dok svaki objekat nije ispitan i dodeljen jednom klasteru ili sam po sebi ne predstavlja zasebni klaster.

Udaljenost i sličnost su ključni pojmovi u kontekstu klaster analize. Većina algoritama, posebno oni koji daju hijerarhijske particije, počinju sa matricom udaljenosti ili sličnosti. Unosi ćelija u ovu matricu su udaljenosti ili sličnosti između parova objekata. Postoji mnogo vrsta udaljenosti, od kojih je najčešća Euklid-ova. Euklid-ova udaljenost (d) između bilo koja dva objekta (a , b) je kvadratni koren zbira kvadrata razlika između svih koordinata vektora (x , y) koji definišu svaki objekat:

$$d((a, b), (x, y)) = \sqrt{(x - a)^2 + (y - b)^2} \quad (3.26)$$

Može se koristiti za varijable merene na intervalnoj skali. Kada se za izračunavanje udaljenosti koriste dve ili više promenljivih, dominiraće promenljiva veće veličine. Da bi se to izbeglo, uobičajena je praksa da se prvo standardizuju sve promenljive. Izbor tipa udaljenosti ključan je za sve hijerarhijske algoritme grupisanja i zavisi od prirode promenljivih i očekivanog oblika klastera. Na primer, Euklidova udaljenost teži stvaranju sfernih jata (*Gallestey, 2020*).

3.10.2. Analiza glavnih komponenti

Veliki skupovi podataka su sve rasprostranjeniji u mnogim disciplinama. Za tumačenje takvih skupova podataka, metode zahtevaju drastično smanjenje dimenzionalnosti na interpretativan način, takav da većina informacija u podacima biva

sačuvana. Jedna od najstarijih i najčešće korišćenih tehnika za ovu svrhu je analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis* – PCA).

PCA je metoda koja se često koristi za smanjenje dimenzionalnosti velikih skupova podataka, pretvaranjem velikog skupa promenljivih u manji koji i dalje sadrži većinu informacija u velikom skupu. Smanjivanje broja promenljivih skupa podataka prirodno dolazi na račun tačnosti, ali cilj smanjenja dimenzija je u tome da se zarad jednostavnosti žrtvuje malo tačnosti, budući da je manje skupove podataka lakše istraživati, tumačiti i vizualizovati, a analizu podataka učiniti mnogo lakšom i bržom za algoritme mašinskog učenja.

Potrebno je prvo standardizovati opseg kontinuiranih početnih promenljivih tako da svaka od njih podjednako doprinese analizi, pošto je PCA prilično osetljiva u pogledu varijacija početnih promenljivih. To jest, ako postoje velike razlike između opsega početnih promenljivih, te promenljive sa većim opsezima će dominirati nad onima sa malim opsezima (npr. promenljiva koja se kreće između 0 i 100 dominiraće nad promenljivom koja se kreće između 0 i 1), što će dovesti do pristrasnih rezultata. Dakle, pretvaranje podataka u uporedive veličine može sprečiti ovaj problem (*Miller i Miller, 2005*). Matematički, to se može učiniti oduzimanjem srednje vrednosti i deljenjem sa standardnom devijacijom za svaku vrednost svake promenljive, prema dole navedenoj jednačini:

$$z = \frac{\text{dobijena vrednost} - \text{srednja vrednost}}{\text{standardna devijacija}} \quad (3.27)$$

Zatim je potrebno razumeti kako se promenljive ulaznog skupa podataka razlikuju od srednje vrednosti jedna prema drugoj, da bi se videlo da li postoji neka veza među njima, zato što su ponekad promenljive visoko povezane tako da sadrže suvišne informacije. Dakle, da bi ove korelacije bile utvrđene, treba formirati matricu kovarijanse. Kovarijantna matrica je $p \times p$ simetrična matrica (gde je p broj dimenzija) koja za unos ima kovarijanse povezane sa svim mogućim parovima početnih promenljivih. Na primer, za trodimenzionalni skup podataka sa 3 promenljive x , y i z , matrica kovarijanse je matrica 3×3 (slika 3.23):

$$\begin{array}{ccc} \text{Kov}(x, x) & \text{Kov}(x, y) & \text{Kov}(x, z) \\ \text{Kov}(y, x) & \text{Kov}(y, y) & \text{Kov}(y, z) \\ \text{Kov}(z, x) & \text{Kov}(z, y) & \text{Kov}(z, z) \end{array}$$

Slika 3.23. Matrica kovarijanse za trodimenzionalni skup podataka

Pošto je kovarijansa promenljive sa samom sobom njena varijansa ($\text{Kov}(a, a) = \text{Var}(a)$), u glavnoj dijagonali (gore levo, dole desno) zapravo postoje varijanse svake početne promenljive. A pošto je kovarijansa komutativna ($\text{Kov}(a, b) = \text{Kov}(b, a)$), unosi matrice kovarijanse su simetrični u odnosu na glavnu dijagonalu, što znači da su gornji i donji trougaoni delovi jednaki. Znak kovarijanse je ono što je važno: ako je pozitivan, dve varijable se zajedno povećavaju ili smanjuju (proporcionalno), ako je negativan tada se jedna povećava kada se druga smanjuje (obrnuto proporcionalno).

Eigen vektori i Eigen vrednosti su koncepti linearne algebre koje se izračunavaju iz matrice kovarijanse da bi bilo moguće odrediti glavne komponente podataka. Glavne komponente su nove promenljive, bez nepotrebnih podataka, koje su konstruisane kao linearne kombinacije početnih promenljivih. Ove kombinacije su izvršene na takav način da nove promenljive (tj. glavne komponente) nisu povezane i da se većina informacija unutar početnih promenljivih koncentriše u prve komponente. Dakle, ideja je da 10-dimenzionalni podaci daju 10 glavnih komponenti, ali PCA analizom se u prvu komponentu (PC1) smešta maksimalni udeo ukupnih promenljivih, zatim maksimalno preostale informacije u drugu komponentu (PC2) i tako dalje, sve dok se ne dobije 100% varijansi u zbiru.

4. Eksperimentalni deo

4.1. Uzorci

Tri sorte jagode, pet sorti kupina, tri sorte borovnice i četiri sorte maline prikupljene su sa različitih plantaža iz dva regiona u Srbiji, u periodu od maja do avgusta 2015. godine (tabela 4.1). Ubrano je oko 500 g od svake sorte voća. Uzorci su pre analize čuvani u zamrzivaču na -18°C .

Tabela 4.1. Vrste uzoraka i geografsko poreklo

Vrsta voća	Sorta voća	Oznaka uzorka	Period branja	Geografsko poreklo
Jagoda	Čačanska rana	J1	Maj	Zapadna Srbija
	Alba	J2	Maj	Zapadna Srbija
	Zenga Zengana	J3	Jun	Južna Srbija
Kupina	Čačanska bestrna	K1	Avgust	Zapadna Srbija
	Triple Crown	K2	Avgust	Zapadna Srbija
	Čačanska bestrna	K3	Avgust	Južna Srbija
	Thorn free	K4	Avgust	Južna Srbija
	Divlja kupina	K5	Avgust	Južna Srbija
Borovnica	Drejper	B1	Jul	Zapadna Srbija
	Hjuron	B2	Jul	Zapadna Srbija
	Divlja borovnica	B3	Avgust	Južna Srbija
Malina	Miker	M1	Jul	Zapadna Srbija
	Polana	M2	Jul	Južna Srbija
	Vilamet	M3	Jul	Južna Srbija
	Maling Promis	M4	Jul	Južna Srbija

4.2. Reagensi

- Argon (99,999%);
- Azotna kiselina (65%) (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Acetonitril (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Askorbinska kiselina (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Aceton (Merck[®], KGaA, Darmstadt, Nemačka);
- AlCl₃ (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS, Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- Cijanidin-3-*O*-glukozid hlorid (Extrasynthese, Genay Cedex, Francuska);
- CRM – sertifikovan referentni materijal (borovnice, NIST 3287) (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD);
- Dejonizovana voda ($\kappa = 0,05 \mu\text{S}/\text{cm}$);
- Delfinidin-3-*O*-glukozid hlorid (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- Etanol (J. T. Baker, Deventer, Holandija);
- Elaginska kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- FeSO₄x6H₂O (Acros Organics, Morris Plains, New Jersey, SAD);
- FeCl₃x6H₂O (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Ferulna kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- Galna kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- Glukoza (Merck[®], KGaA, Darmstadt, Nemačka);
- Hlorovodonična kiselina (Merck[®], KGaA, Darmstadt, Nemačka);
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, Acros Organics, Geel, Belgija);
- (+)-katehin (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- Kafena kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- *p*-Kumarna kiselina (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);
- Kalijum-hlorid (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- K₂S₂O₈ (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- K₃[Fe(CN)₆] (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Malvidin-3-glukozid hlorid (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka);

- Metanol (Merck[®], KGaA, Darmstadt, Nemačka);
- Mravlja kiselina (Merck[®], KGaA, Darmstadt, Nemačka);
- Multielementni standard (Ultra scientific analytical solutions, SAD), (30 elemenata, 20,00±0,10 ppm, osim P, K i Si koncentracije 100,0±0,5 ppm i Ag koncentracije 5,000±0,025 ppm, matriks je 2% HNO₃ i tragovi vinske kiseline);
- Natrijum-acetat (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Natrijum-karbonat (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Natrijum-nitrit (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Natrijum-hidroksid (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Natrijum-hidrogenfosfat (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Natrijum-dihidrogenfosfat (Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Pektin (Smeša za želiranje i konzerviranje marmelada, džemova i želea - Dr Oetker džemfix 3:1);
- Saharoza (Merck[®], KGaA, Darmstadt, Nemačka);
- Sirćetna kiselina (J. T. Baker, Deventer, Holandija);
- Trihlorsirćetna kiselina (TCA, Merck[®], Darmstadt, Nemačka);
- Vodonik-peroksid (30%) (Fluka, Buchs, Švajcarska);

4.3. Aparati i pribor

- ICP-OES spektrometar iCAP 6300 Duo ICP-OES (Thermo Scientific, Cambridge, UK), sa ešelnom rešetkom (52,91 zarez po milimetru, 63,5° ugao sjaja). Raspršivač je ultrazvučni (Cetac U-6000 AT+);

- Mikrotalasna peć Milestone ETHOS one Advanced Microwave Digestion System (Milestone, Bergamo, Italija);

- Ciklični voltametar CHI760B (CH instruments, Inc., Austin, TX SAD). Čelija je opremljena radnom elektrodom od staklastog ugljenika (Glass Carbon Electrode, CHI104, 2 mm), pomoćnom platinskom elektrodom (CHI221, r=1 mm, A=3,14 mm²), i referentnom srebro/srebrohloridnom elektrodom (Ag/AgCl) (CHI111);

- HPLC Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, USA) opremljen pumpom (G1354A), automatskim injektorom (G1329A), termostatiranim kolonskim delom (G1316A), UV/Vis detektorom (G1315D) i fluorescentnim detektorom (G1321A);

- UV/Vis spektrofotometar Perkin-Elmer Lambda 15 sa dužinom optičkog puta 1 cm;
- Dejonizator (MicroMed high purity water system) (TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka);
- Analitička vaga AB-204-S (Mettler Toledo, Nemačka);
- pH metar (Hanna Instruments, USA) sa staklenom elektrodom;
- Varijabilne automatske pipete (Lab Mate+, PZ HTL S.A., Warszawa, Poljska);
- Električni štapni blender;
- Ultrazvučno kupatilo (Bandelin SONOREX®, Sigma, USA);
- Rotacioni vakuum uparivač (IKA RV 05 basic, Werke, Nemačka);
- Termostat, Julabo MP 5A (JULABO, SAD);
- Staklene čaše, epruvete, erlenmajeri, kvalitativni i kvantitativni levkovi za ceđenje, stakleni baloni sa okruglim dnom, stakleni štapići, normalni sudovi, plastične sterilne bočice, laboratorijski termometar, filter papir kvalitativni i kvantitativni (Grade 42 Quantitative Filter Paper Ashless, dia 185 mm, Whatman, Cytiva Europe GmbH).

4.4. Mineralizacija uzoraka i operativni uslovi za ICP-OES analizu

Za potpunu mineralizaciju uzoraka voća, 2 g (sa tačnošću na četiri decimale) zamrznutog voća je odmereno i pomešano sa 5 ml koncentrovane azotne kiseline i 1 ml 30% vodonik-peroksida. Sadržaj je prenet u mikrotalasnu peć. Temperaturni program je bio sledeći: zagrevanje do 180 °C u trajanju od 10 minuta, a zatim konstantno grejanje na istoj temperaturi 15 minuta. Uzorci su nakon hlađenja profiltrirani kroz kvantitativni filter papir i razblaženi sa 0,5% HNO₃ do zapremine od 50 ml. Do početka analize, uzorci su čuvani u plastičnim bočicama na 4 °C. Slepa proba je pripremljena na identičan način.

Snaga radiofrekventnog generatora je varirana od 750 W do 1300 W u intervalu od 100 W. Brzina gasa za raspršivanje je povećavana od 0,5 l/min do 1,5 l/min, u intervalu od 0,5 l/min. Primenjen je aksijalni i radijalni mod posmatranja plazme. Izabrani su najbolji parametri pri kojima je odnos intenziteta linija magnezijuma Mg (II) 280,270 nm/Mg (I) 285,213 nm veći od 10 (*Mermet*, 1991).

4.5. HPLC i spektrofotometrijska analiza

Uzorci voća su štapnim blenderom usitnjeni u homogenu voćnu kašu. Odmereno je 2 g voća (sa tačnošću na četiri decimale), preliveno sa 5 ml rastvarača (zakišeljani 80% metanol, metanol, 96% etanol, 60% etanol, aceton, voda), a zatim je primenjena ultrazvučna ekstrakcija u trajanju od 15 minuta, na 20 °C. Postupak je ponovljen još tri puta. Supernatan je odekantovan, filtriran kroz plavu traku (Whatman, Grade 42 Quantitative Filter Paper Ashless, dia 185 mm) u normalni sud od 25 ml i dopunjen do crte odgovarajućim rastvaračem.

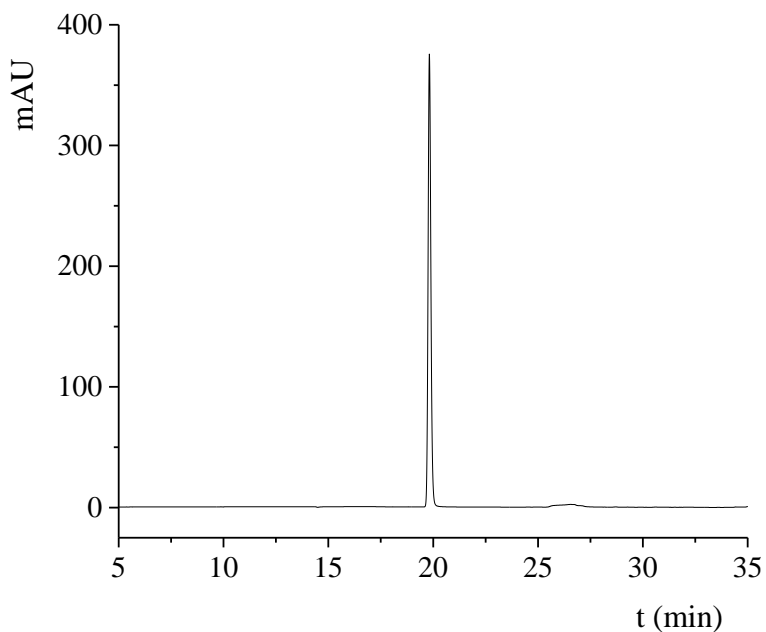
U cilju praćenja kinetike termičke degradacije ukupnih i pojedinačnih antocijana, pripremljene su dve vrste džema od svake vrste voća - sa većim i manjim sadržajem šećera, prema malo izmenjenoj metodi predloženoj od strane *Moura i saradnika* (2012). Džem sa većim sadržajem šećera je sadržao 60% voćne kaše, 30% saharoze, 9,8% glukoze i 0,2% pektina. Džem sa manjim sadržajem šećera je sadržao 94,2% voćne kaše, 5% saharoze i 0,8% pektina. Uzorci su zagrevani na temperaturama od 90, 95, 100 i 105 °C. Temperatura je kontrolisana korišćenjem laboratorijskog termometra (± 1 °C). Kada su postignuti izotermalni uslovi, uzorci su uzimani u pravilnim vremenskim intervalima (5, 10, 15, 20 i 30 minuta) i odmah hlađeni na ledu kako bi se zaustavila dalja termička degradacija.

Pet grama džema (sa tačnošću na četiri decimale) odmereno je i ekstrahovano sa 5 ml zakišeljelog metanola, na ultrazvučnom kupatilu, 15 min na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je odekantovan, a čvrsti ostatak je još tri puta ekstrahovan na isti način. Dobijeni ekstrakti su sjedinjeni i upareni do suva na 40 °C u rotacionom vakuum uparivaču. Zatim je uzorcima dodato 10 ml dejonizovane vode i rastvori su dalje analizirani.

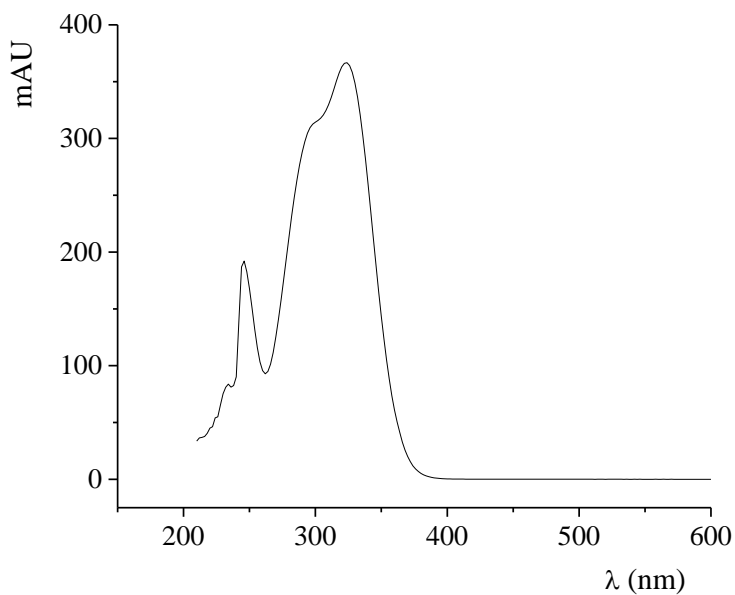
4.5.1. HPLC metoda za određivanje pojedinačnih polifenolnih jedinjenja

Hromatografsko razdvajanje je izvršeno prema metodi *Mitić i sar.* (2012) na koloni Agilent-Eclipse XDB C-18 4.6×150 mm, uz sistem rastvarača A (5% vodeni rastvor mravlje kiseline) i rastvarača B (80% acetonitrila/ 5% mravlje kiseline). Kolona je termostatisana na 30 °C. Injektovano je 5 μ l uzorka. Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-10 min, 0% B; 10-28 min 0-25% B, 28-30 min 25% B; 30-35 min 25-50% B, 35-40 min 50-80% B i poslednjih 5 min 80-0% B.

Identifikacija pojedinačnih polifenolnih jedinjenja izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenima i spektrima standarda (slike 4.1-4.11) i literaturnih podataka.

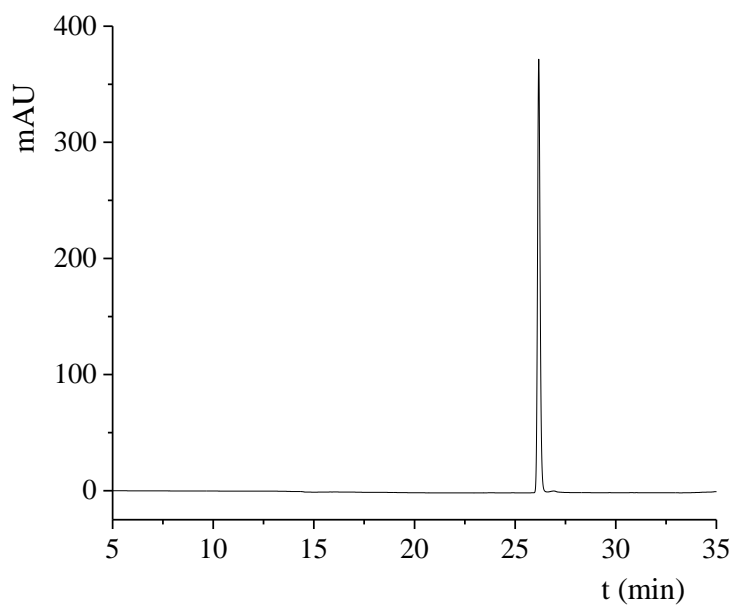


a)

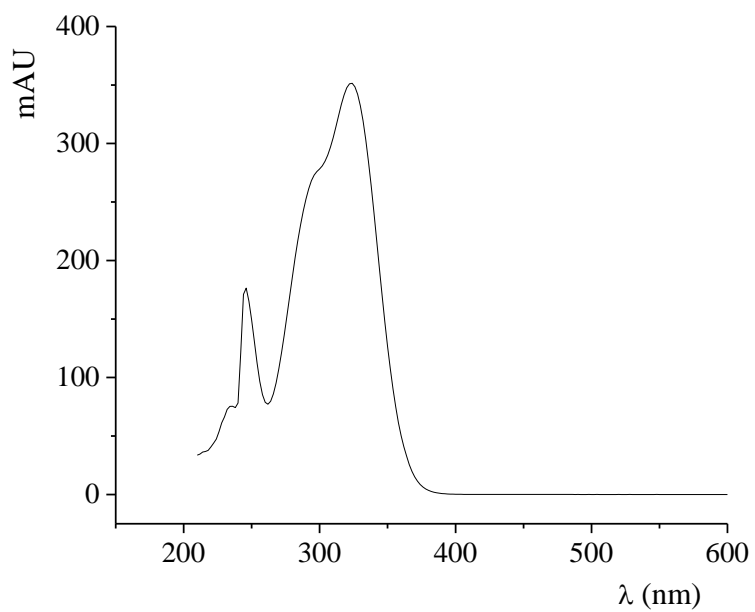


b)

Slika 4.1. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda kafene kiseline (320 nm)

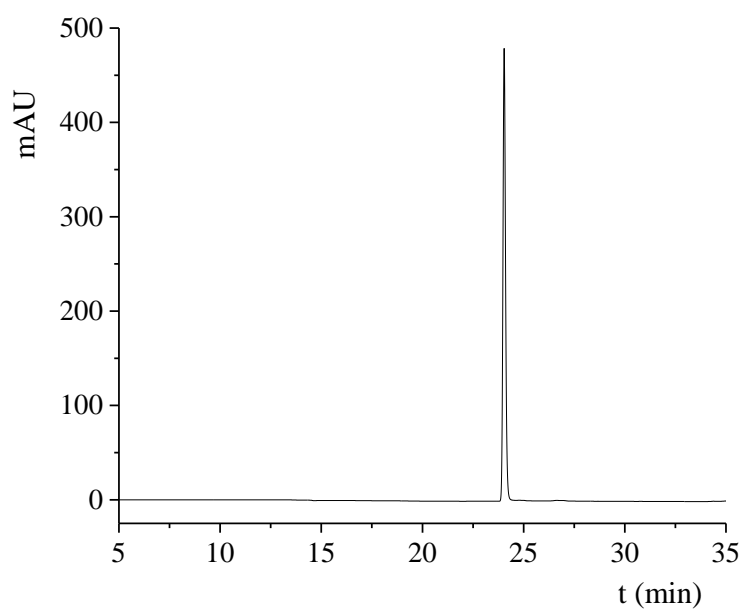


a)

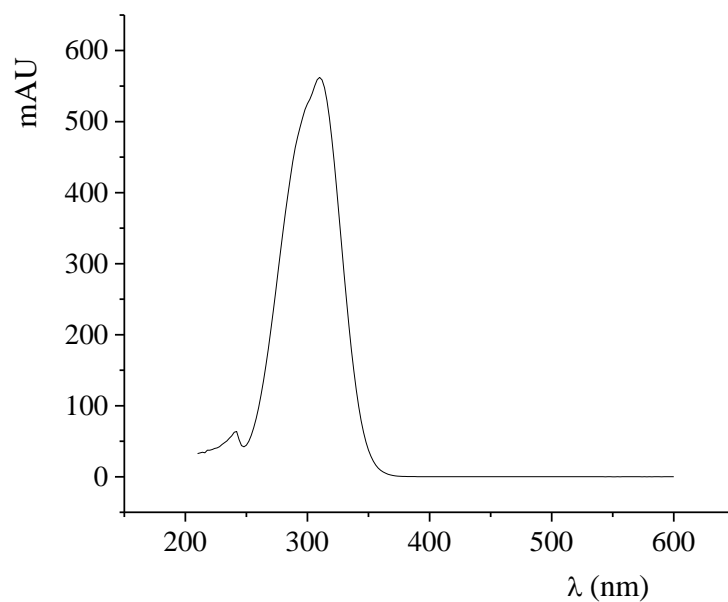


b)

Slika 4.2. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda ferulne kiseline (320 nm)

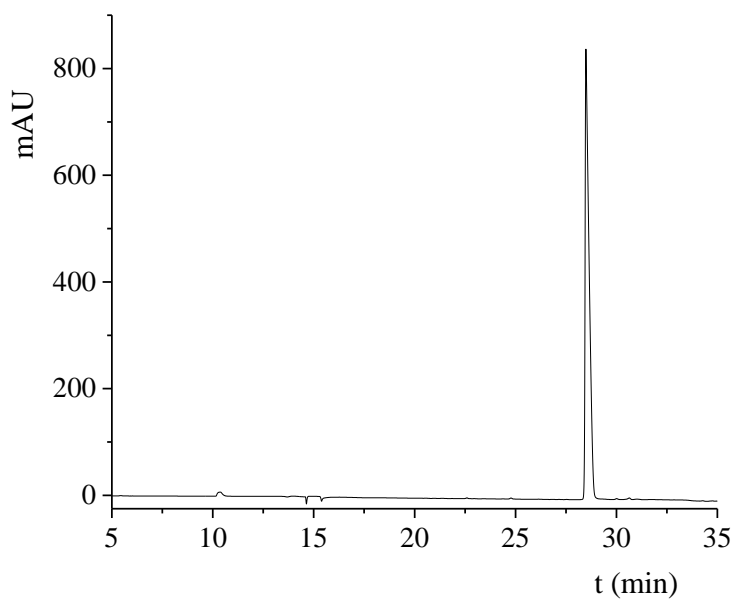


a)

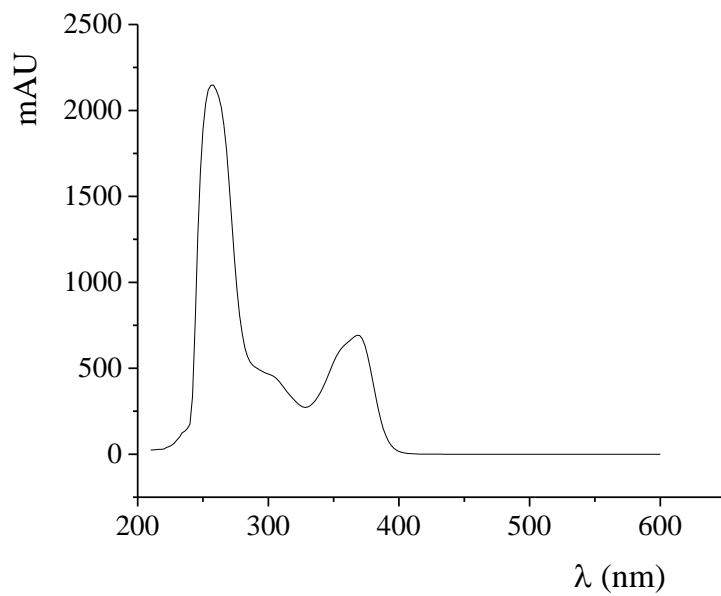


b)

Slika 4.3. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda *p*-kumarne kiseline
(320 nm)

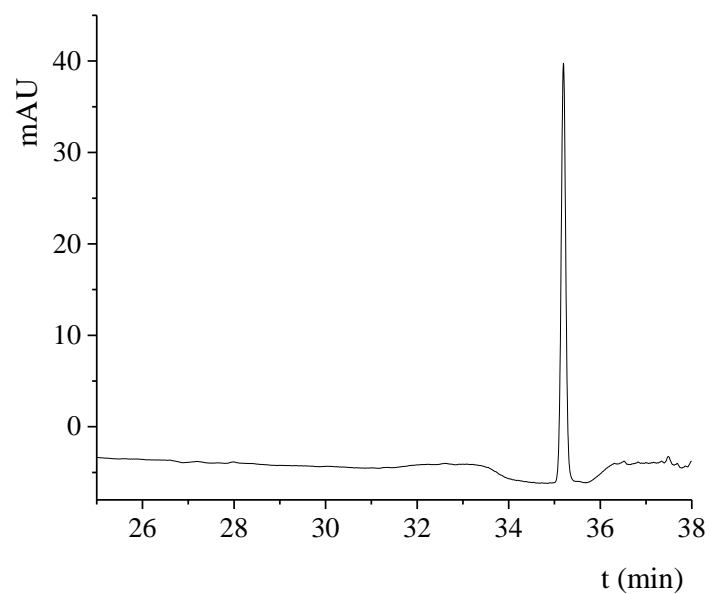


a)

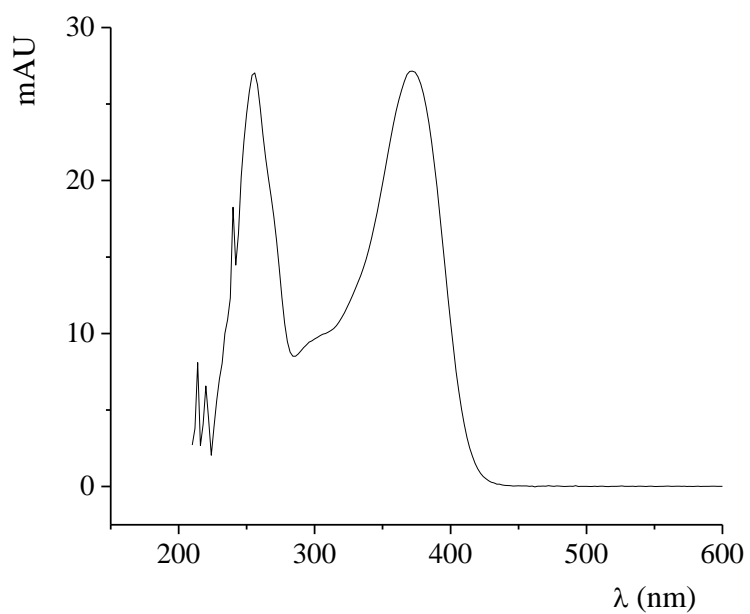


b)

Slika 4.4. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda elaginske kiseline
(280 nm)

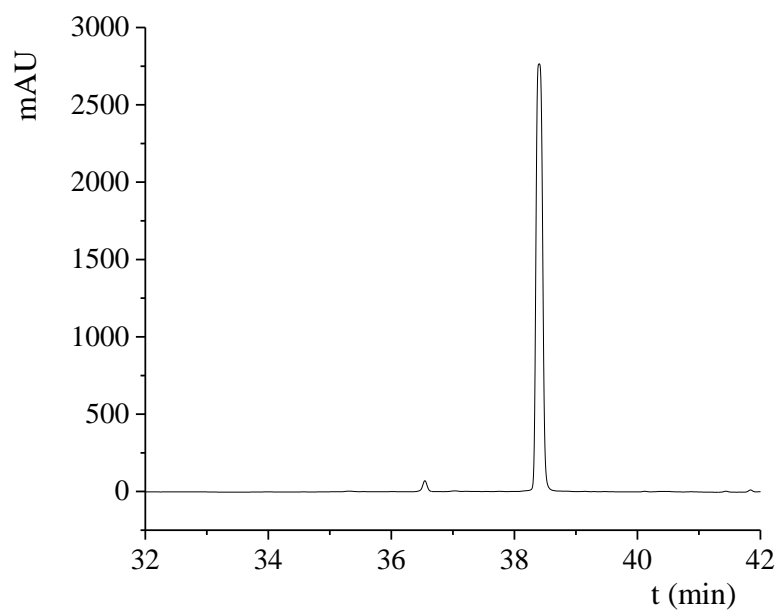


a)

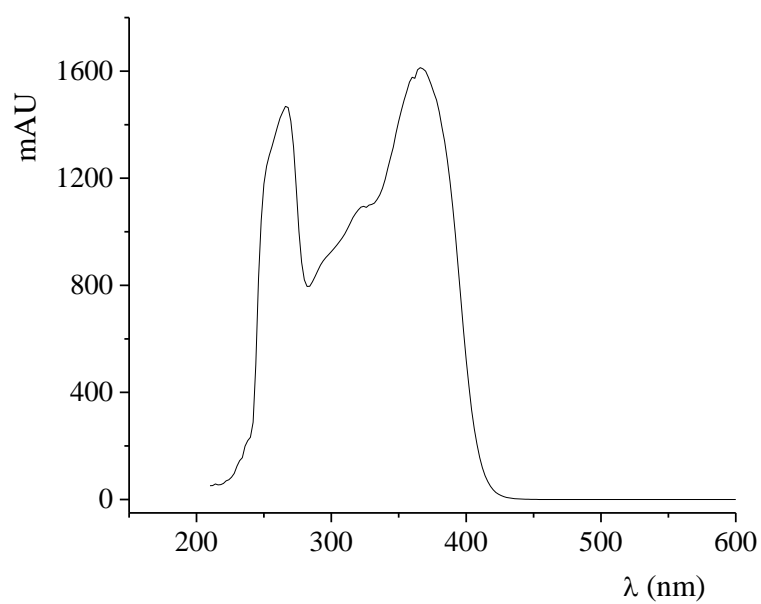


b)

Slika 4.5. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda kvercetina (360 nm)

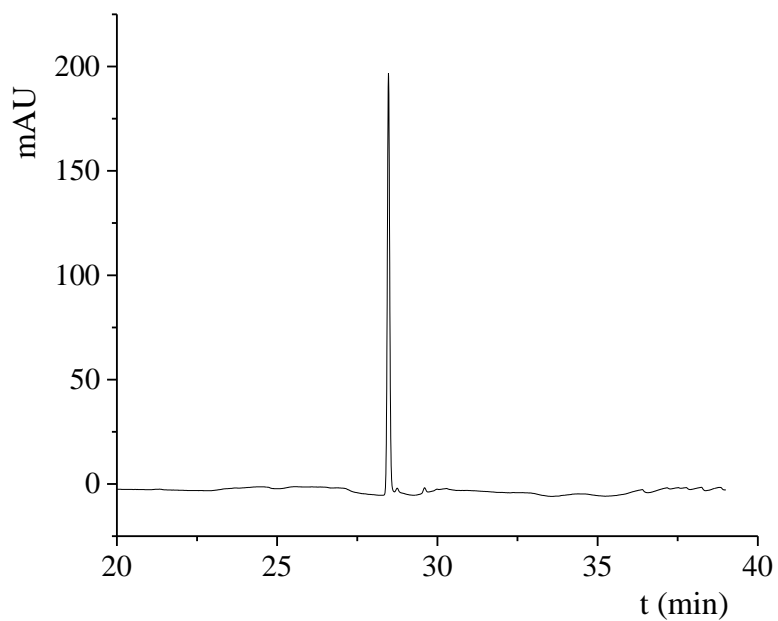


a)

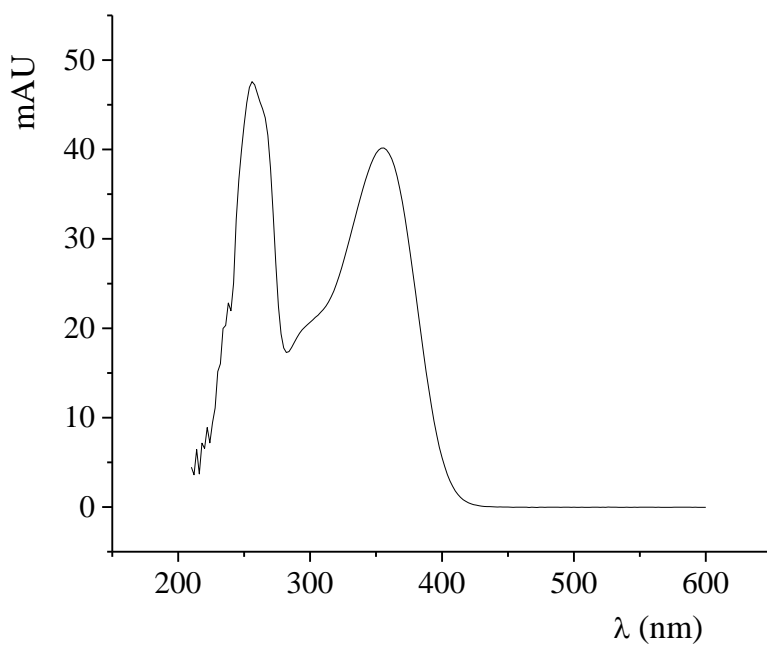


b)

Slika 4.6. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda kemferola (360 nm)

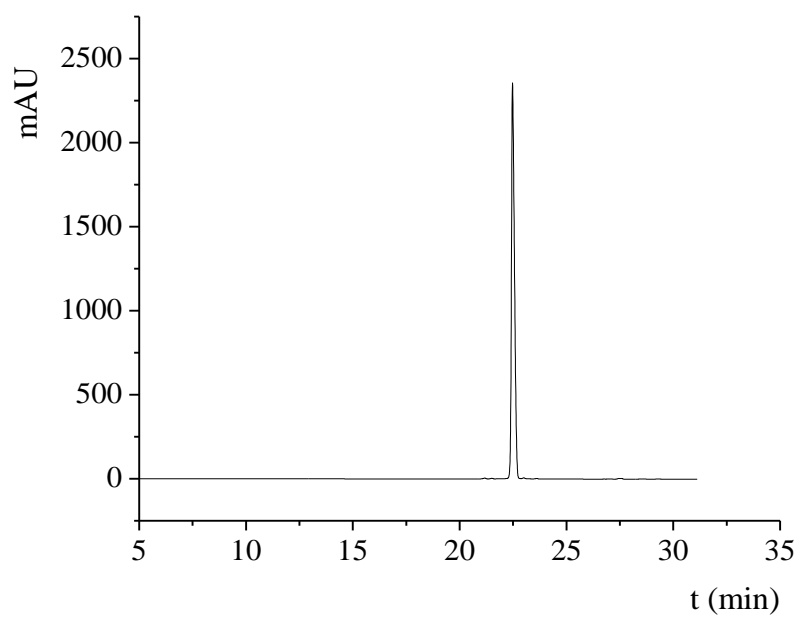


a)

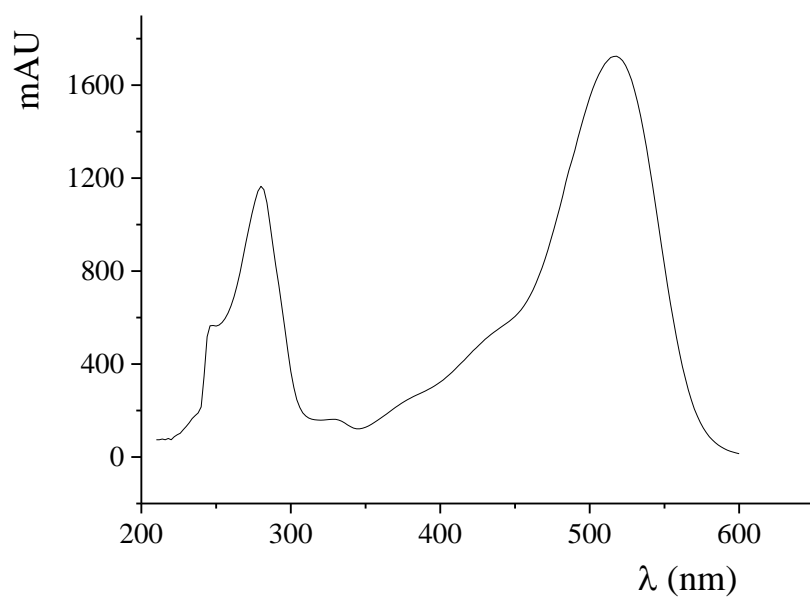


b)

Slika 4.7. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda rutina (360 nm)

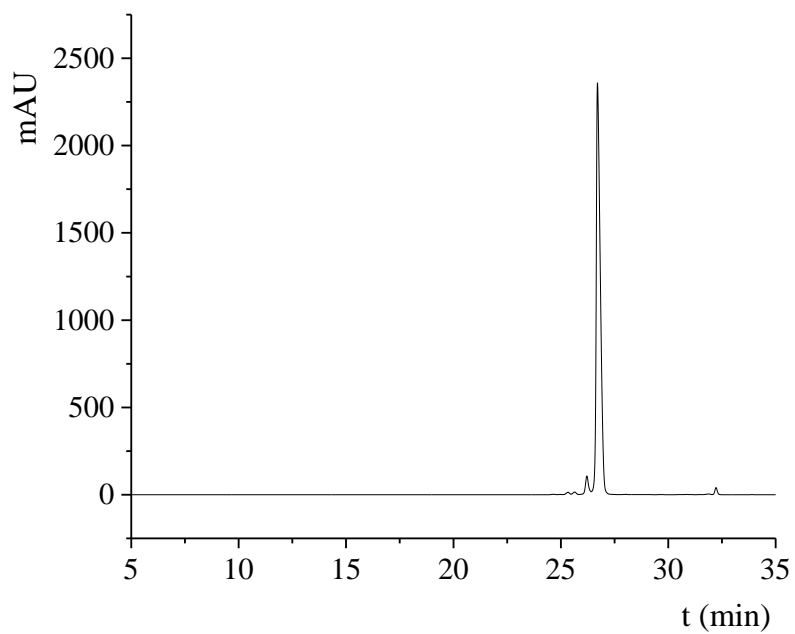


a)

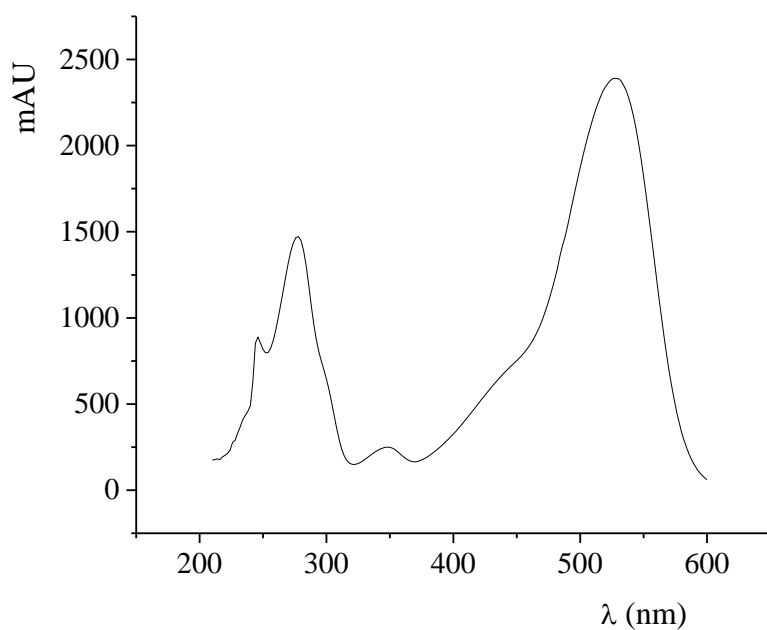


b)

Slika 4.8. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda cijanidin-3-glukozida (520 nm)

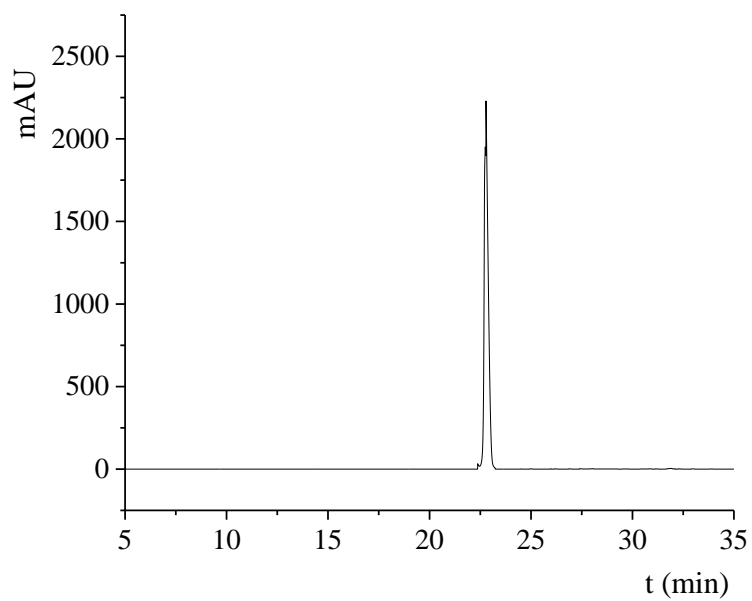


a)

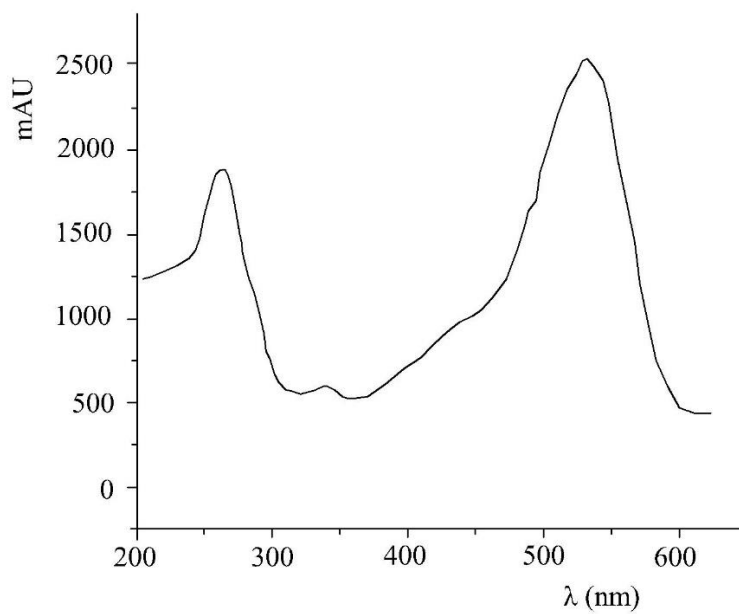


b)

Slika 4.9. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda malvidin-3-glukozida (520 nm)

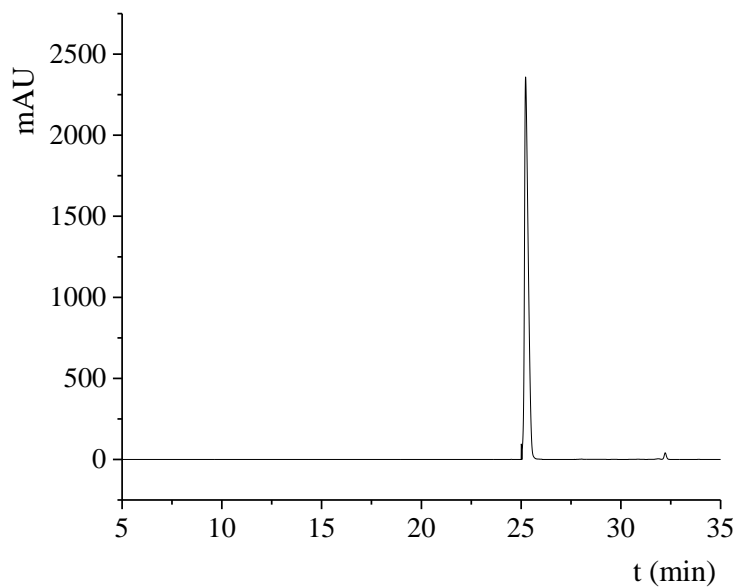


a)

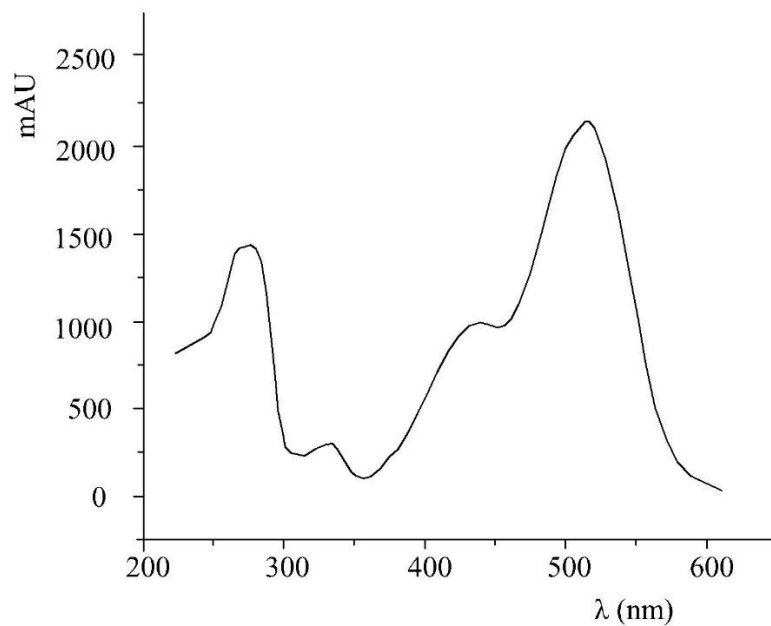


b)

Slika 4.10. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda delphinidin-3-glukozida (520 nm)



a)



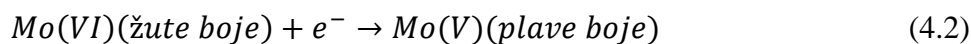
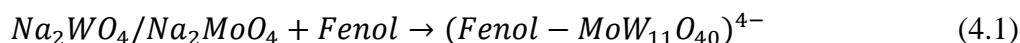
b)

Slika 4.11. HPLC hromatogram (a) i UV/Vis spektar (b) standarda pelargonidin-3-glukozida (520 nm)

4.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja metodom Folin-Ciocalteu

Godine 1912. profesor Otto Folin i Villei Glover Denis su pokazali da se reagensi fosfomolibdenske kiseline ($H_3PMo_{12}O_{40}$) i fosfovolframove kiseline ($H_3PW_{12}O_{40}$) mogu koristiti za kvalitativno određivanje polifenolnih jedinjenja u urinu čoveka čak i nakon nekoliko dana gladovanja (*Folin i Denis*, 1912). Kasnije, 1927., Otto Folin i Vintil Ciocalteu, predložili su upotrebu smeše $H_3PMo_{12}O_{40}$ i $H_3PW_{12}O_{40}$, tj. Folin-Ciocalteu (F-C) reagensa u alkalnim uslovima za određivanje tirozina i triptofana, aminokiselina sa fenolnim prstenom i redukcionim svojstvima (*Folin i Ciocalteu*, 1927). Primenom ovog reagensa moguće je kvantitativno određivanje polifenolnih jedinjenja spektrofotometrijski na 760 nm, budući da u alkalnim uslovima oksovolframati i oksomolibdati nastali u ovoj redoks reakciji daju plavu boju proporcionalnu koncentraciji polifenolnih jedinjenja.

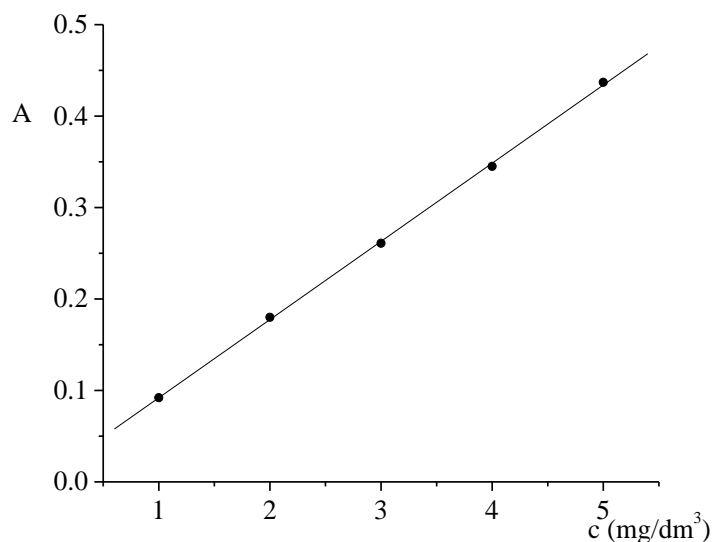
Međutim, reakcija nije specifična za polifenolna jedinjenja, budući da prema F-C reagensu reaktivnost ispoljavaju i tioli, vitamini, aminokiseline, proteini, nukleotidne baze, nezasićene masne kiseline, ugljeni hidrati, organske kiseline, kompleksi metala, gliceraldehid i dihidroksiacetone, kao i nukleotidne baze (*Everette i sar.*, 2010).



U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- osnovni rastvor galne kiseline (50 mg/cm^3) u smeši vode i etanola (10:1 v/v),
- F-C reagens,
- Na_2CO_3 (20% m/v).

Za potrebe kvantifikacije polifenolnih jedinjenja, konstruisana je kalibraciona prava galne kiseline u vodeno-etanolnom rastvoru (slika 4.12), koja je linearna u opsegu koncentracija od 1 do 5 mg/dm^3 .



Slika 4.12. Kalibraciona prava galne kiseline za određivanje ukupnih polifenolnih jedinjenja

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: 0,5 ml ekstrakta prethodno pripremljenog uzorka jagodastog voća je pomešano sa 0,5 ml F-C reagensa i 2 ml 20% rastvora Na_2CO_3 u normalnom sudu od 10 ml, a potom je isti dopunjen dejonizovanom vodom do crte. Apsorbanca je merena na 760 nm nakon termostatiranja rastvora 2 sata na 20 °C (*Singleton i sar.*, 1999; *Stratil i sar.*, 2006). Nakon merenja, sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izračunat je na osnovu jednačine prave (4.3) i izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu uzorka (mg GAE/g).

$$A = 0,0855 \times c_x + 0,0065; r^2 = 0,9994 \quad (4.3)$$

gde je:

r^2 – koeficijent determinacije,

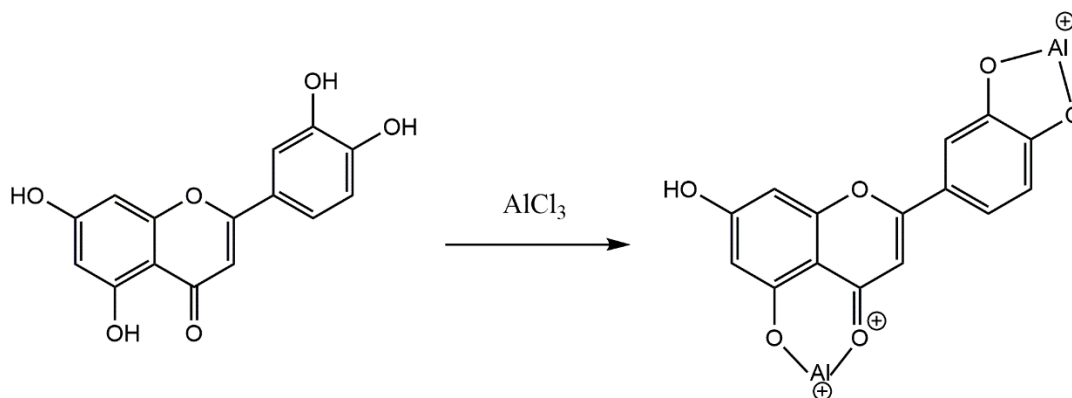
c_x – koncentracija galne kiseline.

4.5.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sposobnost flavonoida da se koordinativno vezuju sa jonima metala se može primeniti u razvoju preparativnih i analitičkih metoda. Obećavajuća strategija razvijena za razlikovanje izomera flavonoida pomoću tandem masene spektrometrije zasniva se na kompleksiranju flavonoida sa jonima prelaznih metala (*Ilboudo i sar.*, 2012; *March i*

Brodbelt, 2008). Neka flavonoidna jedinjenja, posebno flavonoli, fluoresciraju nakon pobuđivanja vidljivom ili UV svetlošću zbog njihove molekulske strukture i elektronske konfiguracije. Više ili manje planarni, kruti prstenovi sa sistemom konjugovanih dvostrukih veze i delokalizovanim π elektronima čine molekule visoko osetljivim na kolorimetrijske i fluorimetrijske reagense u analitičkoj hemiji. Helacija određenih jona metala često utiče na fluorescenciju na specifičan način koji može biti izmeren i primenjen za kvantitativno određivanje flavonoida ili jona metala (Kasprzak i sar., 2015).

Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih flavonoida izvršeno je po metodi datoj od strane Zhishen i saradnika (1999), gde dolazi do kompleksiranja flavonoida jonima aluminijuma Al^{3+} (slika 4.13) a apsorbanca nastalog kompleksa je merena na 510 nm.



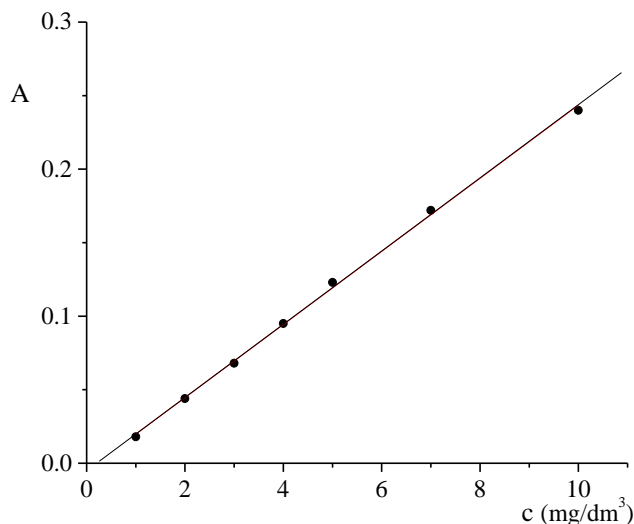
Slika 4.13. Kompleksiranje flavonoida jonima aluminijuma

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- standardni rastvor (+)-katehina ($0,5 \text{ mg/cm}^3$),
- AlCl_3 (1% *m/v*),
- NaNO_2 (5% *m/v*),
- NaOH (1 mol/dm^3).

Za potrebe kvantifikacije ukupnih flavonoida, razblaživanjem osnovnog rastvora katehina, konstruisana je kalibraciona prava (slika 4.14), koja je linearna u opsegu koncentracija od 1 do 10 mg/dm^3 .

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: zapremine od 0,3 ml uzorka dodato je 3 ml dejonizovane vode i 0,3 ml rastvora NaNO_2 . Nakon 5 minuta, dodato je 1,5 ml AlCl_3 , a nakon narednih 5 minuta dejonizovana voda i 2 ml NaOH , tako da je ukupna zapremina rastvora bila 10 ml. Snimanje je vršeno na 510 nm.



Slika 4.14. Kalibraciona prava katehina za određivanje ukupnih flavonoida

Na osnovu kalibracione prave, dobijena je jednačina prave (4.4) i izračunata je količina ukupnih flavonoida, a rezultati su izraženi kao milligram ekvivalenta katehina po gramu uzorka (mg CE/g).

$$A = 0,02486 \times c_x - 0,00507; r^2 = 0,9986 \quad (4.4)$$

gde je:

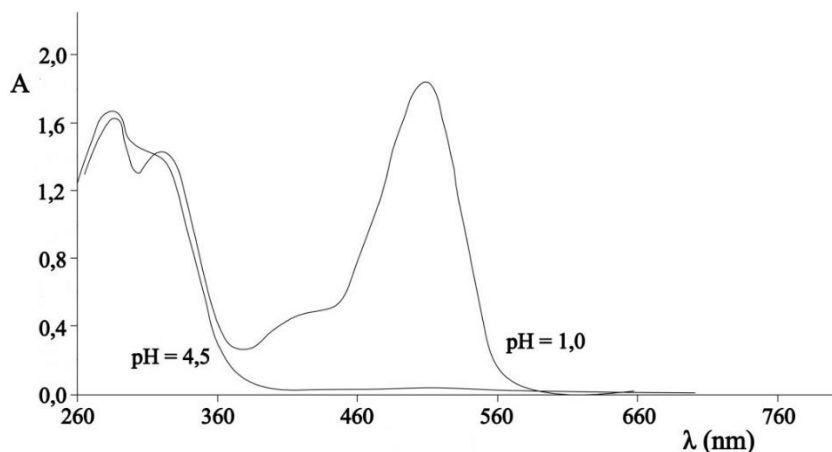
r^2 – koeficijent determinacije,

c_x – koncentracija katehina (mg/dm³).

4.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih i monomernih antocijana

Prema „singl” metodi, sadržaj ukupnih antocijana se određuje pri pH 1, a snimanje vrši na 520 nm i 700 nm. Za određivanje sadržaja monomernih antocijana primenjuje se pH diferencijalna metoda, gde se apsorbanca takođe meri na 520 nm i 700 nm, pri pH 1 (rastvor crvene boje, antocijani su u obliku oksonijum jona) i pri pH 4,5 (rastvor bezbojan, antocijani su u poluketalskom obliku) (Giusti i Wrolstad, 2003).

Apsorpcioni spektar antocijana prikazan je na slici 4.15.



Slika 4.15. Apsorpcioni spektar antocijana

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- KCl (0,025 mol/dm³, pH 1,0),
- CH₃COONa (0,55 mol/dm³, pH 4,5).

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: odmerene su po dve probe svakog uzorka u zapremini od po 0,5 ml, a potom je dodato 5 ml rastvora KCl, odnosno CH₃COONa. Apsorbanca svakog rastvora je merena na dve talasne dužine (520 nm i 700 nm, zbog korekcije zamućenja), nakon 15 minuta.

Na osnovu jednačine 4.5. izračunat je sadržaj ukupnih antocijana i predstavljen kao ekvivalent cijanidin-3-*O*-glukozida (cy-3-glu):

$$\frac{mg(\text{cy-3-glu})}{dm^3} = \frac{A \cdot D_f \cdot M_r}{\epsilon \cdot l} \times 10^3 \quad (4.5)$$

gde je:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH=1} - (A_{520} - A_{700})_{pH=4,5}$$

D_f – faktor razblaženja,

$M(\text{cy-3-glu}) = 449,2$ g/mol,

ϵ – molarni apsorpcioni koeficijent, 26900 dm³/molcm,

l – dužina optičkog puta (kivete), 1 cm.

4.6. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti jagodastog voća

Zbog više različitih reakcionih mehanizama između antioksidanata i slobodnih radikala, na osnovu jedne primenjene metode ispitivanja se ne može zaključivati o zastupljenosti i aktivnosti svih potencijalnih slobodnih radikala ili antioksidanata u kompleksnim sistemima. U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti jagodastog voća, primenjena su četiri *in vitro* spektrofotometrijska testa:

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) antioksidativna metoda;
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) antioksidativna metoda;
- FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) antioksidativna metoda;
- RP (eng. *Reduction Power*) antioksidativna metoda.

4.6.1. ABTS metoda

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

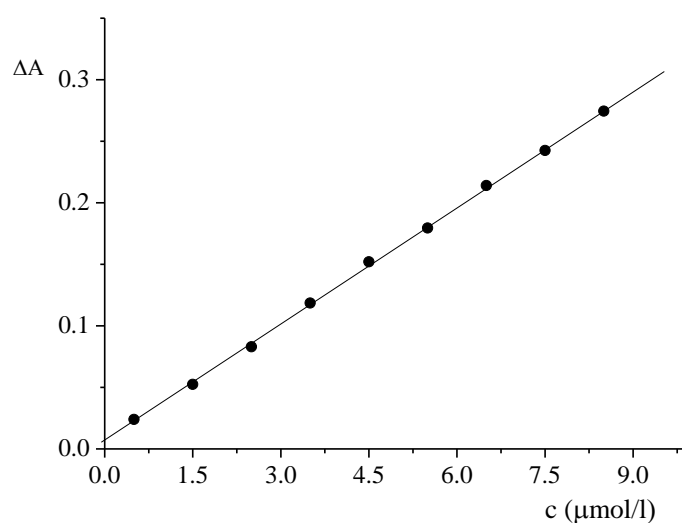
- osnovni rastvor troloksa (4×10^{-3} mol/dm³),
- osnovni rastvor K₂S₂O₈ ($2,4 \times 10^{-3}$ mol/dm³),
- osnovni rastvor ABTS (7×10^{-3} mol/dm³) u metanolu,
- metanol,
- radni rastvor ABTS (dobija se mešanjem jednakih zapremina osnovnih rastvora ABTS i K₂S₂O₈), čija se apsorbanca podešava razblaživanjem metanolom do vrednosti $A_{734\text{nm}} = 0,700 \pm 0,02$, a koji pre korišćenja stoji 12h na hladnom i mračnom mestu, u cilju aktivacije ABTS katjon radikala.

Prvo je pripremljena slepa proba, mešanjem 2 ml radnog rastvora ABTS i 2 ml metanola u normalnom sudu od 10 ml. Nakon 6 minuta stajanja na tamnom mestu, izmerena je apsorbanca na 734 nm.

Serijski standardni rastvor je pripremljen tako što je određenoj zapremini troloksa dodato 2 ml ABTS i dopunjeno je metanolom do 10 ml. Kalibraciona prava je konstruisana tako što su od apsorbance slepe probe (A_0) oduzimate apsorbance serije standardnih rastvora troloksa (A_s), odnosno:

$$A_0 - A_s = \Delta A = f(c_x) \quad (4.6)$$

Kalibraciona prava je linearna u opsegu koncentracija od 0,5 do 8,5 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (slika 4.16):



Slika 4.16. Kalibraciona prava troloksa za određivanje antioksidativne aktivnosti prema ABTS radikal katjonu

Odgovarajuća jednačina prave data je izrazom:

$$\Delta A = 0,0316 \times c_x + 0,0068; r^2 = 0,9996 \quad (4.7)$$

gde je:

c_x – koncentracija ABTS radikala izražena u $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$,

r^2 – koeficijent determinacije.

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: zapremini od 2 ml uzorka, dodato je 2 ml radnog rastvora ABTS, i apsorbancia je merena na 734 nm nakon 6 minuta stajanja.

Antioksidativna aktivnost uzoraka prema ABTS katjon radikalumu izračunata je na osnovu izraza 4.7. i data je kao mikromol troloks ekvivalenta po gramu uzorka ($\mu\text{mol TE}/\text{g}$).

4.6.2. DPPH metoda

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

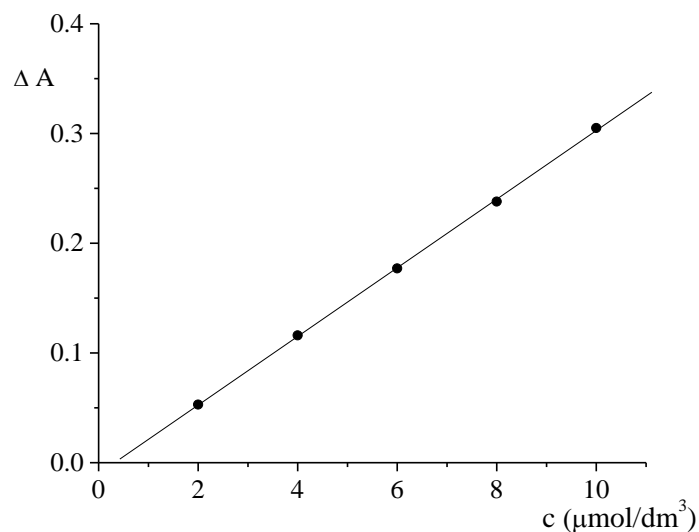
- osnovni rastvor troloksa (4×10^{-3} mol/dm³),
- osnovni rastvor DPPH (1×10^{-3} mol/dm³) u metanolu,
- radni rastvor DPPH (1×10^{-4} mol/dm³), dobijen razblaživanjem osnovnog rastvora DPPH metanolom,
- metanol.

Prvo je pripremljena slepa proba, mešanjem 5 ml radnog rastvora DPPH i 5 ml metanola u normalnom sudu od 10 ml. Nakon 30 minuta stajanja, izmerena je apsorbanca na 520 nm.

Serijs standardnih rastvora je pripremljena tako što je određenoj zapremini troloksa dodato 5 ml DPPH i dopunjeno je metanolom do 10 ml. Kalibraciona prava je konstruisana tako što su od apsorbanca slepe probe (A_0) oduzimate apsorbanca serije standardnih rastvora troloksa (A_s), odnosno:

$$A_0 - A_s = \Delta A = f(c_x) \quad (4.8)$$

Kalibraciona prava je linearna u opsegu koncentracija od 2 do 10 $\mu\text{mol/dm}^3$ (slika 4.17):



Slika 4.17. Kalibraciona prava troloksa za određivanje antioksidativne aktivnosti prema DPPH radikalu

Odgovarajuća jednačina prave data je izrazom:

$$\Delta A = 0,0313 \times c_x - 0,01; r^2 = 0,9997 \quad (4.9)$$

gde je:

c_x – koncentracija DPPH radikala izražena u $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$,

r^2 – koeficijent determinacije

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: u normalnom sudu od 10 ml, zapremine od 0,1 ml uzorka, dodato je 5 ml radnog rastvora DPPH, i sud je dopunjen metanolom do crte. Apsorbanca je merena na 520 nm nakon 30 minuta stajanja.

Antioksidativna aktivnost uzoraka prema DPPH radikalu izračunata je na osnovu izraza 4.9. i data je kao mikromol troloks ekvivalenta po gramu uzorka ($\mu\text{mol TE/g}$).

4.6.3. FRAP metoda

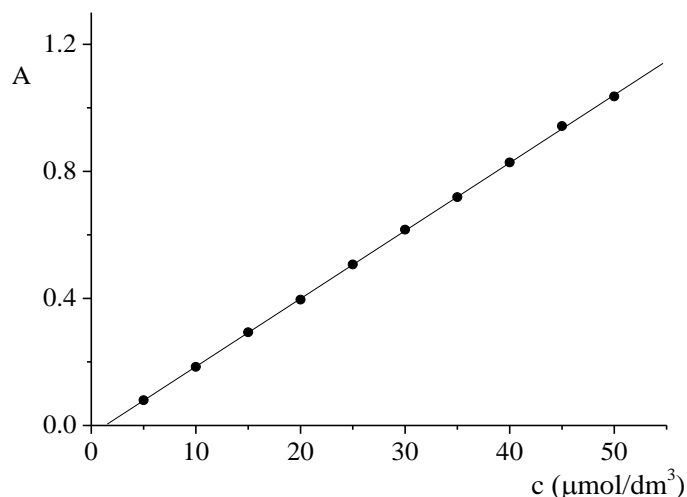
Ispitivanje antioksidativne aktivnosti jagodastog voća primenom FRAP metode izvršeno je po metodi predloženoj od strane *Benzie i Strain* (1996; 1999). U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- osnovni standardni rastvor $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ mmol}/\text{dm}^3$)
- rastvor HCl ($40 \text{ mmol}/\text{dm}^3$),
- acetatni pufer ($0,3 \text{ mol}/\text{dm}^3$, pH 3,6),
- rastvor FeCl_3 ($20 \text{ mmol}/\text{dm}^3$),
- rastvor tripiridiltriazina (TPTZ) ($10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ u $40 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ HCl).

FRAP reagens je pripremljen svež, mešanjem acetatnog pufera, TPTZ i FeCl_3 u odnosu 10:1:1 (v/v/v). Za konstruisanje kalibracione prave (slika 4.18), razblaživanjem osnovnog rastvora, pripremljena je serija standardnih rastvora $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, čija je apsorbanca merena na 595 nm.

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: u normalnom sudu od 10 ml, zapremine od

20 μl uzorka, dodato je 0,38 ml dejonizovane vode, a potom 3 ml FRAP reagensa. Slepa proba je sadržala rastvarač umesto uzorka. Apsorbanca svih rastvora je merena na 595 nm, nakon 5 minuta termostatiranja na 37 °C.



Slika 4.18. Kalibraciona prava Fe^{2+} za određivanje antioksidativne aktivnosti po FRAP metodi

Kalibraciona prava je linearna u opsegu koncentracija od 5 do 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Antioksidativna aktivnost uzoraka jagodastog voća prema FRAP metodi izračunata je na osnovu jednačine prave (4.10) i data kao mikromol Fe^{2+} ekvivalenta po gramu uzorka ($\mu\text{mol FE/g}$).

$$A = 0,02141 \times c_x - 0,0286; r^2 = 0,9998 \quad (4.10)$$

gde je:

c_x – koncentracija Fe^{2+} jona,

r^2 – koeficijent determinacije.

4.6.4. RP metoda

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti jagodastog voća izvršeno je prema metodologiji predloženoj od strane *Oyaizu* (1986). U radu su korišćeni sledeći reagensi:

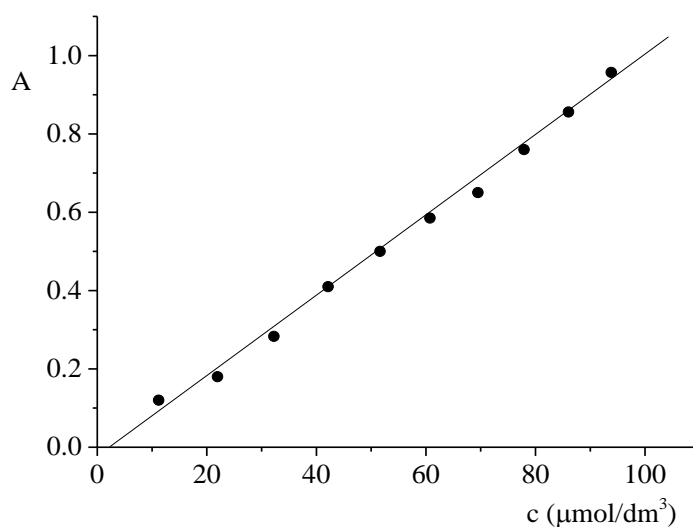
- osnovni rastvor askorbinske kiseline, ($200 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$),

- fosfatni pufer, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ($0,2 \text{ mol/dm}^3$, pH 6,6),
- trihlorsirćetna kiselina, CCl_3COOH (10% (m/v)),
- rastvor FeCl_3 (0,1% (m/v)),
- kalijum-heksacijanoferat(III), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1% (m/v)).

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: u normalnom sudu od 10 ml, zapremini od 0,1 ml uzorka, dodato je 1,5 ml fosfatnog pufera i 1,5 ml rastvora $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Ovako pripremljeni uzori su inkubirani 30 minuta na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Potom je uzorcima dodat 1,5 ml CCl_3COOH uz snažno mućkanje. Od dobijenih rastvora otpipetiran je po 1,5 ml, razblažen istom količinom dejonizovane vode, i potom je dodato 0,3 ml rastvora FeCl_3 . Slepa proba je sadržala rastvarač umesto uzorka. Apsorbanca svih rastvora je merena na 700 nm.

Za konstruisanje kalibracione prave (slika 4.19), razblaživanjem osnovnog rastvora, pripremljena je serija standardnih rastvora askorbinske kiseline, koji su tretirani na isti način kao i uzorci.

Na osnovu kalibracione prave, koja je linearna u opsegu koncentracija $11,2 - 93,8 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$, dobijena je jednačina prave (4.11), korišćena za izračunavanje antioksidativne aktivnosti uzoraka jagodastog voća po RP metodi. Rezultati su izraženi kao mikromolovi ekvivalenta askorbinske kiseline (eng. *Ascorbic Acid Equivalent-AAS*), po gramu uzorka ($\mu\text{mol AAE/g}$).



Slika 4.19. Kalibraciona prava askorbinske kiseline za određivanje antioksidativne aktivnosti po RP metodi

$$A = 0,0102 \times c_x - 0,0283; r^2 = 0,9945 \quad (4.11)$$

gde je:

c_x – koncentracija askorbinske kiseline,

r^2 – koeficijent determinacije.

4.7. Elektrohemijska analiza antioksidativne aktivnosti primenom ciklične voltametrije

Uzorci voća su štapnim blenderom usitnjeni u homogenu voćnu kašu. Odmereno je 2 g voća (sa tačnošću na četiri decimale), preliveno sa 5 ml zakišljenog 80% metanola, a zatim je primenjena ultrazvučna ekstrakcija u trajanju od 15 minuta, na 20 °C. Postupak je ponovljen još tri puta. Supernatan je odekantovan, filtriran kroz plavu traku (Whatman, Grade 42 Quantitative Filter Paper Ashless, dia 185 mm) u normalni sud od 25 ml i dopunjen do crte rastvaračem.

Pre svake analize, površina staklaste ugljene elektrode je brušena sa 1,0, 0,3 i 0,05 μm aluminijumskog praha, isprana destilovanom vodom i odmašćena u etanolu u ultrazvučnom kupatilu. Potom su snimani ciklični voltamogrami rastvora standarda/ekstrakata pomešanog sa 0,1 mol/dm³ natrijum-acetatnim puferom (pH 4,5) u odnosu 1:1 (v/v) u zakišljenom 80% metanolu. Natrijum-acetatni pufer takođe je deluje kao noseći elektrolit za CV merenja. Voltametrijski eksperimenti su izvedeni na sobnoj temperaturi. Snimanje je izvršeno u opsegu potencijala od 0 mV do 800 mV, sa brzinom skeniranja od 10, 25 i 100 mV/s, na 2 mV intervala i pri pH vrednostima uzoraka 2, 4, i 7. Ciklični voltamogrami su takođe zabeleženi za Troloks u opsegu koncentracija od 2 mmol/dm³ do 80 mmol/dm³ (Piljac-Žegarac i sar., 2010; Veljković i sar., 2013). Krive kalibracije, područje ispod glavnog voltametrijskog anodnog vrha (Q₅₀₀) nasuprot koncentraciji (c) dobijene za ovaj standard su korišćene za izračunavanje TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) ispitivanog jagodastog voća.

Antioksidativni kompozitni indeks (eng. *Antioxidative Composite Index* – ACI) izračunat je za svaki uzorak po jednačini (Seeram i sar., 2008):

$$ACI = \frac{ABTS_{indeks} + DPPH_{indeks} + FRAP_{indeks} + RP_{indeks} + Q_{500} \text{ indeks}}{5} \quad (4.12)$$

Pojedinačni indeksi za svaki od uzoraka u okviru antioksidativnog testa ($ABTS_{\text{indeks}}$, $DPPH_{\text{indeks}}$, $FRAP_{\text{indeks}}$ i RP_{indeks}) kao i indeksi za svaki od uzoraka u okviru elektrohemijske metode (Q_{500}) su izračunati kao količnik dobijene vrednosti za dati uzorak i najveće dobijene vrednosti u okviru testa i izraženi su u procentima.

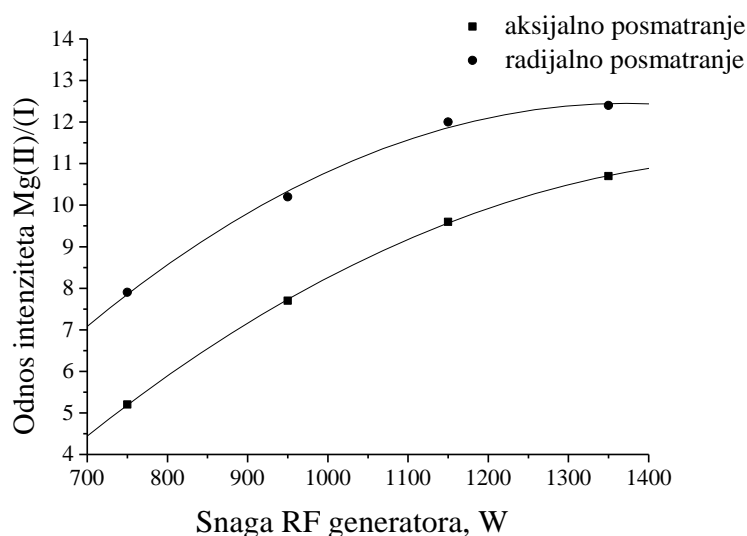
5. Rezultati i diskusija

5.1. Optimizacija i validacija ICP-OES metoda

5.1.1. Optimizacija operativnih uslova plazme

Odnos Mg(II) 280,270 nm/Mg(I) 285,213 nm je praktični kriterijum za određivanje robusnosti plazme i analitičkih performansi. Pri frekvenciji od 27,12 MHz, snaga radiofrekventnog (RF) generatora je varirana u intervalu od 750 W do 1350 W, pri konstantnim vrednostima ostalih uslova plazme: brzina pumpe 50 obrtaja u minuti, brzina protoka uzorka 50 obrtaja u minuti, protok gasa za raspršivanje 0,7 L/min, protok gasa za hlađenje 12 L/min, aksijalni protok gasa 0,5 L/min, dvojni (aksijalni/radijalni) pravac posmatranja plazme i vreme između uzimanja uzoraka 30 s.

U izabranom intervalu ispitivanja, odnos intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme se povećava sa povećavanjem RF snage generatora (slika 5.1). Najveći odnos intenziteta linija Mg (II)/Mg(I) dobijen je pri RF snazi generatora od 1150 W (tabela 5.1), pa je ova vrednost izabrana za dalja merenja (*Mermet*, 1991). Takođe se može videti da je relativna standardna devijacija merenja bila najniža pri odabranoj vrednosti RF snage generatora. Kao što je bilo očekivano, rezultati su pokazali da je odnos intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) veći pri radijalnom posmatranju. Dobijeni odnosi za intenzitete linija Mg(II)/Mg(I) ukazuju na tzv. robusne uslove plazme (*Brenner i Zander*, 2000).

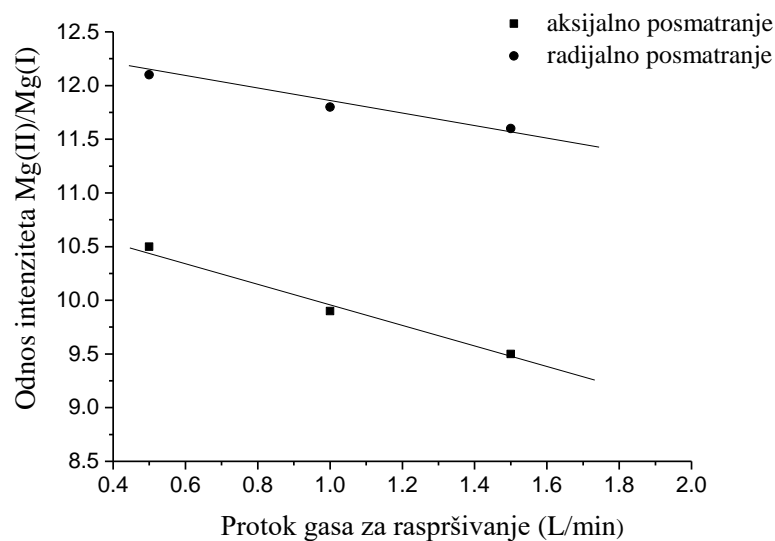


Slika 5.1. Zavisnost odnosa intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) i RF snage generatora

Tabela 5.1. Uticaj RF snage generatora na odnos relativnih intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme ($c_{sr} \pm SD$, $n = 3$)

Pravac posmatranja plazme	RF snaga (W)	Relativni intenzitet \pm SD na 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet \pm SD na 285,213 nm		Odnos intenziteta linija Mg(II)/Mg(I)
				RSD (%)		
Aksijalno	750	315800 \pm 12347	3,91	61745 \pm 1732	2,81	5,23
	950	690567 \pm 5950	0,86	90820 \pm 582	0,64	7,70
	1150	1045500 \pm 707	0,68	98912 \pm 506	0,51	10,57
	1350	1308667 \pm 11846	0,91	126809 \pm 702	0,55	10,32
Radijalno	750	19303 \pm 261	1,35	2455 \pm 25	1,02	7,86
	950	31903 \pm 197	0,62	3130 \pm 28	0,89	10,19
	1150	43110 \pm 235	0,55	3576 \pm 17	0,47	12,06
	1350	51285 \pm 332	0,65	4823 \pm 32	0,66	12,40

Pri RF snazi generatora od 1150 W, protok gasa za raspršivanje je variran u intervalu od 0,5 L/min do 1,5 L/min. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.2, zapaža se da se za brzine gasa za raspršivanje veće od 0,5 L/min, pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme, dobijaju niži odnosi intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) (slika 5.2) i veće vrednosti za relativne standardne devijacije.



Slika 5.2. Zavisnost odnosa relativnih intenziteta linija Mg(II)/(I) od protoka gasa za raspršivanje pri snazi RF generatora od 1150 W

Tabela 5.2. Uticaj brzine gasa za raspršivanje na odnos relativnih intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme ($c_{sr} \pm SD$, $n = 3$)

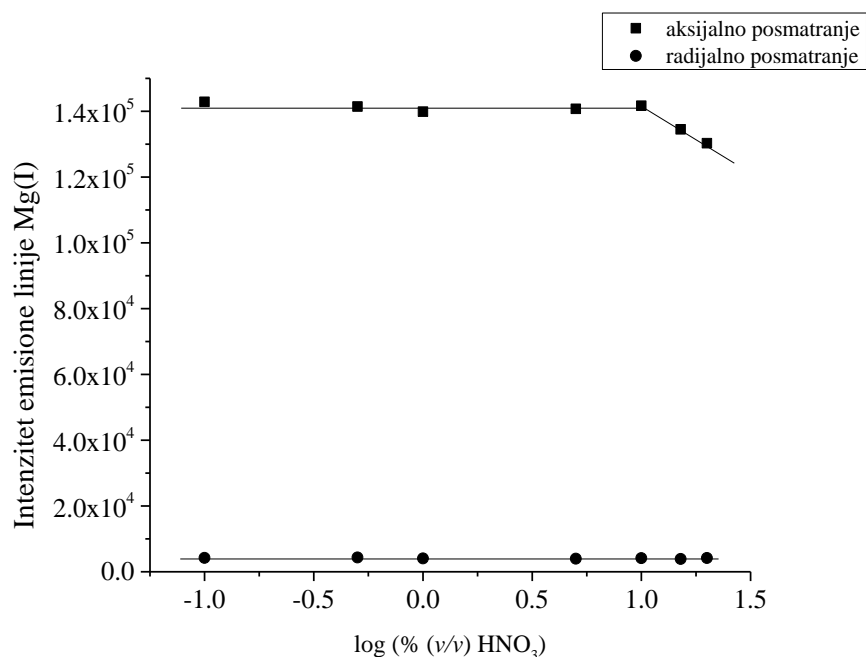
Pravac posmatranja plazme	Brzina raspršivačkog gasa (L/min)	Relativni intenzitet \pm SD na 280,270 nm	RSD (%)	Relativni intenzitet \pm SD na 285,213 nm	RSD (%)	Odnos intenziteta linija Mg II/MgI
Aksijalno	0,5	1045500 \pm 707	0,68	98912 \pm 506	0,51	10,57
	1,0	897867 \pm 6374	0,71	90817 \pm 491	0,54	9,89
	1,5	518350 \pm 6350	1,23	54617 \pm 307	0,57	9,49
Radijalno	0,5	43110 \pm 235	0,55	3576 \pm 17	0,47	12,06
	1,0	42890 \pm 389	0,91	3645 \pm 31	0,85	11,77
	1,5	36023 \pm 365	1,01	3116 \pm 27	0,87	11,56

Nakon definisanja optimalne snage radiofrekventnog generatora i optimalne brzine raspršivačkog gasa, ispitan je uticaj koncentracije azotne kiseline na intenzitet emisije linije Mg(I). Razblaživanjem koncentrovane azotne kiseline, pripremljeni su rastvori sledećih koncentracija HNO₃: 0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10%; 15% i 20% (v/v). U tabeli 5.3. dati su rezultati uticaja različitih koncentracija azotne kiseline na intenzitet emisije linije Mg(I), pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme, a grafički prikaz dat je na slici 5.3.

Tabela 5.3. Uticaj koncentracije azotne kiseline na relativni intenzitet emisije linije Mg(I)

Pravac posmatranja plazme	HNO ₃ (%)	log HNO ₃ (%)	Relativni intenzitet \pm SD na 285,213 nm	RSD (%)
Aksijalno	0,1	-1	142875 \pm 960	0,67
	0,5	-0,3	141432 \pm 416	0,29
	1	0	139879 \pm 1543	1,10
	5	0,70	140738 \pm 621	0,44
	10	1	141687 \pm 1475	1,04
	15	1,18	134526 \pm 2456	1,83
	20	1,30	131287 \pm 1725	1,32
Radijalno	0,1	-1	4236 \pm 18	0,42

0,5	-0,3	4352±15	0,34
1	0	4057±21	0,52
5	0,70	3974±32	0,81
10	1	4123±13	0,32
15	1,18	3879±25	0,64
20	1,30	4185±33	0,79



Slika 5.3. Uticaj koncentracije azotne kiseline na relativni intenzitet emisije linije Mg(I) pri snazi RF generatora od 1150 W i brzini raspršivačkog gasa od 0,5 L/min pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme

Na osnovu slike 5.3. uočava se da promena koncentracije kiseline nema značajnijeg uticaja na intenzitet emisije linije Mg(I) pri radijalnom posmatranju plazme. Međutim, pri aksijalnom posmatranju plazme, sa povećanjem koncentracije azotne kiseline iznad 10%, dolazi do smanjenja intenziteta emisije linije Mg(I). Na osnovu tabele 5.3. uočava se da je najmanja standardna devijacija (0,29%) zabeležena u slučaju gde je koncentracija azotne kiseline bila 0,5%, pa su njome dopunjeni normalni sudovi prilikom pripreme uzoraka jagodastog voća za ICP-OES analizu.

Robusni uslovi plazme su, pri aksijalnom posmatranju plazme, postignuti pri RF vrednosti generatora od 1150 W ($Mg(II)/Mg(I) = 10,57$) i pri brzini gasa za raspršivanje od 0,5 L/min ($Mg(II)/Mg(I) = 10,57$). Sa druge strane, pri istim optimalnim radnim uslovima,

robusnost plazme pri radijalnom posmatranju plazme postignuta je pri sledećim vrednostima odnosa inteziteta linija magnezijuma: $Mg(II)/Mg(I) = 12,06$ i $Mg(II)/Mg(I) = 12,06$. Pri robusnim uslovima, plazma je mnogo stabilnija na svaku promenu radnih uslova ICP izvora, a istovremeno se postiže veća reproduktivnost (Mermet, 1991; Mermet, 1998; Denuad i sar, 2001).

5.1.2. Matriks efekat i izbor analitičkih linija

Da bi se ispitao efekat matriksa, primenjena je metoda standardnog dodatka. Uzorak je spajkovan sa poznatom koncentracijom standardnog rastvora (0,4 mg/l do 1,6 mg/l, osim za Al, Ca, Fe, Pb, Mg i Na, za koje je spajk iznosio 0,04 mg/l do 0,16 mg/l). Efekat matriksa je izračunat prema jednačini 5.1:

$$ME = \left(\frac{I_1}{I_2} - 1 \right) \times 100 \quad (5.1)$$

gde su I_1 i I_2 intenziteti mereni za sve odabrane linije za sve elemente u rastvoru uzorka.

Izbor analitičkih linija za aksijalno i radijalno posmatranje plazme izvršeno je na osnovu odnosa nagiba kalibracione prave i kalibracione prave sa spajkovanim uzorkom ($nagib_{kal}/nagib_{sam}$) i matriks efekta (ME) (tabela 5.4). Pri konačnom izboru analitičkih linija uzeta je u obzir i tačnost. Kao što se može videti iz tabele 5.4, nagibi kalibracionih pravih i kalibracionih pravih sa spajkovanim uzorkom su statistički uporedivi, što ukazuje na odsustvo efekta matriksa. Takođe, niže vrednosti efekta matriksa rezultuju većom tačnošću. Vrednosti za matriks efekat se kreću do 8%, što ukazuje da razvijene metode mogu da se primene za određivanje elemenata u datom tipu uzorka.

Tabela 5.4. Izabrana talasna dužina, odnos $nagib_{kal}/nagib_{sam}$ i matriks efekat (ME)

Element	Vrsta voća	Talasna dužina (nm)	Pravac posmatranja plazme	$nagib_{kal}/nagib_{sam}$	ME (%)
Al	Jagoda	308,215	aksijalno	1,014	1,4
	Kupina	308,215		0,978	-2,2
	Malina	309,271		0,967	-3,3
	Borovnica	308,215		1,029	2,9
As	Jagoda	189,042	aksijalno	1,010	1,0
	Kupina			0,947	-5,3
	Malina			0,992	-0,8

	Borovnica			0,946	-5,4
B	Jagoda	249,773	aksijalno	1,000	0
	Kupina	208,893		0,997	-0,3
	Malina	249,773		1,000	0
	Borovnica	249,773		1,024	2,4
Ba	Jagoda	455,403	aksijalno	0,986	-1,4
	Kupina	233,527		0,981	-1,9
	Malina	455,403		1,013	1,3
	Borovnica	455,403		0,968	-3,2
Ca			radijalno	a	a
Cd	Jagoda	228,802	aksijalno	0,999	-0,1
	Kupina	226,502		1,011	1,1
	Malina	228,802		1,009	0,9
	Borovnica	228,802		1,004	0,4
Co	Jagoda	228,616	aksijalno	1,000	0
	Kupina	230,786		1,069	6,9
	Malina	228,616		1,059	5,9
	Borovnica	228,616		0,977	-2,3
Cr	Jagoda	283,563	aksijalno	1,011	1,1
	Kupina			1,055	5,5
	Malina			1,026	2,6
	Borovnica			0,994	-5,6
Cu	Jagoda	324,754	aksijalno	0,994	-0,6
	Kupina	324,700		0,979	-2,1
	Malina	324,754		1,022	2,2
	Borovnica	324,754		0,975	-2,5
Fe	Jagoda	259,940	aksijalno	1,003	0,3
	Kupina	238,204		1,043	4,3
	Malina	238,204		1,029	2,9
	Borovnica	238,204		0,995	-0,5
K		766,490	radijalno	a	a
Mg		279,553	radijalno	a	a
Mn	Jagoda	257,610	aksijalno	0,992	-0,8
	Kupina			0,984	-1,6
	Malina			1,021	2,1
	Borovnica			0,989	-0,9
Na		589,592	radijalno	a	a
Ni	Jagoda	221,647	aksijalno	0,999	-0,1
	Kupina	221,647		1,047	4,7
	Malina	221,647		0,997	-0,3
	Borovnica	231,604		1,046	4,6
P		213,618	radijalno	a	a
Pb	Jagoda	220,353	aksijalno	0,999	-0,1
	Kupina			1,079	7,9
	Malina			1,062	6,2

	Borovnica			1,071	7,1
Se	Jagoda	196,090	aksijalno	0,991	-0,9
	Kupina			1,069	6,9
	Malina			1,033	3,3
	Borovnica			1,079	7,9
Si	Jagoda	212,412	aksijalno	0,999	-0,1
	Kupina	251,611		0,987	-1,3
	Malina	251,611		0,991	-0,9
	Borovnica	251,611		1,077	7,7
Zn	Jagoda	213,856	aksijalno	0,989	-1,1
	Kupina			1,019	1,9
	Malina			1,029	2,9
	Borovnica			1,040	4,0

^anije neophodno ispitivati odnos nagib_{kal}/nagib_{buz} i matriks efekat za makroelemente (Ca, K, Mg, P i Na) zbog njihove relativno visoke koncentracije u uzorcima

Granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) sa opsegom linearnosti i koeficijentom determinacije (r^2) kalibracionih pravih su predstavljeni u tabeli 5.5. Dobijene vrednosti za granice detekcije su istog reda veličine, ili niže od vrednosti dobijenih za elemente u voću drugih autora (*Barnes, 1997*), ili do 15 puta niže za teške metale (0,001; 0,002; 0,001 i 0,002 mg/kg za Pb, Cd, Cu i Zn,) (*Radwan i Salama, 2006*). Kao što je pomenuto u radu *Todoli i saradnika (2002)*, optimizacija instrumentalnih uslova i ispitivanje matriks efekta vode ka nižim vrednostima granice detekcije.

Intezitet linije raste linearno sa povećanjem koncentracije u opsegu koji je dat za svaki element. Na osnovu dobijenih vrednosti za koeficijent determinacije ($r^2 > 0,9990$), može se zaključiti da je linearnost dobra u ispitivanim intervalima koncentracije za svaki element.

Tabela 5.5. Koeficijent determinacije (r^2), granica detekcije (LOD), granica kvantifikacije (LOQ) i opseg linearnosti izabranih analitičkih linija

Element	Talasna dužina (nm)	r^2	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Opseg linearnosti ($\mu\text{g/mL}$)
Al	308,215	0,9990	4,52	15,07	0-50
	309,271	1,000	4,10	13,68	0-50
As	189,042	0,9996	2,76	9,19	0-1
B	249,773	0,9998	1,63	5,45	0-25
	208,893	0,9998	1,43	4,76	0-25
Ba	455,403	0,9992	0,05	0,16	0-20
	233,527	0,9998	0,41	1,36	0-20

Ca	393,366	0,9998	0,97	3,23	0-500
Cd	228,802	0,9996	0,19	0,63	0-1
	226502	0,9998	0,18	0,61	0-1
Co	228,616	0,9996	0,19	0,63	0-2
	230,786	0,9992	0,49	1,64	0-2
Cr	283,563	0,9990	0,59	1,95	0-2
Cu	324,754	0,9992	0,73	2,44	0-50
	224,700	0,9994	0,72	2,41	0-50
Fe	259,940	0,9992	0,57	1,89	0-50
	238,204	0,9994	0,44	1,46	0-50
K	766,490	0,9999	39,43	131,44	0-500
Mg	279,553	1,000	0,12	0,41	0-500
Mn	257,610	0,9998	0,13	0,42	0-25
Na	588,995	1,000	0,46	1,53	0-500
Ni	221,647	0,9992	0,50	1,68	0-1
	231,604	0,9994	0,47	1,58	0-1
P	213,618	0,9990	6,00	20,02	0-500
Pb	220,353	0,9990	2,09	6,97	0-1
Se	196,090	0,9990	3,28	10,93	0-25
Si	251,611	1,000	1,74	5,79	0-100
	212,412	1,000	1,58	5,27	0-100
Zn	213,856	0,9994	0,14	0,47	0-50

5.1.3. Validacija ICP-OES metode

Za uzorke jagodastog voća, tačnost i preciznost metode su testirani primenom NIST (eng. *National Institute of Standards and Technology*) standarda kao sertifikovanog referentnog materijala borovnica (NIST 3278), za koje je sertifikovan sadržaj 8 metala (Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, P, K, Zn) i rezultati su predstavljeni u tabeli 5.6. Tačnost metode je izračunata prema jednačini 3.11., dok je mera preciznosti relativna standardna devijacija, RSD, i izračunata je prema jednačini 3.13.

Tabela 5.6. Tačnost i preciznost metode

Element	Tačnost			Preciznost RSD (%)
	Sertifikovana vrednost (mg/kg)	Određena vrednost (mg/kg)	Tačnost (%)	
Ca	323±16	339±18	95,05	5,31
Cu	2,22±0,16	2,31± 0,15	95,95	6,49
Fe	12,20±0,74	12,43±0,71	98,11	5,71
Mg	313,7±7,2	302,4±7,5	103,6	2,48
Mn	8,47±0,59	8,69±0,62	97,40	7,13
P	671±21	694±18	96,57	2,59
K	4490±220	4623±215	97,04	4,65
Zn	6,49±0,61	6,84±0,52	94,61	7,60

Tačnost ICP-OES metode je u opsegu od 94,61% za Zn do 103,6% za Mg.

Preciznost metode je u opsegu od 2,48% za Mg do 7,60% za Zn.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature, gde je izračunata tačnost u opsegu od 93% do 110% (*Mrmošanin i sar.*, 2018), 96% do 107% (*Tošić i sar.*, 2015), 90,77% do 97,45% (*Larrea-Marin i sar.*, 2010) a preciznost je u opsegu 3,7% do 7,9% (*Mrmošanin i sar.*, 2018), 3,3% do 6,5% (*Tošić i sar.*, 2015), 0,79% do 5,74% (*Larrea-Marin i sar.*, 2010). Takođe, prema *U.S. Food and Drug Administration* (2015), “recovery” vrednosti su zadovoljavajuće ako su u intervalu od 80% do 120%. Sve dobijene vrednosti za preciznost su u skladu sa literaturnim podacima koji se odnose na validaciju metoda. Prema istraživanjima (*Horwitz*, 1982; *Wood*, 1999; *Thompson*, 2004), maksimalna vrednost RSD-a, koja je prihvatljiva za koncentraciju analita do 100 ppb je 22,6 %, za koncentraciju analita do 1 ppm je 16%, za koncentraciju analita do 10 ppm je 11,3% itd. Prema *Association of Official Agricultural Chemists Peer Verified Methods* programu (*AOAC*, 2000; *Gonzalez i Herrador*, 2007), maksimalna vrednost RSD-a koja je prihvatljiva za koncentraciju analita do 100 ppb je 15%, za koncentraciju do 1 ppm je 11%, a za koncentraciju do 10 ppm je 7,3%.

5.1.4. Sadržaj makro i mikroelemenata u uzorcima jagodastog voća

Rezultati elementne analize uzoraka jagodastog voća prikazani su kao srednja vrednost triju proba ($c_{sr} \pm SD$, $n = 3$) (tabela 5.7).

Od makroelemenata, u jagodastom voću su prisutni: kalijum, natrijum, magnezijum, kalcijum i fosfor. Kalijum je najzastupljeniji element u svim uzorcima. Analizirani uzorci voća se odlikuju niskim sadržajem natrijuma.

Koncentracija kalijuma je u opsegu 7,8-8,74 mg/g u jagodama, 3,37-4,63 mg/g u borovnicama, 4,66-5,31 mg/g u kupinama i 4,67-7,98 mg/g u malinama, dok je koncentracija natrijuma u opsegu 0,0425-0,0638 mg/g u jagodama, 0,0527-0,0841 mg/g u borovnicama, 0,0523-0,102 mg/g u kupinama i 0,0315-0,0735 mg/g u malinama. Joni natrijuma su glavni katjoni ekstracelularne tečnosti, dok su joni kalijuma glavni katjoni intracelularne tečnosti. Za održavanje homeostaze, molekuli vode i joni natrijuma i kalijuma su u stalnom kretanju između ekstracelularne i intracelularne tečnosti kroz ćelijsku membranu. Kalijum i natrijum su posebno važni u bubrežnoj regulaciji acido-bazne ravnoteže jer se joni vodonika zamenjuju za jone natrijuma i kalijuma u bubrežnim kanalima. Kalijum lakše ulazi u ćeliju od natrijuma i inicira kratku razmenu natrijum-kalijum kroz ćelijske membrane. U nervnim ćelijama ova razmena generiše električni potencijal koji za cilj ima sprovođenje nervnih impulsa. Kada kalijum napusti ćeliju, menja se membranski potencijal i omogućava napredovanje nervnog impulsa. Ova fiziološka funkcija, natrijum-kalijumova pumpa, od posebnog je značaja za ekscitabilne ćelije kao što su nervne ćelije, koje zavise od ove pumpe za reagovanje na nadražaje i prenošenje impulsa. Unos kalijuma u ćeliju reguliše natrijum-kalijumova pumpa, dok je ekskrecija kalijuma iz ćelije zavisi od permeabilnosti ćelijske membrane i hemijskog i električnog gradijenta jona kalijuma. Funkcija natrijum-kalijumove pumpe koja je od biološke važnosti je sprečavanje bubrenja ćelija. Ako se natrijum ne izbacuje, voda se nakuplja u ćeliji izazivajući njeno bubrenje i na kraju pucanje ćelijskog zida.

Nivoi koji izlaze iz fizioloških granica ovih elemenata mogu rezultirati raznim patološkim poremećajima. Previsoka koncentracija natrijuma, hipernatremija, dovodi do oticanja, pojačane žeđi i smanjene proizvodnje urina. Hiponatremija je nizak nivo natrijuma u serumu i obično ga karakterišu glavobolja, konfuzija, grčevi mišića, mučnina i povraćanje. Previše kalijuma, hiperkalijemija, karakteriše razdražljivost, mučnina, smanjena proizvodnja urina i srčani zastoj. Umor je najčešći simptom hroničnog nedostatka kalijuma.

Rani simptomi uključuju mišićnu slabost, spore reflekse i suhu kožu ili akne. Nagli gubitak kalijuma može dovesti do srčane aritmije. Nizak nivo kalijuma, hipokalijemija, može poremetiti metabolizam glukoze i dovesti do povišenog nivoa šećera u krvi (*Pohl i sar.*, 2013).

Sadržaj magnezijuma je u opsegu 0,57-0,812 mg/g u jagodama, 0,289-0,435 mg/g u borovnicama, 0,625-0,997 mg/g u kupinama i 0,068-0,971 mg/g u malinama. Magnezijum ima veliki značaj za razvoj biljaka. Nedostatak magnezijuma u biljkama rezultuje kraćim korenima, manjim izdancima i nekrotičnim promenama na lišću, zbog pato-fizioloških procesa koji se ogledaju u poremećenom metabolizmu ugljenika, fiksaciji ugljenika i smanjenju količine hlorofila (*Guo i sar.*, 2016). Magnezijum je četvrti po zastupljenosti element u ljudskom telu (ukupno oko 25 g), od čega se u kostima nalazi približno 60%, u skeletnim mišićima i mekim tkivima oko 30-40% i u ekstracelularnoj tečnosti oko 1% (*Chellan i Sadler*, 2015). Obezbeđivanje dovoljnog unosa magnezijuma je od izuzetne važnosti jer je Mg^{2+} bitan kofaktor u mehanizmima replikacije, transkripcije i translacije genetskih informacija. Takođe je uključen u stabilizaciju lipidnih membrana, nukleinskih kiselina i ribozoma (*Hartwig*, 2001). Humani MAGT1, protein koji ima ulogu u transportu magnezijuma, ključni je regulator minimalnog nivoa slobodnih Mg^{2+} jona. Genetski nedostatak u MAGT1 može rezultovati predispozicijom za limfom, kao i za povećanu podložnost organizma Epstein-Barr-ovom virusu (*Cohen*, 2000). Pri kontrakciji mišića, magnezijum stimuliše ponovnu apsorpciju kalcijuma pomoću kalcijum aktivirane ATP-aze sarkoplazmatskog retikuluma (*Aikawa*, 1981). Magnezijum modulira transdukciju signala insulina i ćelijsku proliferaciju i važan je za adheziju ćelija i transmembranski transport, uključujući transport jona kalijuma i kalcijuma.

Koncentracija kalcijuma je u opsegu 1,07-1,26 mg/g u jagodama, 0,42-1,01 mg/g u borovnicama, 0,76-1,59 mg/g u kupinama i 0,53-1,14 mg/g u malinama. Kod biljaka koje rastu na zemljištu sa dovoljno kalcijuma, koncentracija kalcijuma u izdancima je između 0,1 i 5 % (*Marschner*, 1995). Ove vrednosti odražavaju, s jedne strane, dostupnost kalcijuma u životnoj sredini, a sa druge strane, zahteve za kalcijumom različitih biljnih vrsta. Nedostatak kalcijuma je retkost u prirodi, ali se može javiti na zemljištu sa kiselom depozicijom (*McLaughlin i Vimmer*, 1999). Simptomi nedostatka kalcijuma se primećuju kod mladih listova koji se šire, kao što su fleke koje liče na opekotine kod lisnatog povrća, crno središte kod stabljika celera, trulež kod bibera i ploda paradajza, gorki plod jabuka i prazna mahuna u kikirikiju (*White i Broadley*, 2003). Uprkos visokom nivou kalcijuma u telu (oko 1,1 kg), i velikoj ukupnoj koncentraciji u ćelijama (1-10 mM), slobodni Ca^{2+} joni

u nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama regulišu skeletne i kontrakcije srčanog mišića indukovanjem strukturnih promena u troponinu, proteinu koji se nalazi u srčanoj i mišićnoj muskulaturi (*Toyoshima i sar.*, 2000). Koordinativno vezivanje Ca^{2+} jona pomoću proteina i malih liganada osigurava da krvna plazma može ostati prezasićena Ca^{2+} jonima bez kontinuiranog taloženja Ca-fosfata u kostima.

Koncentracija fosfora je u opsegu 0,79-1,07 mg/g u jagodama, 0,233-0,546 mg/g u borovnicama, 0,595-0,817 mg/g u kupinama i 0,676-1,10 mg/g u malinama. Poznato je da je nivo dostupnosti fosfora tokom ranih faza rasta biljaka izuzetno važan i da ima presudni uticaj na potencijal prinosa biljnih kultura (*Grant i sar.*, 2001). Fosfor, u obliku ortofosfata, učestvuje u fotosintetičkom metabolizmu ugljenika i predstavlja supstrat za sintezu adenzin-3-fosfata (ATP), kroz proces fotofosforilacije. Nedostatak fosfora je povezan sa niskom koncentracijom ortofosfata u hloroplastima, što dovodi do smanjenja sinteze ATP-a, kroz smanjenu aktivnost enzima ATP-aze. Manjak fosfora u biljkama se manifestuje pojavom tamnih ili plavičastih fleka po listovima. U telu čoveka ima oko 0,9 kg esencijalnog elementa fosfora, do 90% koji se nalazi u apatitu u kostima i zubima, a ostatak u vanćelijskim tečnostima i mekom tkivu. Fosfor igra važnu ulogu u biološkim molekulima, posebno u vezama u strukturnom okviru DNK i RNK, i u fosfolipidima, koji su sastavni deo ćelijskih membrana. Energija je u molekulima uskladištena u molekulima ATP-a (*Baker i Worthley*, 2002).

Sadržaj makroelemenata analiziranih uzoraka jagodastog voća sa teritorije Republike Srbije je u saglasnosti sa literaturnim podacima, a poređenje rezultata je predstavljeno tabelarno (5.8). Primetno je da je sadržaj makroelemenata u uzorcima jagoda veći u odnosu na rezultate dobijene od strane drugih istraživača (*Hegediüs i sar.*, 2008; *Khan i sar.*, 2010; *Hakala i sar.*, 2003).

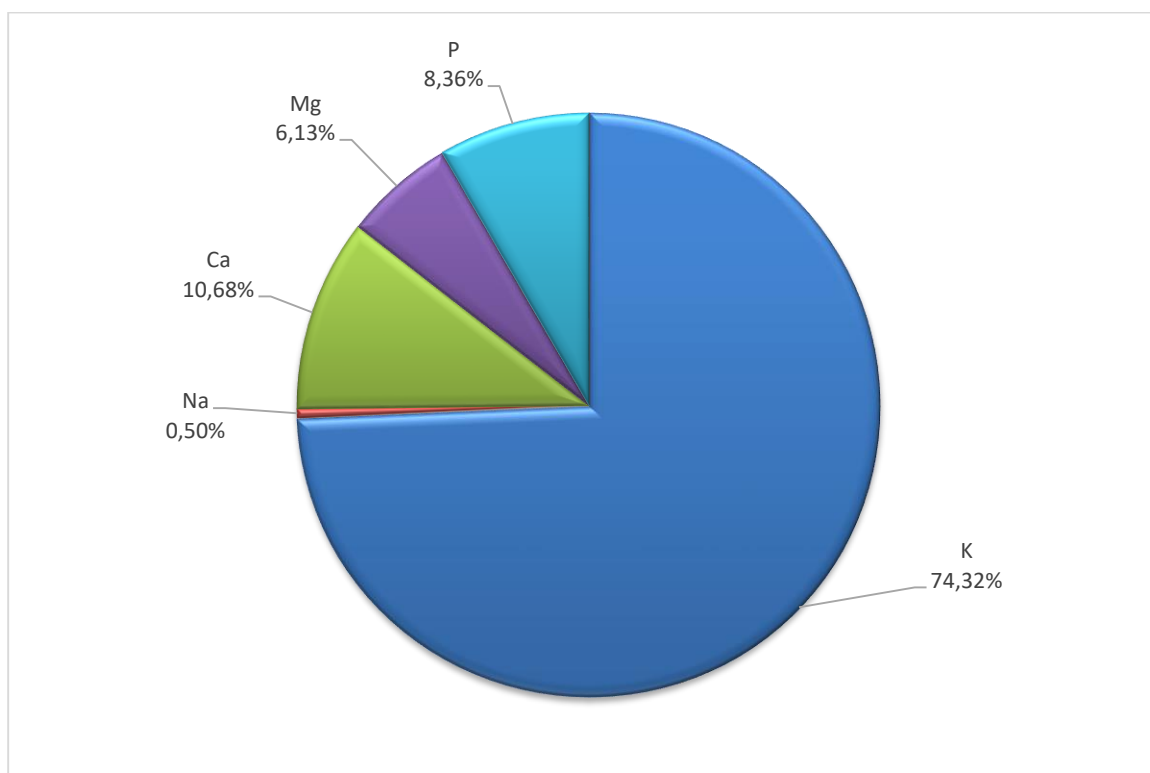
Tabela 5.7. Sadržaj makroelemenata (mg/g) u uzorcima jagodastog voća

Uzorak voća	Ca		K		Mg		P		Na	
	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)
J1	1,26±0,03	2,38	7,8±0,2	2,3	0,65±0,02	3,08	0,912±0,006	0,66	0,0425±0,0003	0,71
J2	1,21±0,02	1,65	8,09±0,09	1,11	0,57±0,02	3,51	0,79±0,02	2,53	0,0638±0,0006	0,94
J3	1,07±0,03	2,80	8,74±0,04	0,46	0,812±0,008	0,99	1,07±0,01	0,93	0,0594±0,0005	0,84
B1	0,42±0,01	2,38	3,37±0,03	0,89	0,289±0,002	0,69	0,233±0,001	0,43	0,0527±0,0004	0,76
B2	0,969±0,006	0,62	4,63±0,05	1,08	0,402±0,002	0,49	0,546±0,004	0,73	0,0538±0,0003	0,55
B3	1,01±0,02	1,98	3,76±0,09	2,39	0,435±0,004	0,92	0,497±0,004	0,80	0,0841±0,0007	0,83
K1	1,20±0,02	1,67	4,66±0,03	0,64	0,784±0,005	0,64	0,662±0,002	0,30	0,0671±0,0005	0,74
K2	0,81±0,01	1,23	5,29±0,08	1,51	0,625±0,008	1,28	0,595±0,004	0,67	0,102±0,002	1,96
K3	1,34±0,02	1,49	5,31±0,04	0,75	0,724±0,008	1,10	0,817±0,007	0,86	0,0608±0,0003	0,49
K4	0,76±0,02	2,63	5,12±0,02	0,39	0,635±0,004	0,63	0,685±0,002	0,29	0,0523±0,0006	1,15
K5	1,59±0,04	2,52	5,16±0,06	1,16	0,997±0,009	0,90	0,639±0,002	0,31	0,0531±0,0007	1,32
M1	0,823±0,008	0,97	5,24±0,07	1,34	0,068±0,002	2,94	0,676±0,006	0,89	0,0472±0,0003	0,64
M2	1,14±0,01	0,88	7,98±0,04	0,50	0,971±0,009	0,93	1,10±0,01	0,91	0,0735±0,0006	0,82
M3	0,621±0,008	1,29	6,22±0,08	1,29	0,679±0,001	0,15	0,698±0,005	0,72	0,0396±0,0004	1,08
M4	0,53±0,01	1,89	4,67±0,02	0,43	0,531±0,002	0,38	0,679±0,003	0,44	0,0315±0,0003	0,95

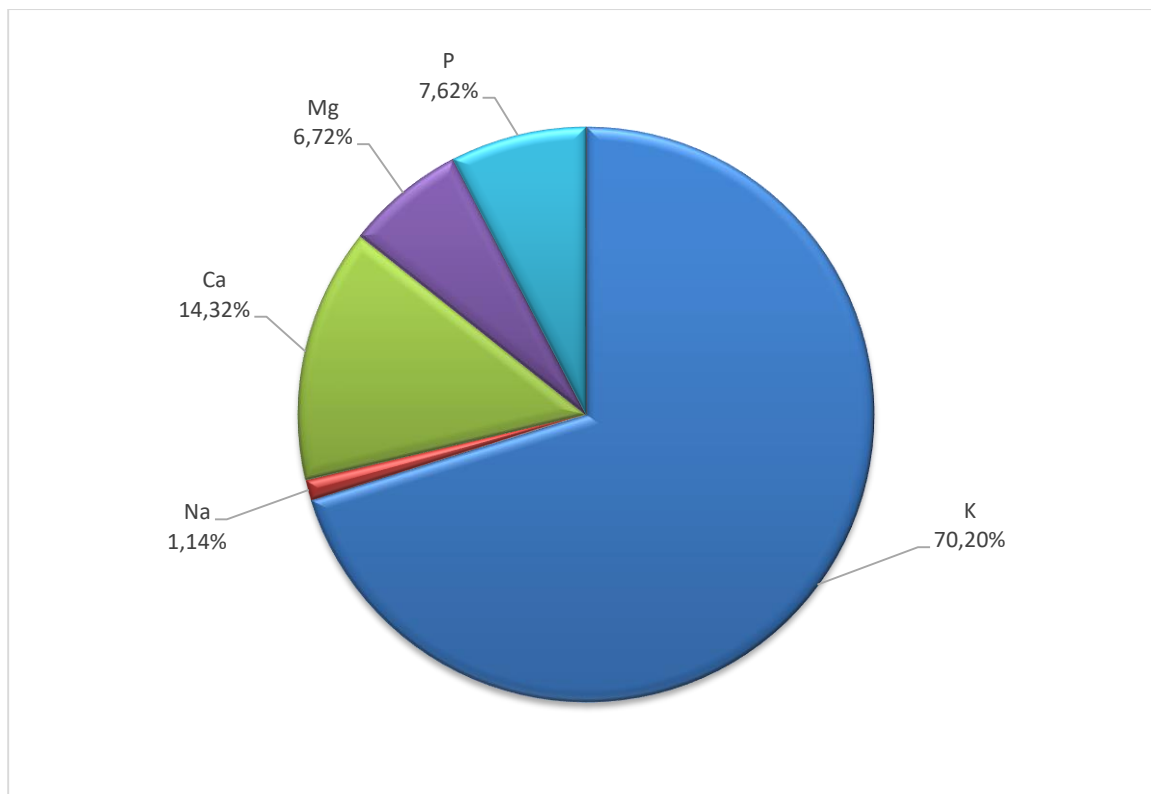
Tabela 5.8. Poređenje opsega koncentracija makroelemenata sa literaturnim podacima

Vrsta uzorka	K (mg/g)	Na (mg/g)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)	P (mg/g)	Referenca
Jagoda-Srbija	7,8-8,74	0,0425-0,0638	1,07-1,260	0,57-0,812	0,79-1,07	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Jagoda-Mađarska	1,41-1,47	0,025-0,026	0,017-0,031	0,012-0,015	0,021-0,024	<i>Hegedüs i sar., 2008</i>
Jagoda-Pakistan	1,14-1,93	0,023-0,036	0,079-0,124	0,12-0,15	-	<i>Khan i sar., 2010</i>
Jagoda-Finska	1,55-2,53	-	0,16-0,29	0,11-0,23	-	<i>Hakala i sar., 2003</i>
Borovnica-Srbija	3,37-4,63	0,0527-0,0841	0,42-1,01	0,289-0,435	0,233-0,546	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Borovnica-Kina	5,96	0,073	0,866	0,458	1,59	<i>Zhang i sar., 2014</i>
Borovnica-Poljska	0,88-1,105	0,048-0,062	0,112-0,203	0,048-0,097	-	<i>Drózdź i sar., 2018</i>
Borovnica-Letoniya	0,60-1,80	-	0,066-0,516	0,045-0,285	0,068-0,364	<i>Karlsons i sar., 2018</i>
Kupina-Srbija	4,66-5,31	0,0523-0,102	0,76-1,59	0,625-0,997	0,595-0,817	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Kupina-Brazil	0,95-1,85	-	0,12-0,22	0,11-0,21	0,11-0,20	<i>Guedes i sar., 2013</i>
Kupina-Italija	7,54-10,16	0,044-0,098	1,54-2,33	1,35-1,66	-	<i>Plessi i sar., 2007</i>
Malina-Srbija	4,67-7,98	0,0315-0,0735	0,53-1,14	0,068-0,971	0,676-1,10	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Malina-Italija	8,82-13,79	0,034-0,077	1,53-2,68	1,30-1,80	-	<i>Plessi i sar., 2007</i>
Malina-nema geografske odrednice	1,51	0,01	0,25	0,22	0,29	<i>Rao i Snyder, 2010</i>

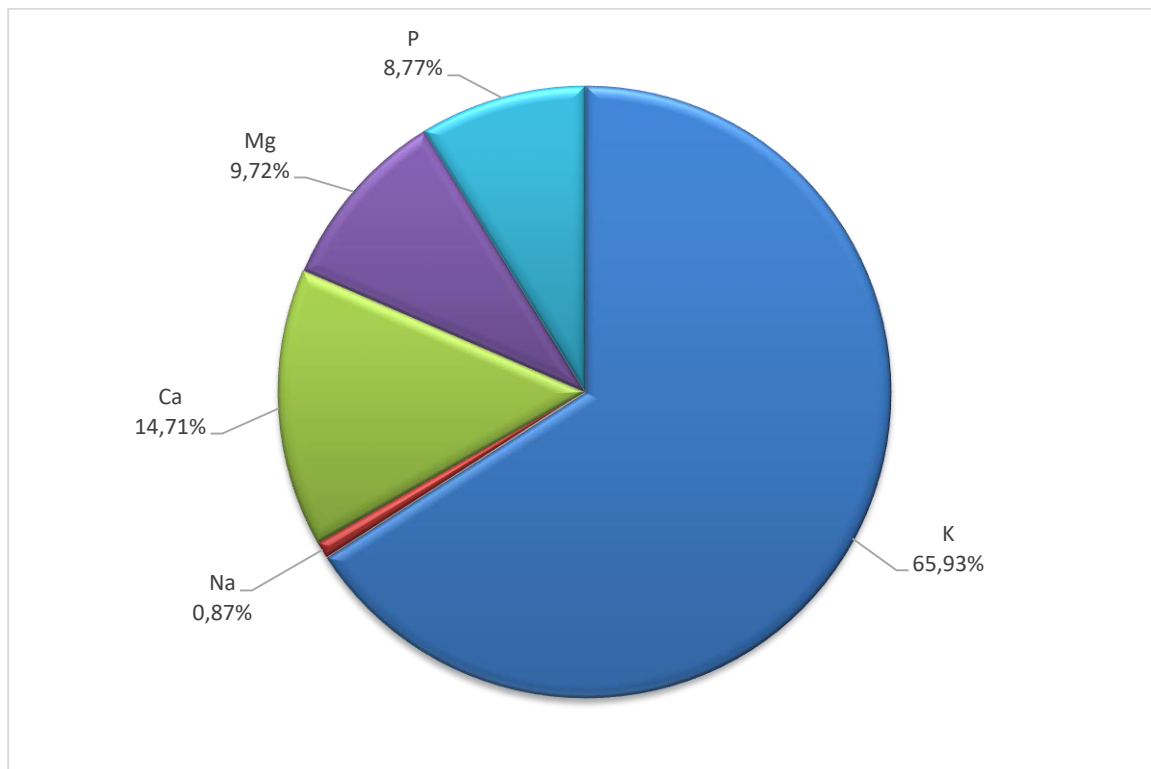
Na slikama 5.4-5.7. predstavljena je procentualna zastupljenost makroelemenata u uzorcima jagodastog voća. U svim uzorcima, najzastupljeniji je kalijum, sa 74,32% u jagodama, 70,20% u borovnicama, 65,93% u kupinama i 73,47% u malinama. Zatim sledi kalcijum, čiji je udeo od 9,49% u malinama do 14,71% u kupinama. Najviše fosfora je prisutno u malinama (9,61%), najmanje u borovnicama (7,62%), dok su kupine i jagode imale skoro ujednačen sadržaj ovog elementa (8,77% i 8,36%). Zastupljenost magnezijuma u uzorcima jagoda, borovnica i malina je vrlo ujednačena (6,13%, 6,72% i 6,85%), dok je u kupinama zastupljen sa 9,72%. Svi analizirani uzorci jagodastog voća se odlikuju veoma niskim sadržajem natrijuma (0,50% u jagodama, 1,14% u borovnicama, 0,87% u kupinama i 0,58% u malinama). Preporučeni dnevni unos kalijuma, natrijuma, kalcijuma, magnezijuma i fosfora za odrasle je 4500–4700 mg po danu, 1200–1500 mg po danu, 1000–1300 mg po danu, 240–420 mg po danu i 700–1250 mg po danu. Na osnovu dobijenih rezultata, izračunato je da porcija jagodastog voća od 100 g pokriva 7,2–18,6%, 0,26–0,85%, 0,7–10,0%, 2,3–11,0% i 0,7–6,8% preporučenog dnevnog unosa kalijuma, natrijuma, kalcijuma, magnezijuma i fosfora (*The U.S. National Academies, Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes 1997-2011*).



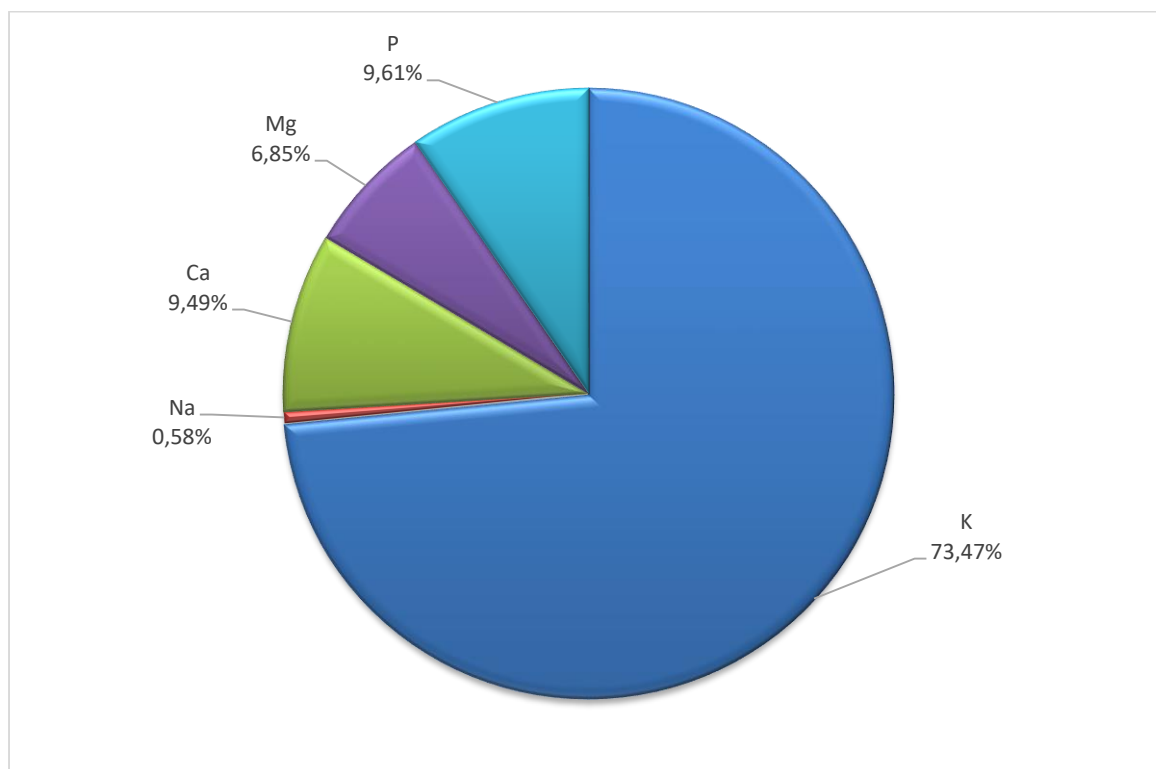
Slika 5.4. Prosečan sadržaj makroelemenata (%) u uzorcima jagoda



Slika 5.5. Prosečan sadržaj makroelemenata (%) u uzorcima borovnica



Slika 5.6. Prosečan sadržaj makroelemenata (%) u uzorcima kupina



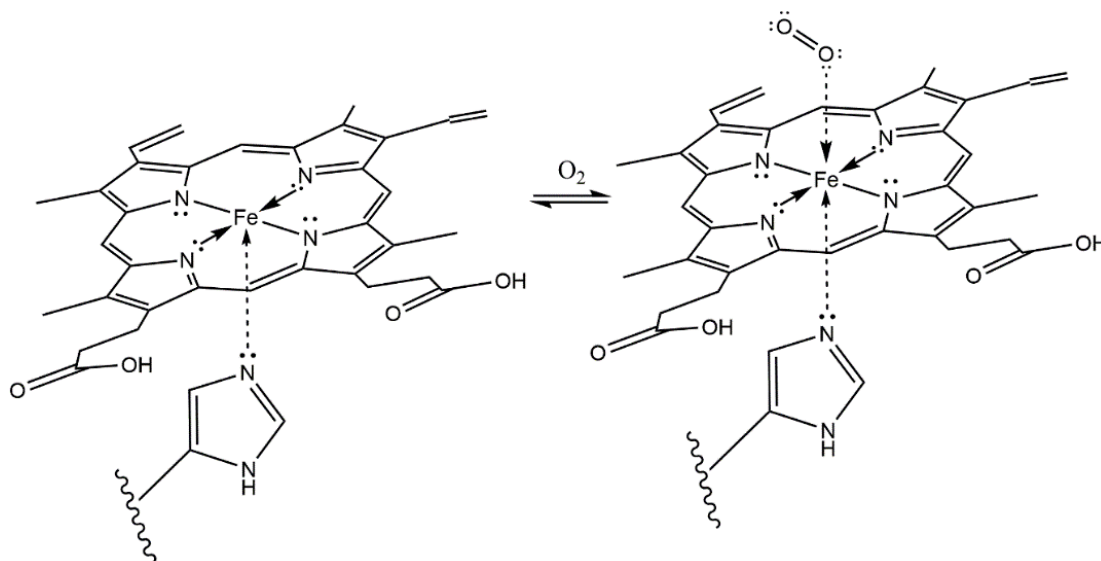
Slika 5.7. Prosečan sadržaj makroelemenata (%) u uzorcima malina

Sadržaj mikroelemenata u uzorcima jagodastog voća dat je u tabeli 5.9. Prema dobijenim rezultatima, mangan je prisutan u najvećoj koncentraciji, a zatim slede gvožđe, bakar, cink i silicijum.

Koncentracija mangana je u opsegu 14,0-35,1 $\mu\text{g/g}$ u jagodama, 43,9-95 $\mu\text{g/g}$ u borovnicama, 15,5-169 $\mu\text{g/g}$ u kupinama i 13,7-73 $\mu\text{g/g}$ u malinama. Voće i povrće predstavljaju dobar izvor ovog elementa. Mangan je esencijalni mikronutrijent sa velikim brojem funkcija u metabolizmu. Mangan deluje kao aktivator i ko-faktor stotina metaloenzima. Zbog svoje sposobnosti da lako promeni oksidaciono stanje u biološkim sistemima, mangan igra važnu ulogu u reakcijama katalizovanih enzimima, uključujući redoks reakcije, fosforilaciju, dekarboksilaciju i hidrolizu. Mn^{2+} je preovlađujuće oksidaciono stanje mangana u biljkama, a često se može zameniti drugim jonima metala, poput Mg^{2+} , koji ima slične jonske karakteristike (Schmidt i Husted, 2019). Tipičan simptom nedostatka mangana u biljkama je hloroza, koja se manifestuje pojavom tamnosmeđih mrlja na lišću i preranim starenjem starih listova. Povećane količine mangana u organizmu imaju

toksično dejstvo i izazivaju neurodegenerativne promene i poremećaje u funkcionisanju mitohondrija u ćelijama (Chellan i Sadler, 2015).

Koncentracija gvožđa je u opsegu 5,33-10,6 $\mu\text{g/g}$ u jagodama, 4,18-10,4 $\mu\text{g/g}$ u borovnicama, 4,79–12,8 $\mu\text{g/g}$ u kupinama i 4,79–15,9 $\mu\text{g/g}$ u malinama. Gvožđe učestvuje u nizu važnih fizioloških funkcija. Sa porfirinom čini prostetičku grupu hem. Hem je protoporfirin IX (derivat porfirina sačinjen od četiri pirolova prstena, koji su međusobno povezani metenskim mostovima i sadrži četiri metil, dva vinil i dva propionil supstituenta) sa centralno vezanim gvožđem. Atom gvožđa je vezan za četiri atoma azota u pirolovim prstenovima, a može formirati još dve koordinativne veze sa gornje i donje strane ravni porfirinskog prstena (sa azotom u aminokiselinskom ostatku histidina u proteinskom lancu i sa kiseonikom, sa suprotne strane porfirinskog prstena u odnosu na histidin) (slika 5.8). Hem ulazi u sastav citohroma, gde ima ulogu prenosioca elektrona. Takođe, hem je deo aktivnog centra enzima katalaze koja razlaže vodonik-peroksid u organizmu. Hem je i sastavni deo globularnog proteina hemoglobina, kojim se vrši transport kiseonika od pluća kroz ceo organizam (Spasić i sar., 2002).



Slika 5.8. Vezivanje kiseonika za atom gvožđa u hemu

Koncentracija bakra je u opsegu 6,16-9,42 $\mu\text{g/g}$ u jagodama, 3,01-7,84 $\mu\text{g/g}$ u borovnicama, 6,68–11,4 $\mu\text{g/g}$ u kupinama i 4,65–6,84 $\mu\text{g/g}$ u malinama. Joni bakra su kofaktori enzima Cu/Zn superoksid dismutaze, citohrom C oksidaze, amino oksidaze. Bakar učestvuje u mitohondrijalnoj respiraciji i odgovoru ćelije na oksidativni stres. Takođe, utiče na ekspresiju niza gena kod biljaka i aktivaciju morfoloških promena u korenovom sistemu i listovima. Nedostatak bakra rezultuje hlorozom, uvrtnjem ili sušenjem listova,

dezintegracijom tilakoidnih membrana hloroplasta, smanjenjem količine hlorofila i karotenoida, kao i nezasićenih masnih kiselina. U koncentracijama iznad optimalnih, bakar može dovesti do niza negativnih efekata: ometa proces fotosinteze, katalizuje nastanak kiseoničnih slobodnih radikala neenzimskim reakcijama, negativno utiče na rast biljaka, koje posledično imaju manju količinu biomase (Yruela, 2005).

Koncentracija cinka je u opsegu 8,5-18,5 µg/g u jagodama, 6,6-19,9 µg/g u borovnicama, 7,8-14,1 µg/g u kupinama i 1,61-17,1 µg/g u malinama. Zn²⁺ je uključen u skoro sve aspekte molekularne i ćelijske biologije. Proteini cinka čine oko 10% ljudskog proteoma, sa 3000 proteina cinka sa fiziološkim funkcijama (Andreini i sar., 2006). Cink ima važnu ulogu u strukturi proteina, kao i u enzimskoj katalizi. U nekim ćelijama se mogu naći relativno visoke koncentracije cinka (milimolarne, naročito u sinaptičkim vezikulama u mozgu) gde se skladište i prolaze kontrolisano oslobađanje (Chellan i Sadler, 2015). Nedostatak cinka kod biljaka se manifestuje odumiranjem vrhova korena, kovrdžanjem listova, sitnim listovima i hlorozom. Povećane količine cinka su toksične po biljni svet i podrazumevaju smanjene prinose i usporen rast, hlorozu izazvanu nedostatkom gvožđa kroz smanjenje sinteze hlorofila i razgradnju hloroplasta, kao i ometanje unosa fosfora, magnezijuma i mangana. Lisnato povrće je osetljivo na toksičnost cinka, posebno spanać i repa, zbog svojstvenog visokog kapaciteta usvajanja ovog elementa (Broadley i sar., 2007).

Koncentracija silicijuma je u opsegu 5,9-9,7 µg/g u jagodama, 5,8-8,1 µg/g u borovnicama, 10,6-16,0 µg/g u kupinama i 9,2-15,6 µg/g u malinama. Silicijum povećava gustinu kostiju, utiče na sintezu i stabilizaciju kolagena u koži. Silicijum je čest gradivni element biljaka. Voće i većina vrsta povrća sadrže silicijum u meri koja je proporcionalna sadržaju vlakana (Aras i Taman, 2006). Apsorpcija silicijuma zavisi od njegove koncentracije u zemljištu, navodnjavanja zemljišta i pH sredine. Korisni efekti silicijuma kod biljaka ogledaju se u povećanju tolerancije protiv bolesti i štetočina. Dugo se smatralo da je otpornost biljaka prema patogenima i insektima posledica mehaničke barijere nastale taloženjem silicijuma duž ćelijskog zida, čime se ometa njihovo napredovanje. Međutim, studije sprovedene 90-ih godina povezivale su prisustvo silicijuma sa specifičnim odbrambenim odgovorima u biljkama (Chérif i sar., 1992, 1994; Fawe i sar., 1998). Smatra se da silicijum indukuje indirektno odbrambene mehanizme promenom sastava biljnih isparljivih materija (Deshmukh i sar., 2017).

Koncentracija selena je u opsegu 0,283-0,62 µg/g u jagodama, 0,275-0,626 µg/g u borovnicama, 0,187-0,633 µg/g u kupinama i 0,113-0,486 µg/g u malinama. Razlike u sadržaju selena posledica su razlike u sastavu zemljišta na kojima se biljke uzgajaju (Aras i

Taman, 2006). Niske doze selena mogu stimulisati rast biljaka, poboljšati fotosintezu i učestvuju u homeostazi esencijalnih nutrijenata. Selen deluje kao sredstvo protiv starenja i pomaže u održavanju struktura i funkcija ćelija, čime doprinosi poboljšanju rasta i razvoja biljaka. Selen je mikronutrijent od izuzetnog značaja po ljudsko zdravlje, pošto učestvuje u antioksidativnim procesima u telu. Dijetetski selen se u organizmu vezuje za cistein, nastaje selenocistein, koji je esencijalna komponenta 25 različitih selenoproteina. Funkcija selenocisteina se ispoljava u katalitičkim centrima nekoliko selenoproteina: glutation peroksidaze, tioredoksin reduktaze, jodotironin dejodinaza i selenofosfat sintetaze. Selenocistein se takođe može nespecifično umetnuti u druge proteine, umesto cisteina (*Chauhan i sar.*, 2017).

Preporučeni dnevni unos mangana, bakra, cinka, gvožđa i selena za odrasle je 1,6–2,3 mg po danu, 0,7–0,9 mg po danu, 8–11 mg po danu, 8–18 mg po danu i 40–55 µg po danu. Na osnovu dobijenih rezultata, izračunato je da porcija jagodastog voća od 100 g zadovoljava 59,6–100%, 33,4–100%, 1,5–18,1%, 5,2–13,3% i 20,5–100% preporučenog dnevnog unosa mangana, bakra, cinka, gvožđa i selena (*The U.S. National Academies, Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes* 1997-2011).

Koncentracija bora je u opsegu 10,9-14,8 µg/g u jagodama, 5,98-10,7 µg/g u borovnicama, 1,16-15,9 µg/g u kupinama i 8,97-13,9 µg/g u malinama. Bor deluje blagotvorno na zdravlje ljudi i životinja. Stimuliše moždanu funkciju, a zajedno sa kalcijumom, magnezijumom i vitaminom D pomaže u prevenciji osteoporoze. Pokazuje tendenciju akumuliranja u biljkama, pa su tako voće, lisnato povrće, orašasti plodovi i leguminoze dobri izvori ovog elementa (*Aras i Taman*, 2006). Bor je važan za očuvanje strukturnih i funkcionalnih karakteristika ćelijskog zida i membrana, razmenu jona H^+ , K^+ , PO_4^{3-} , Ca^{2+} kroz membrane, deobu i produženje ćelija, metabolizam azota i ugljenih hidrata, transport šećera, metabolizam i transport fenola (*Shireen i sar.*, 2018). Esencijalan je za biljke i verovatno za ljude. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, 1998), prosečan dnevni unos bora za odrasle je 1,2 mg.

Koncentracija kobalta u analiziranim uzorcima je u opsegu 0,148-0,189 µg/g u jagodama, 0,135-0,154 µg/g u borovnicama, 0,032-0,089 µg/g u kupinama i 0,039-0,179 µg/g u malinama. Pošto je koncentracija kobalta u hrani niska, dnevno se unese od 15 µg do 60 µg ovog elementa (*Aras i Taman*, 2006). Kobalt je sastavni deo vitamina B_{12} - kobalamina, što je njegova glavna uloga u organizmu. Vitamin B_{12} ima ulogu u sintezi proteina od kojih je sačinjen mijelinski omotač nervnih ćelija, učestvuje u sintezi eritrocita

i neurotransmitera. Nedostatak kobalamina dovodi do pojave perniciozne anemije i disfunkcije štitne žlezde (Czarnek i sar., 2015).

Koncentracija nikla u analiziranim uzorcima je u opsegu od 0,812-3,31 $\mu\text{g/g}$ u jagodama, 1,42-2,55 $\mu\text{g/g}$ u borovnicama, 0,728-3,49 $\mu\text{g/g}$ u kupinama i 0,981-4,58 $\mu\text{g/g}$ u malinama. Ukupan dnevni unos nikla zavisi od količine životinjskih namirnica (koje su siromašne niklom), biljnih namirnica (bogate niklom), kao i od konzumiranja rafiniranih ili industrijski obrađenih namirnica. Podaci u literaturi ukazuju da se putem hrane dnevno unese manje od 150 μg nikla (Aras i Taman, 2006). Nikl može učiniti neke mikrobe virulentnim, poput bakterije *Helicobacter pylori*, koja onemogućava zarastanje čira na želucu. Ova bakterija poseduje dva enzima nikla koji su ključni za *in vivo* kolonizaciju, Ni-Fe hidrogenazu i ureazu, koja sadrži 24 jona nikla po aktivnom kompleksu (de Reuse i sar., 2013).

Sadržaj ukupnog hroma je u opsegu 0,193-0,48 $\mu\text{g/g}$ u jagodama, 0,29-0,69 $\mu\text{g/g}$ u borovnicama, 0,27-0,53 $\mu\text{g/g}$ u kupinama i 0,21-0,34 $\mu\text{g/g}$ u malinama. Preporučeni dnevni unos hroma je 20-35 μg za žene i muškarce, što je takođe procenjeno kao bezbedan i dovoljan unos hroma za decu od 9 godina do odraslog doba (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001). Zahvaljujući činjenici da je trovalentni hrom, prisutan u većini namirnica i nutritivnih suplemenata, esencijalan nutrijent sa veoma niskom toksičnošću, za razliku od šestovalentnog hroma, detektovane koncentracije hroma su dovoljne da podmiru dnevne potrebe organizma, bez opasnosti od štetnog dejstva ovog elementa (Reilly, 2004).

Koncentracija aluminijuma je u opsegu 8,45-12,6 $\mu\text{g/g}$ u jagodama, 11,9-18,2 $\mu\text{g/g}$ u borovnicama, 4,2-6,9 $\mu\text{g/g}$ u kupinama, dok je u malinama detektovan u samo jednoj sorti (1,36 $\mu\text{g/g}$). Aluminijum je uobičajen konstituent biljaka, i prisutan je u obliku silikata, a njegov sadržaj varira u zavisnosti od tipa zemljišta i biljne vrste (Hoening, 2001). Nedeljni unos aluminijuma koji se može tolerisati je 7 $\mu\text{g/kg}$ telesne mase (WHO, 1989). Nema poznatu biološku funkciju, a prekomerne količine aluminijuma povezane su sa akutnim i hroničnim bolestima kod ljudi. Naročito se problemi javljaju u slučajevima bubrežne insuficijencije. Tada apsorpcija aluminijuma u krv može dovesti do njegovog taloženja u mozgu i do demencije. Aluminijum je prisutan u mnogim komercijalnim proizvodima, uključujući kozmetiku, pa izloženost ovom elementu svakodnevno raste (Pineau i sar., 2014).

Olovo i kadmijum su elementi koji i u veoma malim količinama ispoljavaju toksičan efekat. Sadržaj olova je u opsegu 0,141-0,164 $\mu\text{g/g}$ u jagodama, 0,062-0,145 $\mu\text{g/g}$ u borovnicama, 0,091-0,125 $\mu\text{g/g}$ u kupinama i 0,109-0,160 $\mu\text{g/g}$ u malinama, dok je sadržaj

kadmijuma 0,028 µg/g u jednoj sorti jagoda, 0,039 µg/g u jednoj sorti kupina i u opsegu 0,018-0,041 µg/g u malinama. Kadmijum nije detektovan u uzorcima borovnice.

Olovo je toksičan element po ljude i životinje. Dugotrajna izloženost odraslih može dovesti do smanjenja performansi u nekim kognitivnim testovima koji mere funkcije nervnog sistema. Odojčad i mala deca posebno su osetljivi i na niske koncentracije olova, što može doprineti problemima u ponašanju, lošem učenju i smanjenju koeficijenta inteligencije (*Rubin i Straier, 2008*). Dugotrajno izlaganje olovu izaziva anemiju, zajedno sa povećanjem krvnog pritiska, i to uglavnom kod starijih i osoba srednjih godina. Utvrđeno je da je ozbiljno oštećenje mozga i bubrega, i kod odraslih i kod dece, povezano sa izlaganjem visokim koncentracijama olova što može dovesti do smrti. Trovanje olovom uzrok je anemije u brojnim slučajevima jer olovo inhibira porfobilinogen sintazu i ferokelatazu, sprečavajući i stvaranje porfobilinogena i inkorporaciju gvožđa u protoporfirin, što sprečava sintezu hema ili izaziva neefikasnu sintezu hema i posledično mikrocitnu anemiju (*Wani i sar., 2015*).

Kadmijum je toksičan, neesencijalni, prelazni metal koji predstavlja opasnost po zdravlje ljudi i životinja. Njegova pojava u životnoj sredini posledica je aktivnosti u poljoprivredni i industriji. Izlaganje kadmijumu prvenstveno se javlja unošenjem kontaminirane hrane i vode i, u značajnoj meri, udisanjem duvanskog dima. Kadmijum se akumulira u biljkama i životinjama, ima dug poluživot, od oko 25-30 godina. Epidemiološki podaci ukazuju na to da profesionalna i ekološka izloženost kadmijumu može biti povezana sa različitim vrstama raka, uključujući rak dojke, pluća, prostate, nazofarinksa, pankreasa i bubrega. Kadmijum u životnoj sredini može biti faktor rizika za osteoporozu. Jetra i bubrezi su izuzetno osetljivi na toksične efekte kadmijuma (*Genchi i sar., 2020*). Prema propisima Evropske komisije (eng. *European Comision – EC, 2006*) maksimalna dozvoljena koncentracija olova i kadmijuma u bobicama i sitnom voću su 0,20 mg/kg i 0,05 mg/kg.

Sadržaj aluminijuma, kadmijuma i olova u svim analiziranim uzorcima voća je ispod propisanih granica i ne predstavlja rizik po zdravlje ljudi. Arsen i barijum nisu detektovani u analiziranim uzorcima. Na slikama 5.8-5.11. grafički je predstavljen procentualni sadržaj mikroelemenata u jagodastom voću. U svim uzorcima, najzastupljeniji je mangan. Jagodasto voće je takođe bogato cinkom, borom, bakrom i gvožđem. Prema literaturnim podacima, različiti tipovi zemljišta, genotip biljne vrste, uslovi gajenja, agrotehničke mere i klimatski faktori utiču na mineralni profil biljke (*Kabata-Pendias, 2010*).

Poređenje dobijenih rezultata sa literaturno dostupnim podacima predstavljeno je tabelarno (tabela 5.10). Prisustvo silicijuma i kobalta u jagodastom voću evidentirano je

jedino u istraživanju u okviru ove disertacije (*Nikolić i sar.*, 2016). Opseg koncentracija za aluminijum, bor, bakar, gvožđe, mangan, nikl, olovo, selen i cink u uzorcima jagodastog voća iz Srbije u saglasju je sa rezultatima autora iz drugih zemalja (tabela 5.10) (*Hakala i sar.*, 2003; *Hegediüs i sar.*, 2008; *Khan i sar.*, 2010; *Guedes i sar.*, 2013; *Zhang i sar.*, 2014; *Dróždź i sar.*, 2018; *Karlsons i sar.*, 2018).

Tabela 5.9. Sadržaj mikroelemenata ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima jagodastog voća

Uzorak voća	Al		B		Cd		Co		Cr		Cu	
	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD (%)	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD (%)	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD (%)	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD (%)	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD (%)	$c_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	RSD (%)
J1	12,6±0,2	1,59	10,9±0,2	1,83	n.d.	-	0,148±0,005	3,38	0,193±0,005	2,59	7,61±0,04	0,53
J2	10,8±0,3	2,78	11,2±0,2	1,79	n.d.	-	0,173±0,005	2,89	0,48±0,02	4,17	6,16±0,03	0,49
J3	8,45±0,08	0,95	14,8±0,3	2,03	0,028±0,001	3,57	0,189±0,007	3,70	0,34±0,01	2,94	9,42±0,06	0,64
B1	18,2±0,3	1,64	5,98±0,07	1,17	n.d.	-	0,154±0,006	3,89	0,69±0,02	2,90	3,01±0,05	1,66
B2	14,1±0,2	1,42	7,14±0,08	1,12	n.d.	-	0,135±0,003	2,22	0,29±0,01	3,45	7,84±0,04	0,51
B3	11,9±0,1	0,84	10,7±0,1	0,93	n.d.	-	0,148±0,007	4,73	0,47±0,02	4,26	6,50±0,06	0,92
K1	6,2±0,2	3,23	12,5±0,2	1,60	n.d.	-	0,032±0,001	3,13	0,51±0,02	3,92	8,95±0,07	0,78
K2	6,9±0,3	4,35	10,8±0,1	0,93	0,039±0,002	5,13	0,079±0,003	3,80	0,29±0,01	3,45	8,68±0,07	0,81
K3	5,4±0,2	3,70	15,9±0,4	2,52	n.d.	-	0,089±0,004	4,49	0,32±0,01	3,13	11,4±0,1	0,88
K4	4,2±0,2	4,76	1,16±0,02	1,72	n.d.	-	0,069±0,002	2,90	0,27±0,01	3,70	6,91±0,04	0,58
K5	6,7±0,3	4,48	12,2±0,2	1,64	n.d.	-	0,079±0,003	3,80	0,53±0,02	3,77	6,68±0,04	0,60
M1	n.d.	-	13,9±0,3	2,16	0,018±0,001	5,56	0,179±0,005	2,79	0,34±0,01	2,94	4,65±0,06	1,29
M2	n.d.	-	10,2±0,1	0,98	n.d.	-	0,156±0,004	2,56	0,29±0,01	3,45	5,26±0,06	1,14
M3	n.d.	-	11,8±0,1	0,85	0,034±0,001	2,94	0,099±0,002	2,02	0,21±0,01	4,76	6,84±0,07	1,02
M4	1,36±0,05	3,68	8,97±0,09	1,00	0,041±0,002	4,88	0,039±0,001	2,56	0,25±0,01	4,0	6,17±0,05	0,81

Tabela 5.9. Nastavak

Uzorak voća	Fe		Mn		Ni		Pb		Se		Si		Zn	
	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)
J1	5,97±0,05	0,84	21,1±0,3	1,42	0,812±0,007	0,86	0,141±0,002	1,42	0,468±0,003	0,64	9,7±0,3	3,09	9,7±0,1	1,03
J2	5,33±0,04	0,75	14,0±0,4	2,86	0,996±0,005	0,51	0,164±0,003	1,83	0,283±0,005	1,77	5,9±0,2	3,39	8,5±0,1	1,18
J3	10,6±0,1	0,94	35,1±0,5	1,42	3,31±0,02	0,60	0,149±0,004	2,68	0,62±0,007	1,13	8,8±0,4	4,55	18,5±0,3	1,62
B1	10,4±0,1	0,96	43,9±0,3	0,68	1,42±0,01	0,70	0,062±0,007	1,13	0,275±0,002	0,73	5,8±0,2	3,45	6,6±0,1	1,52
B2	4,18±0,02	0,48	76±1	1,32	2,55±0,03	1,18	0,095±0,001	1,05	0,46±0,004	0,87	7,4±0,1	1,35	13,1±0,2	1,53
B3	4,33±0,03	0,69	95±2	2,11	1,57±0,02	1,27	0,145±0,004	2,76	0,626±0,007	1,12	8,1±0,3	3,70	19,9±0,3	1,51
K1	12,8±0,2	1,56	15,5±0,1	0,65	1,28±0,01	0,78	0,091±0,002	2,19	0,207±0,003	1,45	16,0±0,7	4,38	11,7±0,2	1,71
K2	8,09±0,06	0,74	169±3	1,78	3,49±0,03	0,86	0,125±0,003	2,40	0,393±0,004	1,02	13,4±0,4	2,99	10,3±0,2	1,94
K3	10,1±0,1	0,99	64±1	1,56	1,61±0,02	1,24	0,117±0,003	2,56	0,511±0,006	1,17	13,7±0,3	2,19	14,1±0,3	2,13
K4	8,01±0,06	0,75	30,9±0,5	1,62	0,728±0,007	0,96	0,091±0,002	2,19	0,633±0,007	1,11	11,8±0,2	1,69	7,8±0,1	1,28
K5	4,79±0,07	1,46	89±2	2,25	1,41±0,01	0,71	0,095±0,02	2,11	0,187±0,005	2,67	10,6±0,2	1,89	11,4±0,2	1,75
M1	6,50±0,05	0,77	35,6±0,5	1,40	4,58±0,04	0,87	0,151±0,004	2,56	0,312±0,004	1,28	11,7±0,3	2,56	11,2±0,2	1,79
M2	13,9±0,1	0,72	13,7±0,2	1,46	0,981±0,009	0,92	0,160±0,003	1,88	0,113±0,003	2,65	9,2±0,3	2,36	17,1±0,3	1,75
M3	4,79±0,04	0,84	73±1	1,37	2,73±0,02	0,73	0,121±0,003	2,47	0,486±0,005	1,03	15,6±0,4	2,56	1,61±0,04	2,48
M4	15,9±0,2	1,26	36,6±0,4	1,09	2,80±0,02	0,71	0,109±0,02	1,83	0,160±0,002	1,25	10,2±0,2	1,96	11,9±0,2	1,68

^asrednja vrednost±standardna devijacija, n=3

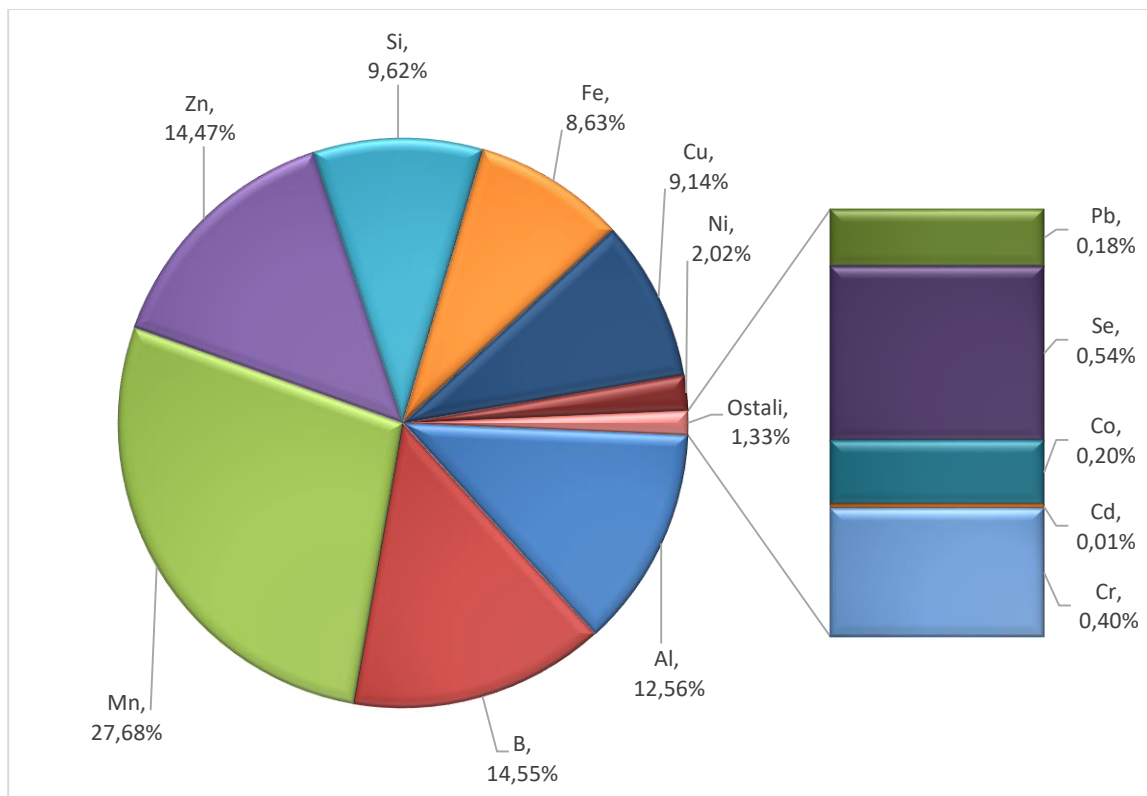
Tabela 5.10. Poređenje opsega koncentracija mikroelemenata sa literaturnim podacima

Vrsta uzorka	Al (µg/g)	B (µg/g)	Cd (µg/g)	Co (µg/g)	Cr (µg/g)	Cu (µg/g)	Referenca
Jagoda-Srbija	8,45-12,6	10,9-14,8	0,028	0,148-0,189	0,193-0,48	6,16-9,42	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Jagoda-Mađarska	5,6-10,1	0,9-1,4	-	-	-	0,5-0,6	<i>Hegedüs i sar., 2008</i>
Jagoda-Kina	79,4	12,63	0,248	-	-	8,04	<i>Zhang i sar., 2014</i>
Jagoda-Pakistan	-	-	-	-	-	0,51-1,04	<i>Khan i sar., 2010</i>
Jagoda-Finska	-	-	0,001-0,074	-	-	0,38-0,98	<i>Hakala i sar., 2003</i>
Borovnica-Srbija	11,9-18,2	5,98-10,7	n.d.	0,135-0,154	0,29-0,69	3,01-7,84	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Borovnica-Kina	40,97	5,39	0,034	-	-	7,33	<i>Zhang i sar., 2014</i>
Borovnica-Poljska	12,4-17,9	-	0,001-0,013	-	0,014-0,174	0,24-0,41	<i>Drózdź i sar., 2018</i>
Borovnica-Letonija	-	0,7-1,5	-	-	-	0,47-0,9	<i>Karlsons i sar., 2018</i>
Kupina-Srbija	4,2-6,9	1,16-15,9	0,039	0,032-0,089	0,27-0,53	6,68-11,4	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Kupina-Brazil	-	-	-	-	-	0-5-1,7	<i>Guedes i sar., 2013</i>
Kupina-Italija	-	-	-	-	-	-	<i>Plessi i sar., 2007</i>
Malina-Srbija	1,36	8,97-13,9	0,018-0,041	0,039-0,179	0,21-0,34	4,65-6,84	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Malina-Italija	-	-	-	-	-	-	<i>Plessi i sar., 2007</i>
Malina-nema geografske odrednice	-	-	-	-	-	0,90	<i>Rao i Snyder, 2010</i>

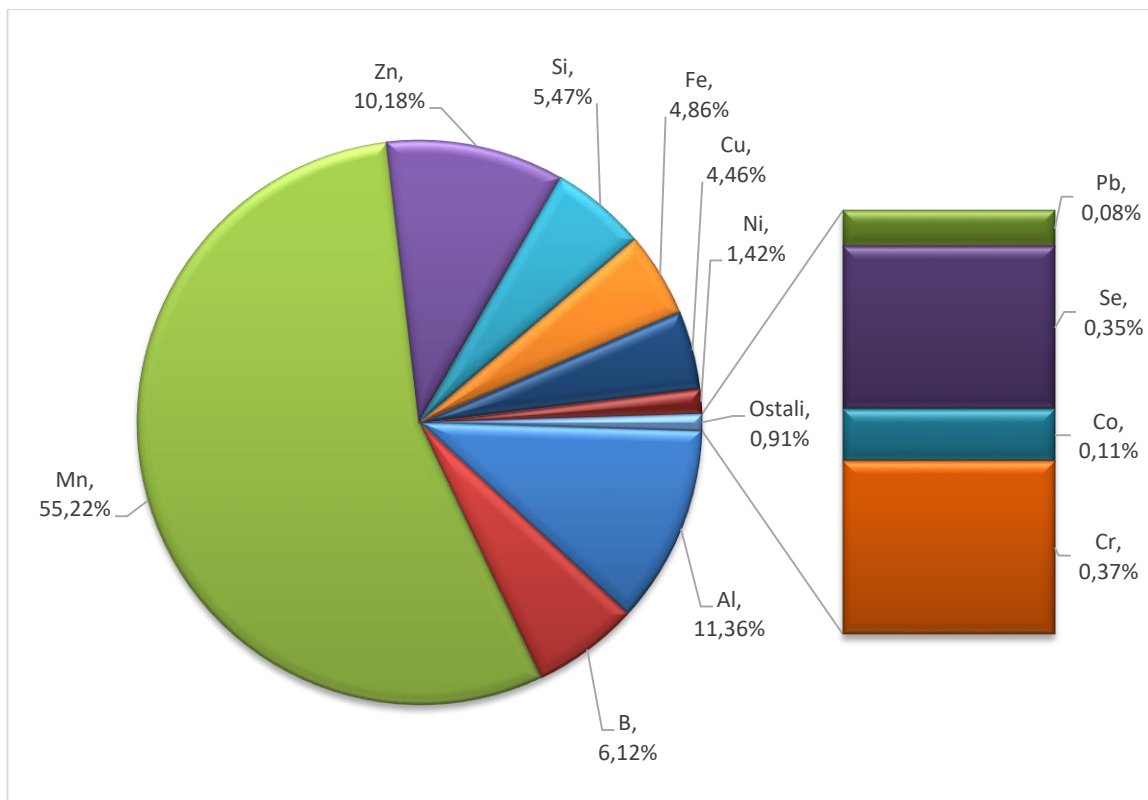
Tabela 5.10. Nastavak

Vrsta uzorka	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Ni (µg/g)	Pb (µg/g)	Se (µg/g)	Si (µg/g)	Zn (µg/g)	Referenca
Jagoda-Srbija	5,33-10,6	14,0-35,1	0,812-3,31	0,141-0,164	0,283-0,62	5,9-9,7	8,5-18,5	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Jagoda-Mađarska	2,8-9,5	2,8-3,4	-	-	-	-	0,8-1,1	<i>Hegedüs i sar., 2008</i>
Jagoda-Kina	52,18	104,63	2,78	0,138	0,073	-	11,39	<i>Zhang i sar., 2014</i>
Jagoda-Pakistan	6,04-19,27	2,19-4,62	-	-	-	-	0,82-2,33	<i>Khan i sar., 2010</i>
Jagoda-Finska	2,13-4,49	2,32-4,39	-	n.d	-	-	0,8-1,5	<i>Hakala i sar., 2003</i>
Borovnica-Srbija	4,18-10,4	43,9-95	1,42-2,55	0,062-0,145	0,275-0,626	5,8-8,1	6,6-19,9	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Borovnica-Kina	83,67	142,0	2,22	0,136	0,042	-	21,64	<i>Zhang i sar., 2014</i>
Borovnica-Poljska	5,31-12,7	2,94-29,0	0,170-0,312	0,266-0,556	-	-	2,95-6,07	<i>Drózdź i sar., 2018</i>
Borovnica-Letoniya	2,3-6,8	1,4-45,3	-	-	-	-	0,8-3,0	<i>Karlsons i sar., 2018</i>
Kupina-Srbija	4,79-12,8	15,5-169	0,728-3,49	0,091-0,125	0,187-0,633	10,6-16	7,8-14,1	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
Kupina-Brazil	10,2-47,0	4,2-14,7	-	-	-	-	1,6-3-1	<i>Guedes i sar., 2013</i>
*Kupina-Italija	37,9-84,5	17,1-31,0	-	-	-	-	19,6-29,5	<i>Plessi i sar., 2007</i>
Malina-Srbija	4,79-15,9	13,7-73	0,981-4,58	0,109-0,160	0,113-0,486	9,2-15,6	1,61-17,1	<i>Nikolić i sar., 2016</i>
*Malina-Italija	70,2-141,6	10,8-31,1	-	-	-	-	28,3-32,9	<i>Plessi i sar., 2007</i>
Malina-nema geografske odrednice	6,90	6,70	-	-	0,002	-	4,20	<i>Rao i Snyder, 2010</i>

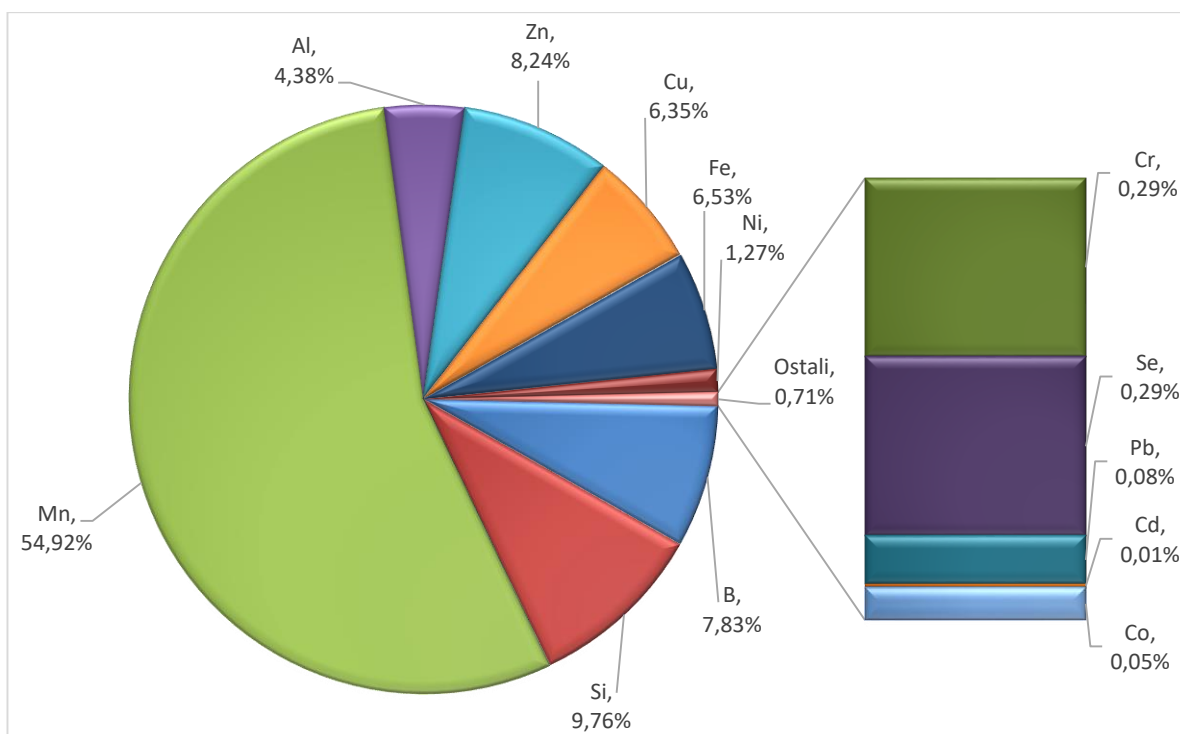
*rezultati se odnose na suhu materiju



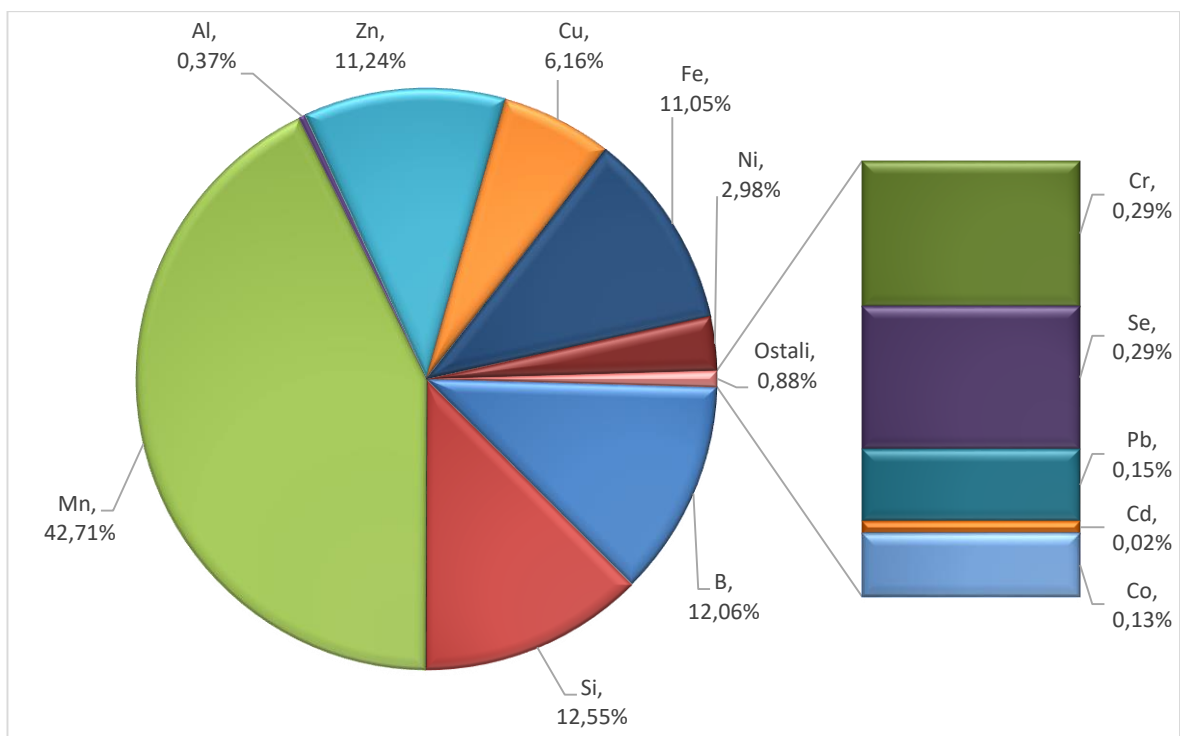
Slika 5.8. Prosečan sadržaj mikroelemenata (%) u uzorcima jagoda



Slika 5.9. Prosečan sadržaj mikroelemenata (%) u uzorcima borovnica



Slika 5.10. Prosečan sadržaj mikroelemenata (%) u uzorcima kupina



Slika 5.11. Prosečan sadržaj mikroelemenata (%) u uzorcima malina

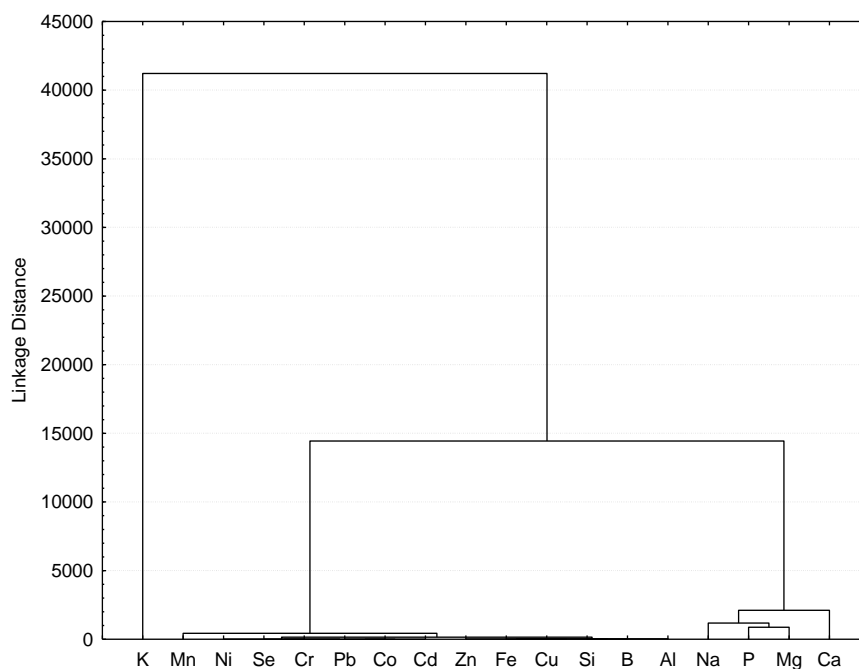
Kako bi se izvršila diferencijacija uzoraka jagodastog voća na osnovu sadržaja makro i mikroelemenata, primenjene su statističke metode analize: Pirsonova korelaciona analiza, analiza glavnih komponenti i klaster analiza. Rezultati Pirsonove korelacione analize predstavljeni su u tabeli 5.11.

Uočava se da između makroelemenata kalcijuma i magnezijuma, kao i između kalijuma, magnezijuma i fosfora, postoji dobra pozitivna korelacija. Takođe, postoji dobra korelacija između mikroelemenata nikla i kadmijuma. Olovo je u dobroj korelaciji sa makroelementima fosforom i kalijumom, i sa mikroelementima borom i kobaltom. Između silicijuma i aluminijuma takođe postoji dobra korelacija, što je očekivano, s obzirom da je aluminijum u zemljištu u velikoj meri prisutan u obliku silikata. Mnogo parametara utiče na korelacije između elemenata, što dovodi do toga da se validan zaključak i grupisanje analiziranih uzoraka ne može izvršiti samo na osnovu Pirsonove korelacione analize. Dobijeni podaci su dalje diskutovani primenom PCA i klaster analize.

Tabela 5.11. Matrica Pirsonovih koeficijenata korelacije ($p < 0,05$)

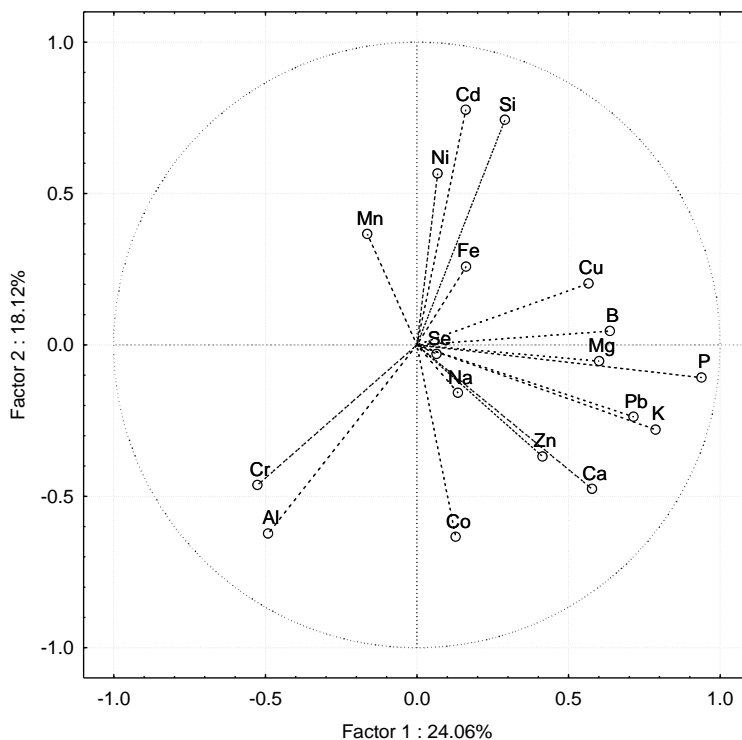
	Ca	K	Mg	P	Na	Al	B	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Se	Si	Zn
Ca	1.00	0.38	0.59	0.47	0.21	0.04	0.50	-0.51	0.05	0.07	0.48	-0.22	-0.07	-0.38	0.30	-0.06	0.05	0.41
K		1.00	0.46	0.88	-0.03	-0.20	0.35	0.08	0.46	-0.40	0.20	0.03	-0.39	-0.07	0.71	0.04	-0.11	0.11
Mg			1.00	0.58	0.17	-0.25	0.21	-0.08	-0.32	-0.12	0.45	0.24	-0.03	-0.45	0.07	-0.14	0.28	0.18
P				1.00	-0.03	-0.46	0.42	0.08	0.22	-0.55	0.39	0.26	-0.40	-0.05	0.68	0.02	0.13	0.35
Na					1.00	0.16	0.12	-0.07	0.06	0.21	0.24	-0.05	0.54	-0.02	0.24	0.10	0.02	0.42
Al						1.00	-0.24	-0.45	0.32	0.52	-0.07	-0.33	0.10	-0.32	-0.30	0.23	-0.63	0.06
B							1.00	0.20	0.18	-0.03	0.45	0.01	0.07	0.36	0.50	-0.08	0.30	0.32
Cd								1.00	-0.20	-0.44	0.08	0.24	0.37	0.74	0.14	0.01	0.33	-0.17
Co									1.00	0.11	-0.33	-0.33	-0.22	0.14	0.57	0.21	-0.65	0.26
Cr										1.00	-0.36	-0.01	-0.04	-0.26	-0.37	-0.30	-0.36	0.04
Cu											1.00	0.03	0.24	0.03	0.07	0.43	0.49	0.28
Fe												1.00	-0.37	-0.03	-0.12	-0.46	0.14	0.23
Mn													1.00	0.37	-0.14	0.23	0.21	0.01
Ni														1.00	0.18	0.07	0.21	0.04
Pb															1.00	0.09	-0.13	0.39
Se																1.00	0.04	0.11
Si																	1.00	-0.27
Zn																		1.00

Grupisanje elemenata na osnovu sadržaja izvršeno je primenom klaster analize, po Ward-ovoj metodi. Na slici 5.12. prikazan je dendrogram grupisanja makro i mikroelemenata na osnovu sadržaja u uzorcima jagodastog voća, gde se zapažaju dva klastera. Prvi klaster sa sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su grupisani mikroelementi. U drugom potklasteru su grupisani makroelementi Ca, Mg, Na i P. Kao makroelement sa najvećim sadržajem u svim uzorcima, K se izdvojio u posebnom klasteru.



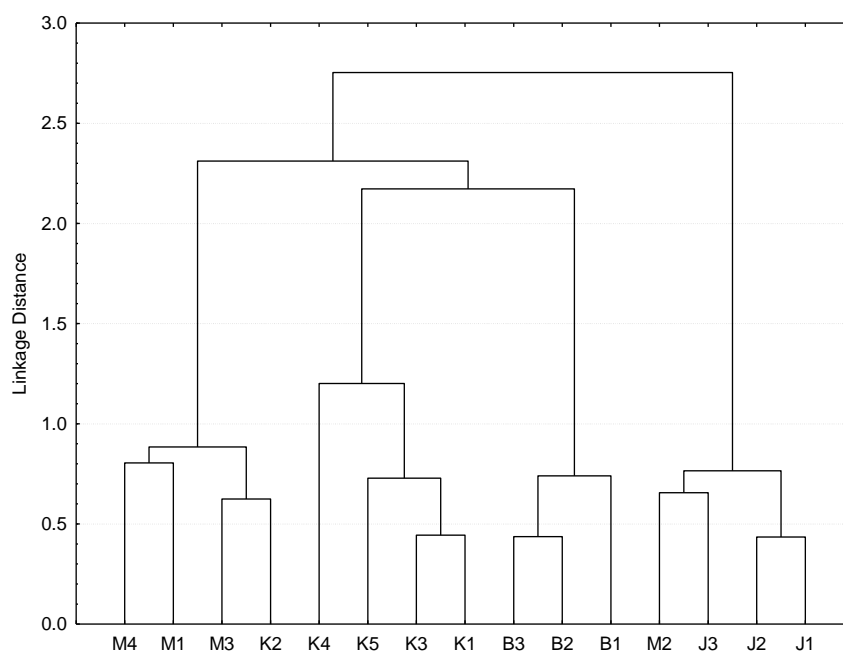
Slika 5.12. Dendrogram grupisanja makro i mikroelemenata na osnovu sadržaja u uzorcima jagodastog voća

Grupisanje elemenata primenom analize glavnih komponenti prikazano je na slici 5.13, gde se može uočiti da prvu komponentu, koja objašnjava 24,06% varijabiliteta, opisuju elementi sa visokim pozitivnim faktorskim zasićenjem: K (0,787), P (0,939), Mg (0,601), Ca (0,587) i Pb (0,714). Elementi Zn, Co i Na pokazali su manja pozitivna faktorska zasićenja (0,414, 0,128 i 0,135). Negativno faktorsko zasićenje pokazali su Al (-0,491) i Cr (-0,526) i Mn (-0,163). Drugu komponentu, koja objašnjava 18,12% varijabiliteta, opisuju elementi sa visokim pozitivnim faktorskim zasićenjem: Cd (0,776) i Si (0,743), dok su Ni (0,567), Fe (0,259) i Cu (0,203) imali niža faktorska zasićenja. Manje negativno faktorsko zasićenje pokazali su Al (-0,623) i Cr (-0,462).



Slika 5.13. PC1-PC2 dijagram raspodele makro i mikroelemenata na osnovu njihovog sadržaja u uzorcima jagodastog voća

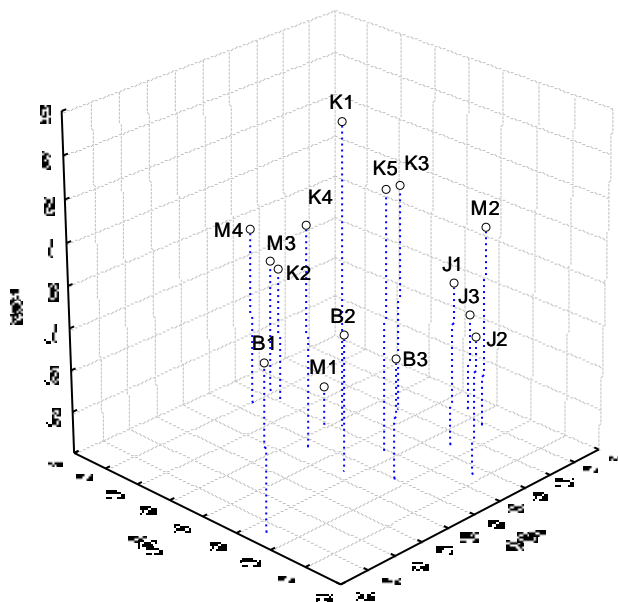
Grupisanje uzoraka jagoda, borovnica, kupina i malina, izvršeno je na osnovu sadržaja elemenata primenom klaster analize, po Ward-ovoj metodi (slika 5.14).



Slika 5.14. Dendrogram grupisanja uzoraka jagodastog voća na osnovu sadržaja elemenata

Na dendrogramu (slika 5.14) se zapažaju dva klastera. Prvi klaster čine uzorci jagode J1, J2, J3 i jedan uzorak malina (M2). Drugi klaster čine dva potklastera. U prvom potklasteru se nalaze uzorci maline M1, M3 i M4, i uzorak kupine K2. U drugom potklasteru se opet zapažaju dva potklastera, gde su u prvom grupisani svi uzorci borovnice, a u drugom uzorci kupine K1, K3, K4 i K5. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je vrsta voća dominantan faktor na osnovu koga se uzorci grupišu.

Grupisanje uzoraka primenom analize glavnih komponenti prikazano je na slici 5.15. Prve tri komponente objašnjavaju ukupno 56,26% varijabiliteta. Sa slike se može videti da se uzorci mogu klasifikovati u četiri grupe. Prvu grupu čine uzorci jagode i jedan uzorak maline, M2, sa pozitivnim vrednostima prvog faktora i negativnim vrednostima drugog i trećeg faktora. Drugu grupu čine uzorci borovnice, sa negativnim vrednostima prvog, drugog i trećeg faktora. Treću grupu čine uzorci malina M1, M3 i M4, i uzorak kupine K2, koji se odlikuju vrednostima prvog faktora oko nule i pozitivnim vrednostima drugog faktora, kao i negativnim vrednostima trećeg faktora. Četvrtu grupu čine uzorci kupine K1, K3, K4 i K5, koji se odlikuju pozitivnom vrednošću drugog faktora (osim uzorka K5, gde je $PC2 = -0,729$) i pozitivnom vrednošću trećeg faktora. Grupisanje uzoraka primenom PCA analize u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim primenom klaster analize.



Slika 5.15. PC1-PC2-PC3 dijagram raspodele uzoraka jagodastog voća na osnovu sadržaja elemenata

5.2. Spektrofotometrijska analiza jagodastog voća

Primenom spektrofotometrijske analize, u uzorcima jagodastog voća određen je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana. Ekstrakti su dobijeni korišćenjem šest različitih rastvarača: zakišeljani 80% metanol, metanol, 96 % etanol, 60% etanol, voda i aceton. Ispitan je i antioksidativni kapacitet pomenutih ekstrakata jagodastog voća, primenom četiri *in vitro* spektrofotometrijska testa: ABTS, DPPH, FRAP i RP.

5.2.1. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana u uzorcima jagoda, kupina, borovnica i malina, predstavljen je kao srednja vrednost tri ponavljanja ($c_{sr} \pm SD$, $n = 3$) i prikazan je u tabeli 5.12.

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima jagoda je u opsegu 2,32-3,37 mg GAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 2,14-2,46 mg GAE/g u metanolnim ekstraktima, 1,97-2,80 mg GAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 2,04-2,53 mg GAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,94-1,48 mg GAE/g u vodenim ekstraktima i 1,88-2,11 mg GAE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima jagoda je u opsegu 0,50-0,67 mg CE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,39-0,64 mg CE/g u metanolnim ekstraktima, 0,38-0,60 mg CE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,37-0,59 mg CE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,30-0,45 mg CE/g u vodenim ekstraktima i 0,37-0,58 mg CE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih antocijana u uzorcima jagoda je u opsegu 0,21-0,282 mg cy-3-glu/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,20-0,24 mg cy-3-glu/g u metanolnim ekstraktima, 0,19-0,24 mg cy-3-glu/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,20-0,21mg cy-3-glu/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,11-0,16 mg cy-3-glu/g u vodenim ekstraktima i 0,15-0,18 mg cy-3-glu/g u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima kupina je u opsegu 3,38-5,96 mg GAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 1,49-3,66 mg GAE/g u metanolnim ekstraktima, 2,00-4,15 mg GAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 2,14-3,35 mg GAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 1,62-2,70 mg GAE/g u vodenim ekstraktima i 2,00-4,90 mg GAE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima kupina je u opsegu 0,52-1,59 mg CE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,38-1,34 mg CE/g u metanolnim ekstraktima, 0,41-1,25 mg CE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,37-1,14 mg

CE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,22-0,95 mg CE/g u vodenim ekstraktima i 0,30-1,28 mg CE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih antocijana u uzorcima kupina je u opsegu 0,91-3,65 mg cy-3-glu/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,79-3,17 mg cy-3-glu/g u metanolnim ekstraktima, 0,63-2,92 mg cy-3-glu/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,565-3,10 mg cy-3-glu/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,48-2,73 mg cy-3-glu/g u vodenim ekstraktima i 0,76-3,20 mg cy-3-glu/g u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima borovnica je u opsegu 3,72-5,93 mg GAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 2,65-4,11 mg GAE/g u metanolnim ekstraktima, 2,40-3,98 mg GAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 2,18-3,38 mg GAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 1,76-2,80 mg GAE/g u vodenim ekstraktima i 2,52-3,70 mg GAE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima borovnica je u opsegu 0,63-1,57 mg CE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,54-1,34 mg CE/g u metanolnim ekstraktima, 2,40-3,98 mg CE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,45-1,04 mg CE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,321-0,92 mg CE/g u vodenim ekstraktima i 0,41-1,20 mg CE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih antocijana u uzorcima borovnica je u opsegu 2,42-3,82 mg cy-3-glu/g u kiselometanolnim ekstraktima, 2,21-3,54 mg cy-3-glu/g u metanolnim ekstraktima, 2,06-3,08 mg cy-3-glu/g u 96% etanolnim ekstraktima, 1,83-2,78 mg cy-3-glu/g u 60% etanolnim ekstraktima, 1,75-2,43 mg cy-3-glu/g u vodenim ekstraktima i 2,11-3,16 mg cy-3-glu/g u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima malina je u opsegu 2,82-4,72 mg GAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 1,82-2,22 mg GAE/g u metanolnim ekstraktima, 1,37-2,46 mg GAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 2,37-3,90 mg GAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 1,34-1,64 mg GAE/g u vodenim ekstraktima i 2,10-3,20 mg GAE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima malina je u opsegu 0,52-0,64 mg CE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,39-0,54 mg CE/g u metanolnim ekstraktima, 0,412-0,64 mg CE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,32-0,59 mg CE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,21-0,43 mg CE/g u vodenim ekstraktima i 0,47-0,52 mg CE/g u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ukupnih antocijana u uzorcima malina je u opsegu 0,459-0,70 mg cy-3-glu/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,423-0,65 mg cy-3-glu/g u metanolnim ekstraktima, 0,412-0,64 mg cy-3-glu/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,385-0,618 mg cy-3-glu/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,37-0,57 mg cy-3-glu/g u vodenim ekstraktima i 0,41-0,59 mg cy-3-glu/g u acetonskim ekstraktima.

Najveća koncentracija ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana detektovana je u ekstraktima gde je kao rastvarač za ekstrakciju korišćen

zakišeljani metanol, dok je najniža koncentracija detektovana u vodenim ekstraktima. Poređenjem rezultata u odnosu na analizirane uzorke, zapaža se da je najveći sadržaj ukupnih polifenilnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana detektovan u uzorcima borovnica, potom slede uzorci kupina, malina i na kraju jagoda.

Pregledom literature, utvrđeno je da se najčešće primenjuju polarni rastvarači: metanol, etanol, aceton, voda zakišeljena nizom organskih i neorganskih kiselina (*Barnes i sar.*, 2009; *Metivier i sar.*, 1980; *Vatai i sar.*, 2009). U radu *Metivier i saradnika* (1980) ispitan je efekat različitih rastvarača (metanol, etanol i voda) i kombinacije kiselina (hlorovodonična, limunska, sirćetna, vinska i mravlja kiselina) na ekstrakciju antocijana iz komine grožđa. Utvrđeno je da je primenom metanola ekstrahovano 20%, odnosno 73% više antocijana u odnosu na prinos dobijen primenom etanola i vode kao rastvarača. U cilju dobijanja ekstrakata kupina koji sadrže antocijane, u radu *Ivanović i saradnika* (2014) kao rastvarač primenjen je zakišeljani etanol. Prilikom ekstrakcije antocijana iz trešanja, nije zabeležena značajna razlika u efikasnosti zakišljenog metanola i zakišljenog etanola (*Blackhall i sar.*, 2018). Smeša metanol/voda/trifluorosirćetna kiselina (70:30:1, v/v/v) pokazala se najefikasnijom za ekstrakciju antocijana iz borovnice (*Barnes i sar.*, 2009). Za ekstrakciju biološki aktivnih jedinjenja iz malina može se primeniti 80% metanol zakišljen sirćetnom kiselinom (*Vulić i sar.*, 2014).

Tabela 5.12. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana u različitim ekstraktima uzoraka jagode, kupine, borovnice i maline

Uzorak	Rastvarač	Ukupni polifenoli		Ukupni flavonoidi		Ukupni antocijani	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg cy-3-glu/g)	RSD (%)
J1	80% Metanol	3,23±0,03	0,93	0,67±0,02	2,98	0,282±0,003	1,06
	Metanol	2,46±0,07	2,84	0,64±0,01	1,56	0,24±0,01	4,17
	96% Etanol	2,80±0,04	1,43	0,60±0,03	5,00	0,24±0,02	8,33
	60% Etanol	2,18±0,04	1,83	0,59±0,02	3,39	0,21±0,00	0
	Voda	1,28±0,01	0,78	0,45±0,01	2,22	0,16±0,01	6,25
	Aceton	2,11±0,04	1,89	0,58±0,02	3,45	0,18±0,01	5,55
J2	80% Metanol	3,37±0,09	2,67	0,53±0,00	0	0,24±0,01	4,11
	Metanol	2,36±0,06	2,54	0,52±0,01	1,92	0,23±0,02	8,69
	96% Etanol	2,63±0,03	1,14	0,49±0,01	2,04	0,22±0,01	4,54
	60% Etanol	2,53±0,04	1,58	0,50±0,03	6,00	0,210±0,003	1,43
	Voda	1,48±0,02	1,35	0,38±0,01	2,63	0,11±0,01	9,09
	Aceton	2,10±0,02	0,95	0,48±0,02	4,17	0,15±0,01	6,67
J3	80% Metanol	2,32±0,08	3,45	0,50±0,02	4,00	0,21±0,01	4,67
	Metanol	2,14±0,05	2,34	0,39±0,01	2,56	0,20±0,01	5,00
	96% Etanol	1,97±0,03	1,52	0,38±0,01	2,63	0,19±0,01	5,26
	60% Etanol	2,04±0,08	3,92	0,37±0,02	5,40	0,20±0,01	4,87
	Voda	0,94±0,04	4,25	0,30±0,01	3,33	0,141±0,002	1,42
	Aceton	1,88±0,06	3,19	0,37±0,02	3,36	0,15±0,01	6,76
K1	80% Metanol	3,38±0,00	0	0,642±0,001	0,16	0,99±0,01	1,01
	Metanol	2,02±0,05	2,47	0,61±0,03	4,92	0,85±0,02	2,35
	96% Etanol	2,8±0,1	3,58	0,57±0,02	3,51	0,76±0,01	1,31
	60% Etanol	2,14±0,05	2,33	0,45±0,04	8,89	0,565±0,001	0,18
	Voda	2,17±0,05	2,30	0,37±0,02	5,41	0,481±0,004	0,83

	Aceton	2,7±0,1	3,71	0,341±0,002	0,59	0,76±0,02	2,63
	80% Metanol	3,6±0,1	2,78	0,52±0,00	0	0,99±0,04	4,03
K2	Metanol	2,76±0,06	2,17	0,38±0,02	5,26	0,79±0,01	1,26
	96% Etanol	2,13±0,01	0,34	0,45±0,03	6,67	0,63±0,01	1,59
	60% Etanol	2,38±0,06	2,52	0,48±0,04	8,33	0,71±0,02	2,82
	Voda	2,49±0,06	2,41	0,220±0,009	4,09	0,553±0,001	0,18
	Aceton	2,8±0,2	7,17	0,44±0,01	2,27	0,76±0,01	1,32
K3	80% Metanol	3,5±0,1	2,86	0,56±0,02	3,57	0,91±0,02	2,21
	Metanol	1,49±0,04	2,68	0,53±0,01	1,89	0,82±0,02	2,44
	96% Etanol	2,00±0,02	1,00	0,45±0,02	4,44	0,75±0,01	1,33
	60% Etanol	2,15±0,04	1,86	0,37±0,01	2,70	0,657±0,003	0,46
	Voda	1,62±0,06	3,70	0,26±0,01	3,85	0,643±0,005	0,78
K4	Aceton	2,0±0,1	5,00	0,39±0,03	7,69	0,84±0,01	1,19
	80% Metanol	3,76±0,02	0,53	0,59±0,02	3,39	1,33±0,01	0,75
	Metanol	2,32±0,01	0,43	0,45±0,01	2,22	1,16±0,02	1,72
	96% Etanol	2,38±0,04	1,68	0,41±0,01	2,44	0,94±0,01	1,06
	60% Etanol	2,80±0,05	1,78	0,39±0,02	5,13	0,90±0,03	3,33
	Voda	2,12±0,06	2,83	0,25±0,01	4,00	0,88±0,01	1,14
K5	Aceton	3,56±0,09	2,53	0,301±0,002	0,66	1,02±0,05	4,90
	80% Metanol	5,96±0,07	1,17	1,59±0,03	1,87	3,65±0,04	1,09
	Metanol	3,66±0,05	1,37	1,34±0,02	1,49	3,17±0,03	0,95
	96% Etanol	4,15±0,09	2,17	1,25±0,04	3,20	2,92±0,01	0,34
	60% Etanol	3,35±0,06	1,79	1,14±0,02	1,75	3,10±0,02	0,64
	Voda	2,7±0,1	3,66	0,95±0,01	1,05	2,73±0,01	0,37
B1	Aceton	4,9±0,2	4,09	1,28±0,01	0,78	3,20±0,02	0,62
	80% Metanol	3,72±0,06	1,61	0,63±0,02	3,17	2,42±0,04	1,65
	Metanol	2,65±0,07	3,41	0,54±0,02	3,70	2,21±0,05	2,26
	96% Etanol	2,4±0,1	4,16	0,50±0,01	2,00	2,06±0,02	0,97
	60% Etanol	2,18±0,03	1,38	0,45±0,01	2,22	1,83±0,01	0,55

	Voda	1,76±0,05	2,84	0,37±0,02	5,40	1,75±0,02	1,14
	Aceton	2,52±0,2	7,94	0,41±0,01	2,44	2,11±0,04	1,89
B2	80% Metanol	4,4±0,1	2,29	0,92±0,05	5,43	2,7±0,2	7,35
	Metanol	4,0±0,1	2,16	0,79±0,02	2,53	2,45±0,01	0,41
	96% Etanol	3,77±0,06	1,59	0,64±0,01	1,56	2,12±0,01	0,48
	60% Etanol	3,38±0,01	0,29	0,68±0,02	2,94	2,30±0,05	2,17
	Voda	2,8±0,1	3,62	0,321±0,004	1,25	1,87±0,03	1,60
	Aceton	3,5±0,2	5,71	0,57±0,02	3,51	2,33±0,07	3,00
B3	80% Metanol	5,93±0,06	1,01	1,57±0,03	1,91	3,8±0,1	2,61
	Metanol	4,1±0,1	2,43	1,34±0,02	1,49	3,54±0,06	1,69
	96% Etanol	3,98±0,07	1,76	0,87±0,02	2,30	3,08±0,08	2,60
	60% Etanol	3,03±0,07	2,31	1,04±0,01	0,96	2,78±0,07	2,52
	Voda	2,78±0,08	2,88	0,92±0,01	1,09	2,43±0,05	2,06
	Aceton	3,7±0,3	8,08	1,20±0,01	0,83	3,16±0,01	0,32
M1	80% Metanol	2,82±0,03	1,06	0,52±0,02	3,85	0,58±0,04	6,88
	Metanol	1,8±0,1	5,43	0,51±0,02	3,92	0,525±0,007	1,33
	96% Etanol	1,39±0,01	0,72	0,37±0,01	2,70	0,53±0,01	1,89
	60% Etanol	2,37±0,06	2,53	0,46±0,04	8,69	0,48±0,01	2,08
	Voda	1,34±0,01	0,75	0,34±0,02	5,88	0,460±0,004	0,87
	Aceton	2,1±0,2	9,34	0,47±0,01	2,13	0,50±0,01	2,00
M2	80% Metanol	4,72±0,06	1,27	0,64±0,02	3,12	0,70±0,02	2,86
	Metanol	1,82±0,09	4,94	0,52±0,03	5,78	0,65±0,01	1,54
	96% Etanol	1,63±0,02	1,23	0,47±0,01	2,13	0,64±0,02	3,12
	60% Etanol	3,9±0,1	2,56	0,59±0,02	3,39	0,618±0,008	1,29
	Voda	1,64±0,02	1,22	0,43±0,03	6,98	0,57±0,01	1,75
	Aceton	3,2±0,1	3,12	0,49±0,01	2,04	0,59±0,02	3,39
M3	80% Metanol	3,0±0,1	3,33	0,590±0,001	0,17	0,459±0,005	1,09
	Metanol	2,22±0,06	2,72	0,54±0,01	1,85	0,423±0,004	0,94
	96% Etanol	2,46±0,06	2,44	0,42±0,02	4,76	0,41±0,01	2,43

	60% Etanol	2,44±0,04	1,64	0,32±0,01	3,12	0,385±0,009	2,34
	Voda	1,37±0,05	3,65	0,30±0,02	6,67	0,37±0,01	2,70
	Aceton	2,6±0,1	3,85	0,47±0,01	0,32	0,41±0,01	2,44
	80% Metanol	2,96±0,08	2,70	0,53±0,02	3,77	0,53±0,02	3,74
	Metanol	2,03±0,05	1,65	0,39±0,01	2,56	0,50±0,03	6,00
M4	96% Etanol	1,37±0,05	3,65	0,46±0,02	4,35	0,49±0,01	2,04
	60% Etanol	2,2±0,1	4,54	0,33±0,02	6,06	0,425±0,004	0,94
	Voda	1,45±0,01	0,69	0,21±0,01	4,76	0,38±0,01	2,63
	Aceton	2,1±0,2	9,52	0,52±0,01	1,92	0,44±0,03	6,82

5.2.4. Antioksidativni kapacitet jagodastog voća

Antioksidativni kapacitet ekstrakata uzoraka jagoda, kupina, borovnica i malina, predstavljen je kao srednja vrednost tri ponavljanja ($c_{sr} \pm SD$, $n = 3$) i prikazan je u tabeli 5.13.

Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka jagoda prema ABTS radikalu su u opsegu 0,2108-0,238 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,2065-0,228 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 0,202-0,2149 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,197-0,2058 mmol TE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,1813-0,200 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 0,2021-0,2172 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka jagoda prema DPPH radikalu su u opsegu 5,05-5,7 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 4,38-5,22 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 4,16-4,82 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 3,65-4,22 mmol TE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 3,16-3,32 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 4,43-4,88 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom FRAP testa su u opsegu 21,2-24,6 mmol FE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 19,83-22,48 mmol FE/g u metanolnim ekstraktima, 17,77-20,05 mmol FE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 15,72-21,08 mmol FE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 16,31-17,88 mmol FE/g u vodenim ekstraktima i 16,80-21,26 mmol FE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom RP testa su u opsegu 12,6-14,7 mmol AAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 11,4-13,11 mmol AAE/g u metanolnim ekstraktima, 10,03-11,8 mmol AAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 8,79-10,46 mmol AAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 7,5-9,20 mmol AAE/g u vodenim ekstraktima i 10,31-11,6 mmol AAE/g u acetonskim ekstraktima.

Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka kupina prema ABTS radikalu su u opsegu 0,2541-0,5462 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,2186-0,3607 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 0,2042-0,3853 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,2038-0,3269 mmol TE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,1821-0,2720 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 0,2035-0,2855 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka kupina prema DPPH radikalu su u opsegu 7,6-13,1 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 4,71-9,3 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 4,36-6,8 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 3,93-6,12 mmol TE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 3,33-5,28 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 4,39-6,52 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom FRAP testa su u opsegu 22,6-52,6

mmol FE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 21,95-34,5 mmol FE/g u metanolnim ekstraktima, 21,25-33,84 mmol FE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 20,3-31,58 mmol FE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 17,11-25,98 mmol FE/g u vodenim ekstraktima i 21,1-28,3 mmol FE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom RP testa su u opsegu 19,5-31,6 mmol AAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 17,2-23,4 mmol AAE/g u metanolnim ekstraktima, 17,8-27,5 mmol AAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, mmol 17,1-19,4 mmol AAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 13,3-16,3 mmol AAE/g u vodenim ekstraktima i 17,0-23,0 mmol AAE/g u acetonskim ekstraktima.

Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka borovnica prema ABTS radikalu su u opsegu 0,3127-0,5089 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,3045-0,456 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 0,2866-0,429 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,283-0,401 mmol TE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,262-0,3668 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 0,295-0,414 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka borovnica prema DPPH radikalu su u opsegu 7,5-12,19 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 6,22-11,38 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 7,12-10,8 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 5,9-10,1 mmol TE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 5,42-9,4 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 6,3-10,31 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom FRAP testa su u opsegu 32,0-49,0 mmol FE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 30,52-42,5 mmol FE/g u metanolnim ekstraktima, 27,8-40,6 mmol FE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 26,4-39,0 mmol FE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 23,9-35,7 mmol FE/g u vodenim ekstraktima i 27,4-38,6 mmol FE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom RP testa su u opsegu 18,9-29,4 mmol AAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 18,3-27,5 mmol AAE/g u metanolnim ekstraktima, 17,1-25,5 mmol AAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 14,7-23,6 mmol AAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 12,4-21,4 mmol AAE/g u vodenim ekstraktima i 15,7-26,3 mmol AAE/g u acetonskim ekstraktima.

Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka malina prema ABTS radikalu su u opsegu 0,2494-0,3220 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 0,234-0,2559 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 0,212-0,262 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 0,204-0,258 mmol TE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 0,182-0,228 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 0,217-0,276 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka malina prema DPPH radikalu su u opsegu 6,1-7,2 mmol TE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 5,82-6,8 mmol TE/g u metanolnim ekstraktima, 5,5-6,35 mmol TE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 5,1-5,97 mmol TE/g u 60% etanolnim

ekstraktima, 4,05-5,34 mmol TE/g u vodenim ekstraktima i 5,41-6,1 mmol TE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom FRAP testa su u opsegu 27,0-34,5 mmol FE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 25,7-32,1 mmol FE/g u metanolnim ekstraktima, 22,5-28,15 mmol FE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 23,0-26,7 mmol FE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 20,6-23,5 mmol FE/g u vodenim ekstraktima i 24,58-27,8 mmol FE/g u acetonskim ekstraktima. Dobijeni rezultati primenom RP testa su u opsegu 16,1-19,2 mmol AAE/g u kiselometanolnim ekstraktima, 15,1-18,3 mmol AAE/g u metanolnim ekstraktima, 13,82-16,5 mmol AAE/g u 96% etanolnim ekstraktima, 12,6-15,2 mmol AAE/g u 60% etanolnim ekstraktima, 11,7-13,43 mmol AAE/g u vodenim ekstraktima i mmol AAE/g u acetonskim ekstraktima.

Na osnovu prikazanih rezultata u tabeli 5.13. zaključuje se da najveću antioksidativnu aktivnost ispoljavaju oni ekstrakti gde je kao ekstragens korišćen zakišeljani metanol. Ovakvi rezultati su bili očekivani, s obzirom na rezultate iz tabele 5.12., gde se zakišeljani metanol pokazao najefikasnijim pri ekstrakciji ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana, pa će se i dalja diskusija rezultata baviti upravo ovim ekstraktima.

Ograničenje svih *in vitro* testova je činjenica da se merenja antioksidativne aktivnosti odvijaju u nefiziološkim uslovima. Treba imati na umu da njihovi rezultati ne oslikavaju obavezno antioksidativne kapacitete materija koje bi svoju aktivnost ispoljile u biološkim sistemima kod ljudi, životinja ili biljaka (*Benzie i Devaki, 2017*).

DPPH i ABTS testovi zasnivaju se na sposobnosti antioksidanata da uklanjaju slobodne radikale. Većina analiziranih uzoraka jagodastog voća pokazala je vrlo bliske vrednosti za ABTS radikal-hvatačku aktivnost. U uzorcima jagoda, vrednosti su bile u opsegu 0,2108-0,238 mmol TE/g. U uzorcima kupina, vrednosti su bile u opsegu 0,2541-0,2558 TE/g, a izuzetak je uzorak K5 gde je ABTS aktivnost više nego dvostruko veća u odnosu na ostale uzorke kupina i iznosi 0,5462 mmol TE/g. U uzorcima borovnica, vrednosti su bile u opsegu 0,3127-0,3411 mmol TE/g, a izuzetak je uzorak B3 gde je ABTS aktivnost 1,5 puta veća u odnosu na ostale uzorke borovnica i iznosi 0,5089 mmol TE/g. U uzorcima malina, vrednosti su bile u opsegu 0,2494-0,322 mmol TE/g. Vrednosti dobijene DPPH testom bile su veće od vrednosti dobijenih ABTS testom, i bile su u opsegu 5,05-5,7 mmol TE/g u jagodama, 7,6-13,1 mmol TE/g u kupinama, 7,5-12,19 mmol TE/g u borovnicama i 6,1-7,2 mmol TE/g u jagodama. Uzrok ovome može biti činjenica da DPPH radikal mogu redukovati jedinjenja koja su donori vodonika, kao i slobodni radikali, dok se ABTS radikal redukuje jedinjenjima koja sadrže kiseonik (*Campos i Lissi, 1997*). Aktivnost

DPPH i ABTS radikala zavisi od pH vrednosti uzoraka koji se analiziraju. Dok je DPPH radikal osetljiv u kiseljoj sredini, ABTS test se može primeniti u širem opsegu pH. FRAP i RP testovi se temelje na sposobnosti antioksidanata da redukuju jone Fe^{3+} do jona Fe^{2+} . Dobijeni rezultati za FRAP i RP test su pokazali da je antioksidativni kapacitet uzoraka borovnice najveći, a zatim slede uzorci kupine, maline i na kraju jagode.

Međutim, kako prirodni antioksidanti sadrže bar jednu, a najčešće više različitih funkcionalnih grupa (*Manach i sar.*, 2005), antioksidativni kapaciteti ispitivanih uzoraka ne mogu se u potpunosti opisati samo jednom, u ovom slučaju, spektrofotometrijskom metodom. Zato su uzorci jagodastog voća, prethodno ekstrahovani zakišljenim metanolom, dodatno analizirani primenom elektrohemijske metode - ciklične voltometrije, a dobijeni rezultati upoređeni sa prethodno dobijenim.

Tabela 5.13. Antioksidativni kapaciteti različitih ekstrakata uzoraka jagode, kupine, borovnice i maline primenom ABTS, DPPH, FRAP i RP testa

Uzorak	Rastvarač	ABTS $c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)	DPPH $c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)	FRAP $c_{sr} \pm SD$ (mmol FE/g)	RSD (%)	RP $c_{sr} \pm SD$ (mmol AAE/g)	RSD (%)
J1	80% Metanol	0,238±0,001	0,42	5,7±0,0	0,00	24,6±0,2	0,81	14,7±0,3	2,04
	Metanol	0,228±0,004	1,75	5,22±0,02	0,38	22,48±0,07	0,31	12,3±0,1	0,81
	96% Etanol	0,2149±0,0007	0,33	4,82±0,02	0,41	20,05±0,03	0,15	11,8±0,2	1,69
	60% Etanol	0,2058±0,0008	0,39	4,22±0,01	0,24	21,08±0,05	0,24	10,46±0,04	0,38
	Voda	0,200±0,006	3,00	3,32±0,03	0,90	17,88±0,01	0,06	8,53±0,07	0,82
	Aceton	0,2123±0,0005	0,24	4,88±0,04	0,82	21,2±0,1	0,47	10,78±0,03	0,28
J2	80% Metanol	0,221±0,001	0,45	5,3±0,1	1,89	23,0±0,1	0,43	13,7±0,0	0,00
	Metanol	0,218±0,003	1,37	4,98±0,05	1,00	20,13±0,03	0,15	13,11±0,05	0,38
	96% Etanol	0,210±0,003	1,43	4,23±0,03	0,71	19,40±0,04	0,21	11,5±0,2	1,74
	60% Etanol	0,2049±0,0008	0,39	3,65±0,01	0,27	15,72±0,01	0,06	10,3±0,1	0,97
	Voda	0,196±0,006	3,06	3,16±0,05	1,58	16,51±0,05	0,30	9,20±0,01	0,11
	Aceton	0,2172±0,0007	0,32	4,43±0,03	0,68	16,80±0,01	0,06	11,6±0,2	1,72
J3	80% Metanol	0,2108±0,0006	0,28	5,05±0,05	0,99	21,2±0,1	0,47	12,6±0,3	2,38
	Metanol	0,2065±0,0004	0,19	4,38±0,01	0,23	19,83±0,05	0,25	11,4±0,1	0,88
	96% Etanol	0,202±0,004	1,98	4,16±0,01	0,24	17,77±0,03	0,17	10,03±0,03	0,30
	60% Etanol	0,197±0,001	0,51	3,71±0,04	1,08	18,50±0,05	0,27	8,79±0,05	0,57
	Voda	0,1813±0,0005	0,28	3,20±0,02	0,63	16,31±0,01	0,06	7,5±0,1	1,33
	Aceton	0,2021±0,0005	0,25	4,58±0,01	0,22	21,26±0,01	0,05	10,31±0,07	0,68
K1	80% Metanol	0,2588±0,0001	0,04	7,79±0,08	1,03	22,6±0,2	0,88	19,5±0,3	1,54
	Metanol	0,2504±0,0001	0,04	5,11±0,01	0,20	21,95±0,05	0,23	18,6±0,1	0,54
	96% Etanol	0,2253±0,0002	0,09	4,59±0,05	1,09	26,41±0,03	0,11	18,7±0,2	1,07
	60% Etanol	0,2165±0,0001	0,05	3,93±0,05	1,27	20,3±0,1	0,49	17,1±0,2	1,17
	Voda	0,1960±0,0002	0,10	3,91±0,02	0,51	17,11±0,05	0,29	13,3±0,5	3,76
	Aceton	0,2035±0,0001	0,05	5,06±0,02	0,40	24,8±0,1	0,40	20,0±0,1	0,50

K2	80% Metanol	0,2541±0,0006	0,24	7,6±0,1	1,32	33,2±0,2	0,60	19,9±0,6	3,02
	Metanol	0,2590±0,0003	0,12	5,06±0,01	0,20	23,20±0,05	0,22	17,2±0,1	0,58
	96% Etanol	0,2399±0,0001	0,04	4,46±0,01	0,22	21,25±0,05	0,24	17,8±0,3	1,69
	60% Etanol	0,2360±0,0003	0,13	4,5±0,1	2,22	20,71±0,07	0,34	17,5±0,1	0,57
	Voda	0,2046±0,0001	0,05	4,32±0,07	1,62	19,9±0,1	0,50	15,4±0,1	0,65
	Aceton	0,2378±0,0001	0,04	5,57±0,08	1,44	22,58±0,05	0,22	19,0±0,1	0,53
K3	80% Metanol	0,2542±0,0005	0,20	7,78±0,05	0,64	27,9±0,2	0,72	22,4±0,1	0,45
	Metanol	0,2186±0,0003	0,14	4,71±0,02	0,42	24,2±0,1	0,41	20,5±0,1	0,49
	96% Etanol	0,2179±0,0001	0,05	5,49±0,02	0,36	24,63±0,05	0,20	21,9±0,1	0,46
	60% Etanol	0,2038±0,0005	0,25	3,96±0,07	1,77	23,9±0,1	0,42	17,9±0,3	1,68
	Voda	0,1821±0,0000	0,00	3,33±0,02	0,60	20,68±0,05	0,24	15,2±0,2	1,32
	Aceton	0,2205±0,0003	0,14	4,47±0,02	0,45	21,28±0,08	0,38	17,0±0,1	0,59
K4	80% Metanol	0,2544±0,0006	0,24	7,98±0,05	0,63	39,5±0,3	0,76	22,9±0,2	0,87
	Metanol	0,2505±0,0001	0,04	6,2±0,1	1,61	30,2±0,1	0,33	19,4±0,1	0,52
	96% Etanol	0,2042±0,0003	0,15	4,36±0,03	0,69	25,21±0,07	0,28	19,9±0,1	0,50
	60% Etanol	0,2149±0,0001	0,05	5,47±0,02	0,37	21,26±0,05	0,24	18,4±0,1	0,54
	Voda	0,2152±0,0001	0,05	5,28±0,03	0,57	19,35±0,03	0,16	14,3±0,1	0,70
	Aceton	0,2395±0,0002	0,08	4,39±0,05	1,14	21,1±0,1	0,47	21,0±0,5	2,38
K5	80% Metanol	0,5462±0,0000	0,00	13,1±0,1	0,76	52,6±0,3	0,57	31,6±0,1	0,32
	Metanol	0,3607±0,0001	0,03	9,3±0,3	3,23	34,5±0,2	0,58	23,4±0,1	0,43
	96% Etanol	0,3853±0,0003	0,08	6,8±0,1	1,47	33,84±0,05	0,15	27,5±0,5	1,82
	60% Etanol	0,3269±0,0002	0,06	6,12±0,02	0,33	31,58±0,03	0,09	19,4±0,2	1,03
	Voda	0,2720±0,0001	0,04	5,08±0,05	0,98	25,98±0,05	0,19	16,3±0,1	0,61
	Aceton	0,2855±0,0003	0,11	6,52±0,1	1,53	28,3±0,5	1,77	23,0±0,2	0,87
B1	80% Metanol	0,3127±0,0006	0,19	7,5±0,1	1,33	32,0±0,1	0,31	18,9±0,1	0,53
	Metanol	0,3045±0,0008	0,26	6,22±0,06	0,96	30,52±0,03	0,10	18,3±0,2	1,09
	96% Etanol	0,2866±0,0007	0,24	7,12±0,05	0,70	27,8±0,1	0,36	17,3±0,1	0,58
	60% Etanol	0,283±0,001	0,35	5,9±0,1	1,69	26,4±0,1	0,38	14,7±0,3	2,04
	Voda	0,262±0,001	0,38	5,55±0,07	1,26	23,9±0,4	1,67	12,4±0,3	2,42

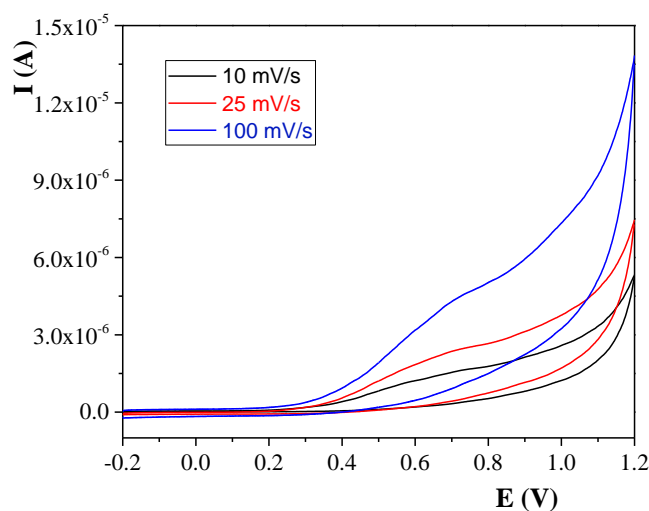
	Aceton	0,295±0,003	1,02	6,3±0,1	1,59	27,4±0,2	0,73	15,7±0,5	3,18
	80% Metanol	0,3411±0,0006	0,18	8,17±0,08	0,98	35,3±0,1	0,28	20,7±0,2	0,97
	Metanol	0,339±0,001	0,29	7,98±0,07	0,88	32,26±0,05	0,15	18,8±0,3	1,60
B2	96% Etanol	0,3121±0,0005	0,16	7,71±0,05	0,65	30,17±0,05	0,17	17,1±0,1	0,58
	60% Etanol	0,3068±0,0005	1,63	6,8±0,1	1,47	29,5±0,3	1,02	15,8±0,3	1,90
	Voda	0,276±0,001	0,36	5,42±0,05	0,92	26,75±0,09	0,34	14,3±0,5	3,50
	Aceton	0,3255±0,0007	0,22	7,84±0,05	0,64	29,1±0,5	1,72	17,5±0,4	2,29
	80% Metanol	0,5089±0,0005	0,10	12,19±0,08	0,66	49,0±0,3	0,61	29,4±0,2	0,68
	Metanol	0,456±0,004	0,88	11,38±0,09	0,79	42,5±0,3	0,71	27,5±0,5	1,82
B3	96% Etanol	0,429±0,005	1,17	10,8±0,2	1,85	40,6±0,7	1,72	25,5±0,1	0,39
	60% Etanol	0,401±0,001	0,25	10,1±0,1	0,99	39,0±0,6	1,54	23,6±0,3	1,27
	Voda	0,3668±0,0007	0,19	9,4±0,1	1,06	35,7±0,5	1,40	21,4±0,2	0,93
	Aceton	0,414±0,001	0,24	10,31±0,05	0,48	38,6±0,1	0,26	26,3±0,7	2,66
	80% Metanol	0,253±0,000	0,00	7,16±0,08	1,12	30,3±0,1	0,33	17,8±0,2	1,12
	Metanol	0,255±0,003	1,17	6,8±0,1	1,47	28,32±0,05	0,18	16,4±0,1	0,61
M1	96% Etanol	0,251±0,002	0,80	6,35±0,07	1,10	26,3±0,4	1,52	15,2±0,2	1,32
	60% Etanol	0,243±0,007	2,88	5,97±0,05	0,84	26,7±0,5	1,87	14,6±0,1	0,68
	Voda	0,215±0,001	0,46	5,03±0,03	0,60	22,7±0,1	0,44	12,57±0,06	0,48
	Aceton	0,2651±0,0005	0,19	6,2±0,1	1,61	27,4±0,3	1,09	15,48±0,04	0,26
	80% Metanol	0,2494±0,0005	0,20	6,1±0,1	1,64	34,5±0,1	0,29	19,2±0,2	1,04
	Metanol	0,234±0,002	0,86	5,82±0,03	0,52	32,1±0,5	1,56	18,3±0,1	0,55
M2	96% Etanol	0,212±0,007	3,30	5,5±0,1	1,82	28,15±0,08	0,28	16,5±0,3	1,82
	60% Etanol	0,204±0,001	0,49	5,1±0,1	1,96	25,7±0,3	1,17	15,2±0,1	0,66
	Voda	0,182±0,002	1,10	4,73±0,05	1,06	23,5±0,5	2,13	13,34±0,05	0,37
	Aceton	0,217±0,005	2,30	5,41±0,03	0,55	27,8±0,7	2,52	16,7±0,3	1,80
	80% Metanol	0,2610±0,0006	0,23	6,25±0,1	1,60	27,0±0,2	0,74	16,1±0,1	0,62
	Metanol	0,2559±0,0007	0,27	6,03±0,2	3,32	25,7±0,1	0,39	15,1±0,1	0,66
M3	96% Etanol	0,2499±0,0006	0,24	5,75±0,05	0,87	22,5±0,3	1,33	13,82±0,05	0,36
	60% Etanol	0,258±0,002	0,77	5,17±0,07	1,35	23,0±0,2	0,87	12,6±0,3	2,38

	Voda	0,223±0,001	0,45	4,05±0,02	0,49	20,6±0,3	1,46	11,7±0,1	0,85
	Aceton	0,252±0,003	1,19	5,48±0,03	0,55	24,58±0,07	0,28	13,5±0,1	0,74
M4	80% Metanol	0,3220±0,0006	0,19	7,2±0,1	1,39	31,2±0,1	0,32	18,4±0,1	0,54
	Metanol	0,253±0,007	2,77	6,42±0,05	0,78	28,45±0,08	0,28	17,4±0,3	1,72
	96% Etanol	0,262±0,001	0,38	6,34±0,01	0,16	26,7±0,1	0,37	16,3±0,6	3,68
	60% Etanol	0,237±0,004	1,68	5,9±0,1	1,69	25,1±0,3	1,20	14,8±0,3	2,03
	Voda	0,228±0,002	0,88	5,34±0,05	0,94	22,5±0,1	0,44	12,46±0,07	0,56
	Aceton	0,276±0,001	0,36	6,10±0,03	0,49	27,47±0,07	0,25	14,35±0,05	0,35

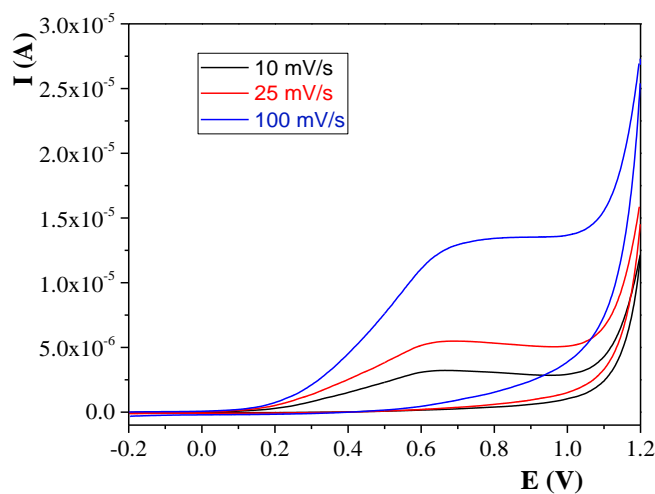
5.3. Optimizacija operativnih uslova za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ciklične voltametrije

5.3.1. Uticaj brzine skeniranja

U cilju određivanja optimalnih uslova za analizu ekstrakata jagodastog voća primenom ciklične voltametrije (CV), varirane su pH vrednost ekstrakata i brzina skeniranja. Pripremljene su tri serije uzoraka, čije su pH vrednosti podešene na pH=2, pH=4,5 i pH=7, dok su primenjene brzine skeniranja iznosile 10 mV/s, 25 mV/s i 100 mV/s. Uticaj brzine skeniranja na intenzitet struje predstavljen je na slikama 5.16. i 5.17.



Slika 5.16. Uticaj brzine skeniranja na intenzitet struje (uzorak ekstrakta maline)

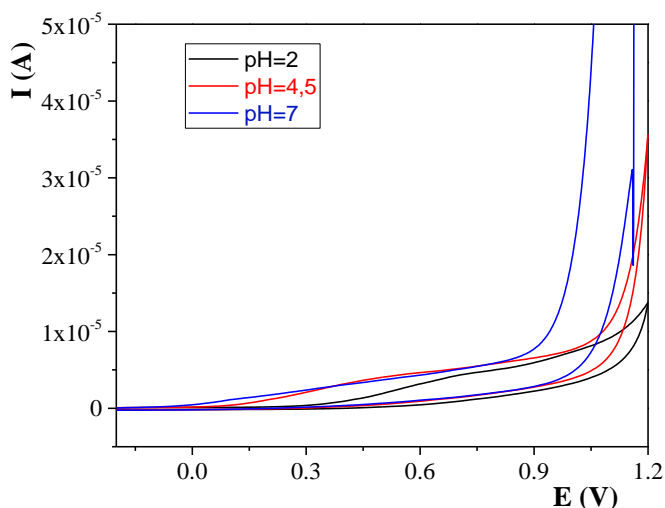


Slika 5.17. Uticaj brzine skeniranja na intenzitet struje (uzorak ekstrakta borovnice)

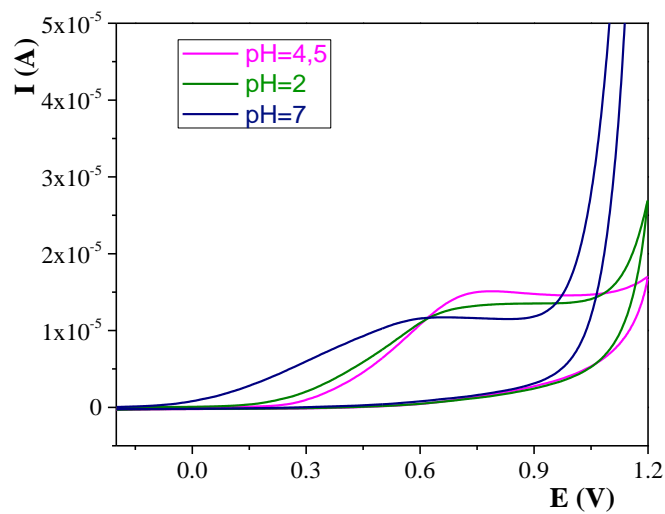
Na osnovu dobijenih voltamograma, može se videti da, ukoliko se primenjuje mala brzina skeniranja, onda se praktično ne javlja pik na voltamogramu zbog dovoljnog vremena za relaksaciju dvostrukog električnog sloja na radnoj elektrodi, pa se u krajnjem slučaju može govoriti o stacionarnim uslovima. Sa druge strane, veće brzine skeniranja rezultuju pojavom anodne struje većeg intenziteta.

5.3.2. Uticaj pH vrednosti

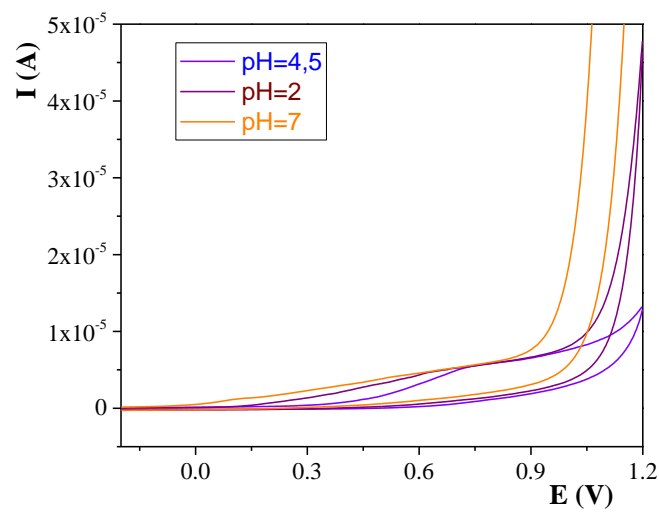
Na slikama 5.18.-5.21. prikazan je uticaj pH vrednosti na intenzitet struje, na reprezentativnim cikličnim voltamogramima po jednog uzorka od svake vrste analiziranog jagodastog voća.



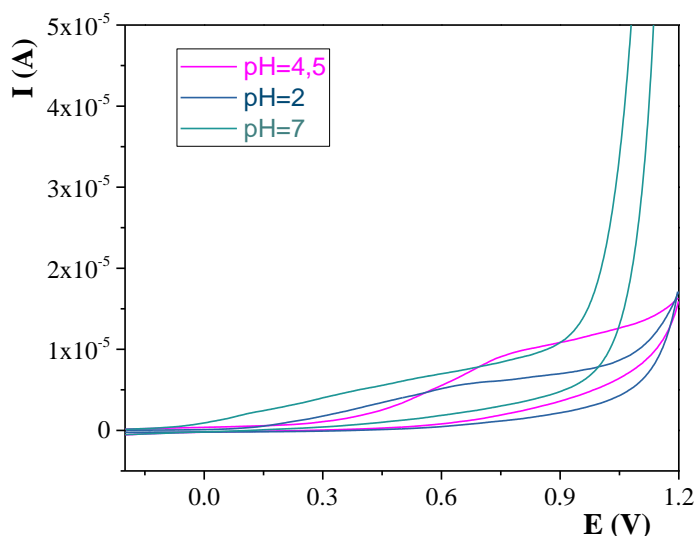
Slika 5.18. Uticaj različitih pH vrednosti na intenzitet struje (brzina skeniranja 100 mV/s, uzorak maline)



Slika 5.19. Uticaj različitih pH vrednosti na intenzitet struje (brzina skeniranja 100 mV/s, uzorak borovnice)



Slika 5.20. Uticaj različitih pH vrednosti na intenzitet struje (brzina skeniranja 100 mV/s, uzorak jagode)



Slika 5.21. Uticaj različitih pH vrednosti na intenzitet struje (brzina skeniranja 100 mV/s, uzorak kupine)

Na osnovu prikazanih voltamograma, primetno je da se izraženi anodni pikovi javljaju pri analizi uzoraka u kiseljoj sredini, pri pH=2 i pri pH=4,5, dok pri pH=7 nema izraženih pikova. Intenzitet anodne struje pri pH=4,5 je nešto većeg intenziteta od intenziteta anodne struje pri pH=2, pa je zato za dalji rad pH vrednost svih uzoraka podešana na 4,5, a brzina skeniranja podešana na 100 mV/s.

5.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti jagodastog voća primenom ciklične voltametrije

Pre analize ekstrakata jagodastog voća, prvo su zabeleženi ciklični voltamogrami standarda, čiji su oksidacioni potencijali dati su u tabeli 5.14.

Tabela 5.14. Oksidacioni potencijali nekih fenolnih jedinjenja ($c=1 \text{ mmol/dm}^3$; acetatni pufer, pH=4,5; brzina skeniranja 100 mV/s)

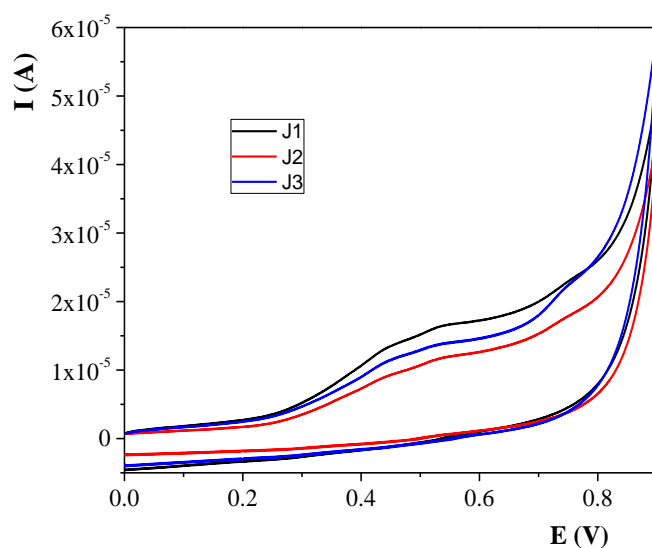
Jedinjenje	E_{pa} (V)	E_{ca} (V)
Kumarna kiselina	0,759	-
Ferulna kiselina	0,604	0,032
Kafena kiselina	0,344	0,128

Kvercetin	0,320; 0,537	0,273
Rutin	0,351; 0,549	-
Kemferol	0,548	-
Kvercetin-3- <i>O</i> - β -glukozid	0,350	0,318
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,428; 0,543	-
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,529; 0,734	-

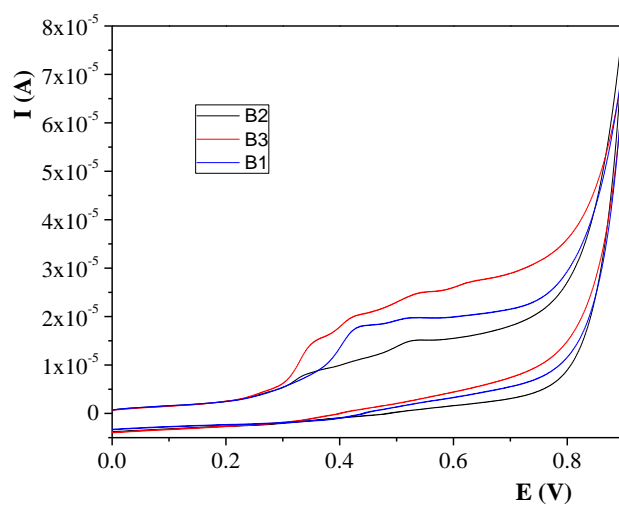
Ciklični voltamogrami analiziranog jagodastog voća snimljeni su u opsegu potencijala 0–800 mV kako bi se obuhvatile sve grupe antioksidativnih jedinjenja i predstavljeni su na slikama 5.22-5.25. Prvi anodni pik na vrednostima potencijala između 0,310 V i 0,350 V u cikličnim voltamogramima uzoraka kupine i maline posledica je oksidacije flavonola (kvercetina i njegovog glukozida) i kafene kiseline. Kao što se može videti iz tabele 5.14, ciklični voltamogrami kvercetina i kvercetin-3-*O*- β -glukozida pokazali su prvi reverzibilni oksidacioni pik pri $E_{p_a}=0,320$ V i $E_{p_a}=0,350$ V, što odgovara oksidaciji 3', 4'-dihidroksidnog supstituenta na B-prstenu. Drugi oksidacioni pik na 0,537 V kvercetina verovatno je nastao stvaranjem intermedijarnog radikala nastalog tokom procesa oksidacije. Kvercetin i kvercetin-3-*O*- β -glukozid pokazuju skoro povratne korake oksidacije. Redukcioni pik od 3', 4'-dihinona koji nastaje tokom procesa oksidacije kvercetina ili kvercetin-3-*O*- β -glukozida pojavio se pri $E_{p_c}=0,273$ V, odnosno $E_{p_c}=0,318$ V.

Kafena kiselina takođe prolazi kroz ireverzibilnu oksidaciju. Anodna oksidacija kafene kiseline pokazuje nepovratne anodne ($E_{p_a}=0,344$ V) i katodne ($E_{p_c}=0,128$ V) talase. Nekoliko autora je proučavalo elektrohemijski mehanizam oksidacije kafene kiseline (*Hotta i sar.*, 2002; *Trabelsi i sar.*, 2004). Opšte je prihvaćeno da oksidacija kafene kiseline protiče preko semihinona do *o*-hinona. Kvercetin, kvercetin-3-*O*- β -glukozid i kafena kiselina sa dve hidroksilne grupe u *orto* položajima, pokazali su različite katodne pikove (tabela 5.14). Dakle, elektrohemijska oksidacija ovih jedinjenja je reverzibilna na pH vrednosti od 4,5. Kvercetin može donirati elektron brže od bilo kog drugog jedinjenja zbog najnižeg anodnog napona. Drugi, treći i četvrti anodni pik na potencijalima između 0,426 V i 0,444 V, 0,524 V i 0,540 V, odnosno 0,638 V i 0,756 V, mogu se pripisati antocijanima i hidroksicimetnim kiselinama (ferulnoj i kumarnoj kiselini). Kao što se može videti iz tabele 5.14, ciklični voltamogram malvidin-3-*O*-glukozida pokazao je dva pika pri 0,428 V i 0,543 V. Prvi pik se pripisuje oksidaciji -OH grupe B-prstena, a drugi pik može biti posledica oksidacije 5,7-dihidroksilne grupe A-prstena. Ovo je u skladu sa podacima iz literature o ekstraktima

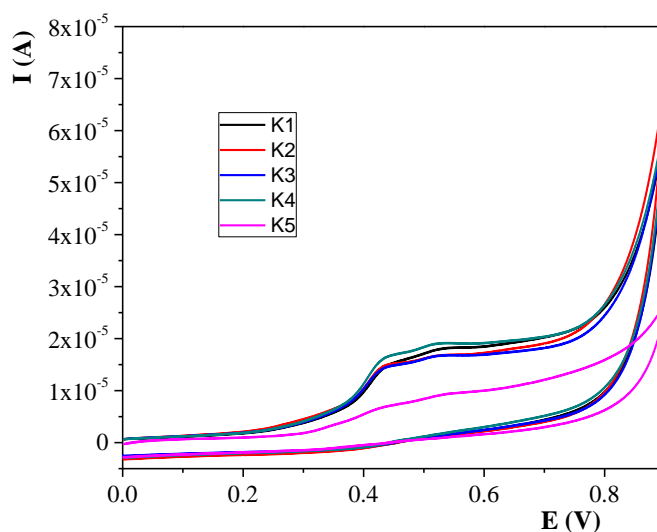
maline koje su dali *Aguirre i saradnici* (2010). Cijanidin-3-*O*-glukozid pokazuje dva anodna pika pri $E_{pa}=0,529$ V i $E_{pa}=0,734$ V. Ova dva pika odgovaraju oksidacijama 3', 4'-OH grupa u B-prstenu. Ferulna i kumarna kiselina pokazale su dva pika pri 0,604 V i 0,759 V. Anodni pik se pojavljuje u ireverzibilnom procesu, dok se se u obrnutom skeniranju ne primećuje struja. Uzimajući u obzir kemferol, -OH grupa prisutna na B-prstenu odgovorna je za anodni pik na 0,548 V. Svi ovi rezultati su u skladu sa pionirskim radom gde je proučavan odnos strukture i aktivnosti prirodnih antioksidanata (*Rice-Evans i sar.*, 1996).



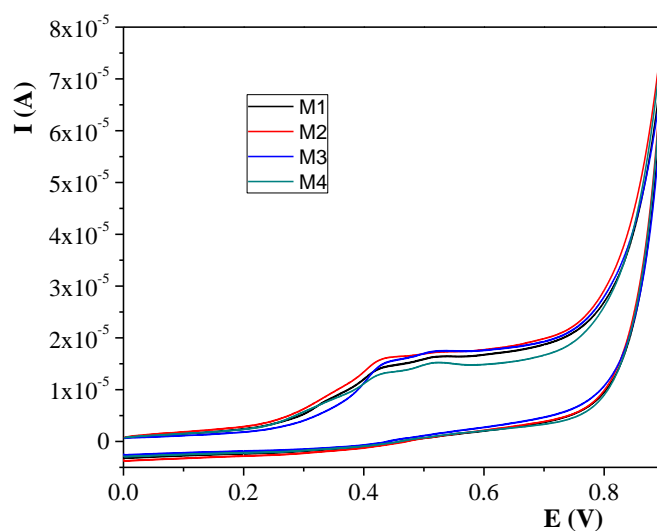
Slika 5.22. Ciklični voltamogrami ispitivanih uzoraka jagoda (acetatni pufer, pH=4,5; brzina skeniranja 100 mV/s)



Slika 5.23. Ciklični voltamogrami ispitivanih uzoraka borovnica (acetatni pufer, pH=4,5; brzina skeniranja 100 mV/s)



Slika 5.24. Ciklični voltamogrami ispitivanih uzoraka kupina (acetatni pufer, pH=4,5; brzina skeniranja 100 mV/s)



Slika 5.25. Ciklični voltamogrami ispitivanih uzoraka malina (acetatni pufer, pH=4,5; brzina skeniranja 100 mV/s)

Izraženi anodni maksimum struje primećen između 0,524 V i 0,540 V u svim analiziranim uzorcima jagodastog voća može se pripisati antocijanima, koji najviše doprinose antioksidativnom kapacitetu ispitivanog jagodastog voća.

Površina ispod anodnog vrha odgovara naelektrisanju korišćenom u eksperimentu do potencijala od 500 mV (Q_{500}) i koristi se kao mera sadržaja antioksidanata u analiziranom uzorku (TEAC - eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Svi maksimalni potencijali

(E_p) i maksimalne struje (I_p) određene u okviru cikličnog voltamograma kao i Q_{500} i TEAC vrednosti analiziranih uzoraka jagodastog voća su prikazani u tabeli 5.15. Iz rezultata prikazanih u tabeli se jasno vidi da uzorci borovnice imaju najveći TEAC, a potom slede uzorci kupine, maline i jagode, što je i u skladu sa visokim sadržajem antocijana i flavonoida koji borovnica ima.

Tabela 5.15. Vrednosti potencijala i struje anodnog pika dobijene sa cikličnih voltamograma uzoraka jagoda, kupina, borovnica i malina

Uzorak	E_{pa} (V)				I_{pa} (μ A)				Q_{500} (μ C)	TEAC μ mol Trolox g^{-1}
	1	2	3	4	1	2	3	4		
J1	-	0,439	0,545	0,756	-	13,0	16,6	23,0	2,70	4,596
J2	-	0,444	0,539	0,742	-	9,1	11,9	17,5	2,40	4,296
J3	-	0,442	0,540	0,750	-	11,2	13,8	22,4	2,10	4,079
K1	-	0,440	0,540	-	-	15,7	18,3	-	2,36	4,953
K2	-	0,437	0,539	0,650	-	15,7	16,8	17,9	2,36	4,998
K3	-	0,435	0,534	-	-	14,7	16,8	-	2,20	4,579
K4	-	0,438	0,535	-	-	16,3	19,1	-	3,36	5,702
K5	0,350	0,430	0,534	-	13,1	19,5	18,2	-	5,56	10,58
B1	-	0,433	0,528	-	-	18,3	19,6	-	3,45	6,041
B2	0,338	0,430	0,530	-	7,8	11,2	15,1	-	3,83	6,590
B3	0,352	0,428	0,540	0,638	14,5	20,1	2,47	27,2	5,70	9,830
M1	0,340	0,432	0,528	-	7,7	14,4	1,63	-	3,60	6,116
M2	0,337	0,434	0,540	-	8,6	16,2	1,73	-	4,55	7,100
M3	-	0,432	0,526	-	-	14,7	1,74	-	3,05	5,043
M4	0,310	0,426	0,524	-	6,3	12,9	1,51	-	3,88	6,223

ACI indeksi, zajedno sa rezultatima merenja svih pet antioksidativnih kapaciteta (iskazanih u relativnim procentima) prikazani su u tabeli 5.16. Najveći ACI indeks imaju uzorci borovnice, a zatim kupine, maline i jagode što je i u skladu sa njihovim ukupnim sadržajem fenola, flavonoida i antocijanina kao i sa antioksidativnim kapacitetom. Dobijene vrednosti za ACI omogućavaju lako upoređivanje antioksidativnog kapaciteta među

testiranim uzorcima.

Tabela 5.16. Antioksidativni kompozitni indeksi uzoraka jagodastog voća (%)

Uzorak	DPPH _{index}	ABTS _{index}	FRAP _{index}	RP _{index}	Q ₅₀₀ _{index}	ACI
J1	43,5	43,6	46,8	46,5	43,4	44,8
J2	40,5	40,5	43,7	43,4	40,6	41,7
J3	38,5	38,6	40,3	39,9	38,6	39,2
K1	59,5	47,4	43,0	61,7	46,8	51,7
K2	58,0	46,5	63,1	63,0	47,2	55,6
K3	59,4	46,5	53,0	70,9	43,3	54,6
K4	60,9	46,6	75,1	72,5	53,9	61,8
K5	100	100	100	100	100	100
B1	57,3	57,3	60,8	59,8	57,1	58,5
B2	62,4	62,4	67,1	65,5	62,3	63,9
B3	93,1	93,2	93,2	93,0	92,9	93,1
M1	54,7	46,3	57,6	56,3	57,8	54,5
M2	46,6	45,7	65,6	60,8	67,1	57,2
M3	47,7	47,8	51,3	50,9	47,7	49,1
M4	55,0	59,0	59,3	58,2	58,8	58,1

Generalno je poznato da su ukupni polifenoli u visokoj korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću (*Manach i sar.*, 2005). Kao što se može videti na osnovu tabele 5.17., gde su prikazani Pirsonovi koeficijenti korelacije, pozitivna korelacija postoji između CV antioksidativnog kapaciteta i ukupnih polifenola (UPF) ($r^2=0,8963$), CV antioksidativnog kapaciteta i ukupnih flavonoida (UF) ($r^2=0,9133$), CV antioksidativnog kapaciteta i ukupnih antocijana (UA) ($r^2=0,8463$) (slika 5.26; tabela 5.17). Pored toga, pronađene su i visoke pozitivne korelacije između antioksidativnih kapaciteta dobijenih primenom CV sa onima dobijenim primenom FRAP ($r^2=0,9290$), RP ($r^2=0,0,8617$), DPPH ($r^2 = 0,8853$) i ABTS ($r^2 = 0,9382$) (slika 5.26; tabela 5.17), ukazujući da polifenolni antioksidanti sa OH grupama na B-prstenu najviše doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu. To je u skladu sa istraživanjem *Heinonen-a* (2007) koji ukazuje da je doprinos antocijana antioksidativnom dejstvu jagodastog voća najznačajniji. Ukupna polifenolna jedinjenja dobro koreliraju sa antioksidativnim testovima, a najviši stepen pozitivne

korelacije primećen je između UPF i FRAP-a ($r^2=0,8847$), što se može pripisati mehanizmu zasnovanom na prenosu elektrona na kome se zasniva primenjeni test. Takođe, *Firuzi i saradnici* (2005) otkrili su da *o*-dihidroksi struktura u B-prstenu, kao i 3-hidroksi grupa i 2,3-dvostruka veza na C prstenu najviše doprinose FRAP antioksidativnoj aktivnosti. Takođe, visok stepen pozitivne korelacije se zapaža između ABTS i DPPH testa ($r^2=0,9415$), kao i između FRAP i RP testa ($r^2=0,9178$), što je posledica sličnih mehanizama antioksidativnog dejstva.

Tabela 5.17. Matrica Pirsonovih koeficijenata korelacije

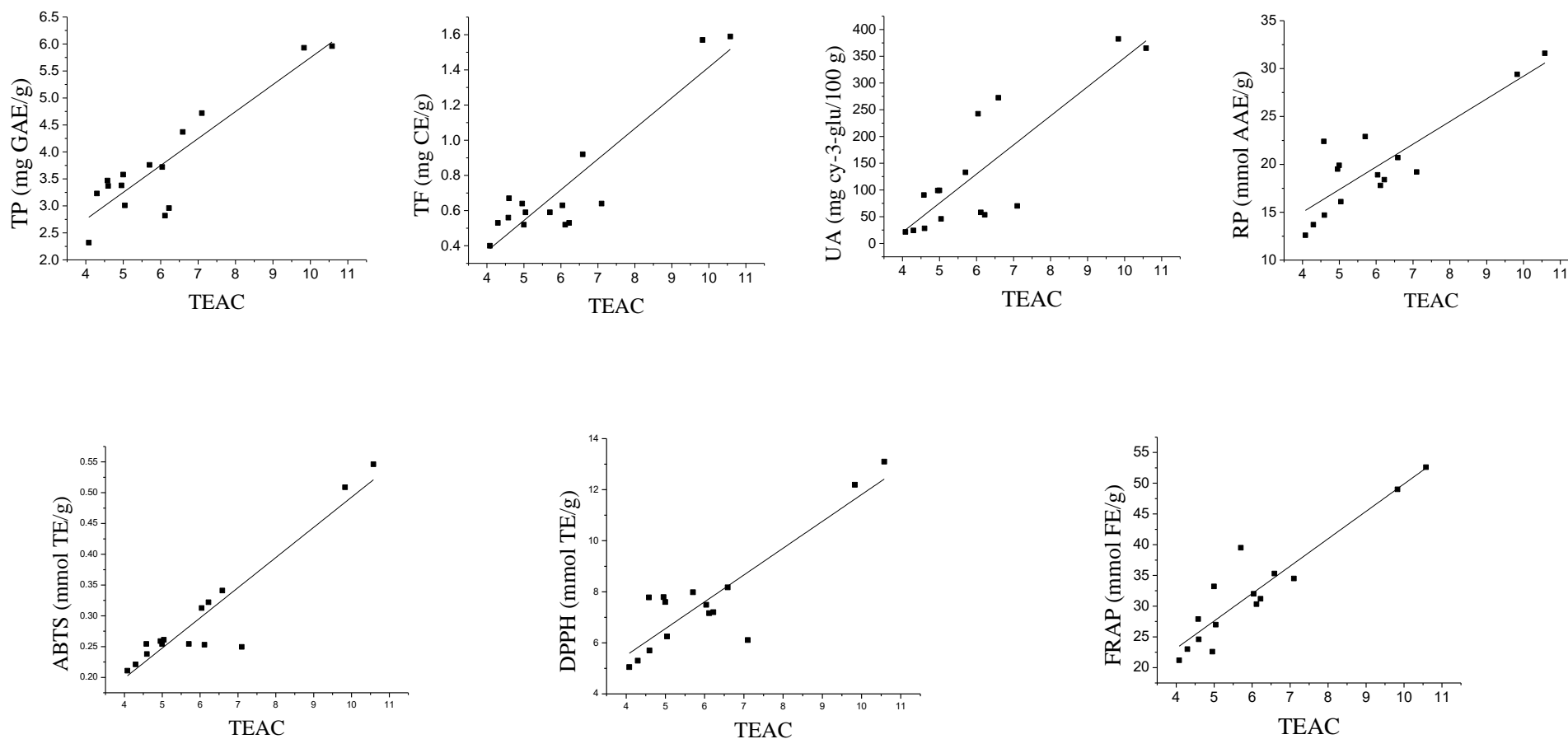
	DPPH	ABTS	FRAP	RP	UPF	UF	UA	CV
DPPH	1,0000	0,9415	0,8956	0,9671	0,8404	0,9120	0,8981	0,8853
ABTS		1,0000	0,8777	0,8706	0,8498	0,9565	0,9048	0,9382
FRAP			1,0000	0,9178	0,8847	0,8502	0,8507	0,9290
RP				1,0000	0,8687	0,8526	0,8538	0,8617
UPF					1,0000	0,9099	0,8591	0,8963
UF						1,0000	0,8904	0,9133
UA							1,0000	0,8463
CV								1,0000

Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa radom *Reyes-Carmona i saradnika* (2005), gde je kod uzoraka kupina pokazano da FRAP izuzetno korelira sa ukupnim fenolima ($r=0,98$) i sa antocijanima ($r=0,93$). U istom istraživanju primećena je visoka pozitivna korelacija između ukupnih polifenola i antocijana ($r=0,92$), što je logično jer su antocijani najvažnija fenolna jedinjenja prisutna u kupini (*Macheix i sar.*, 1990). U radu *Bobinaite i saradnika* (2012), visoka pozitivna korelacija ($r=0,90$) između ukupnih polifenola i DPPH radikal-hvatačke aktivnosti u uzorcima maline je zabeležena. *Cao i Prior* (1998) su ukazali da su fitohemikalije odgovorne za antioksidativni kapacitet u jagodastom voću antocijani i fenolne kiseline.

Slično sadržaju polifenola, flavonoida i antocijana, antioksidativna aktivnost uzoraka jagodastog voća pokazala je značajne razlike u zavisnosti od sorte. Prema podacima iz literature (*Anttonen i Karjalainen*, 2005; *Anttonen i sar.*, 2006; *Milošević i sar.*, 2012), sorta i različita okruženja uzgoja, kao i poljoprivredni i klimatski uslovi utiču na polifenolni status u biljkama.

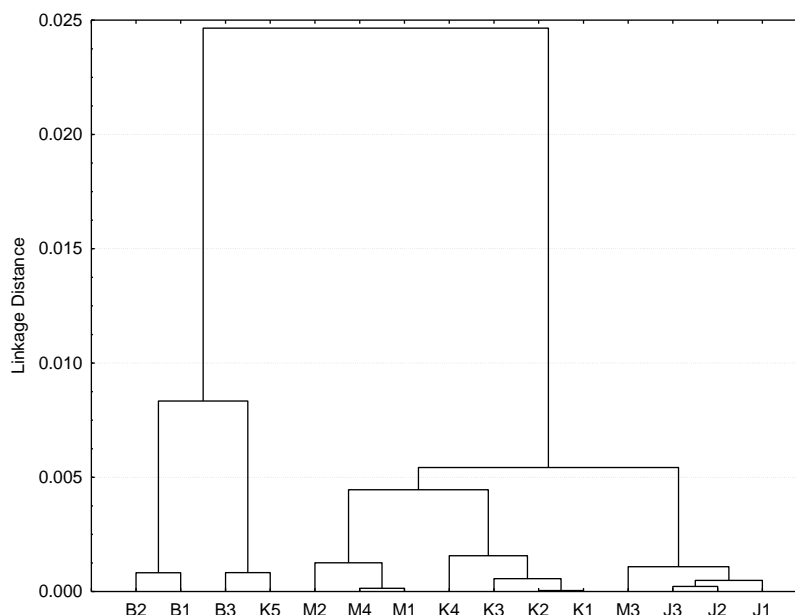
Rezultati dobijeni elektrohemijском metodom u ovom radu ukazuju da je ciklična voltometrija dobra tehnika za određivanje antioksidativnih svojstava uzoraka jagodastog

voća. Ciklična voltometrija se zasniva samo na hemijskim/fizičkim svojstvima molekula i ne zahteva upotrebu reaktivnih vrsta. Sposobnost metoda za brzu procenu antioksidativne aktivnosti jagodastog voća može da bude korisna za prehrambenu industriju. Visok stepen pozitivne korelacije sa spektrofotometrijskim merenjem antioksidativnog kapaciteta ukazuje na to da su rezultati dobijeni primenom ciklične voltometrije pouzdani i uporedivi sa rezultatima drugih spektrofotometrijskih metoda (FRAP, RP, DPPH, ABTS). Ovaj zaključak jasno ukazuje da je ciklična voltometrija pogodna metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta na osnovu elektrohemijskih svojstava jedinjenja koja se ispituju.



Slika 5.26. Korelacija rezultata određivanja ukupnih polifenolnih jedinjenja (UPF), ukupnih flavonoida (UF), ukupnih antocijana (UA) i antioksidativnih spektrofotometrijskih testova (RP, ABTS, DPPH i FRAP) sa rezultatima dobijenim primenom ciklične voltametrije (TEAC)

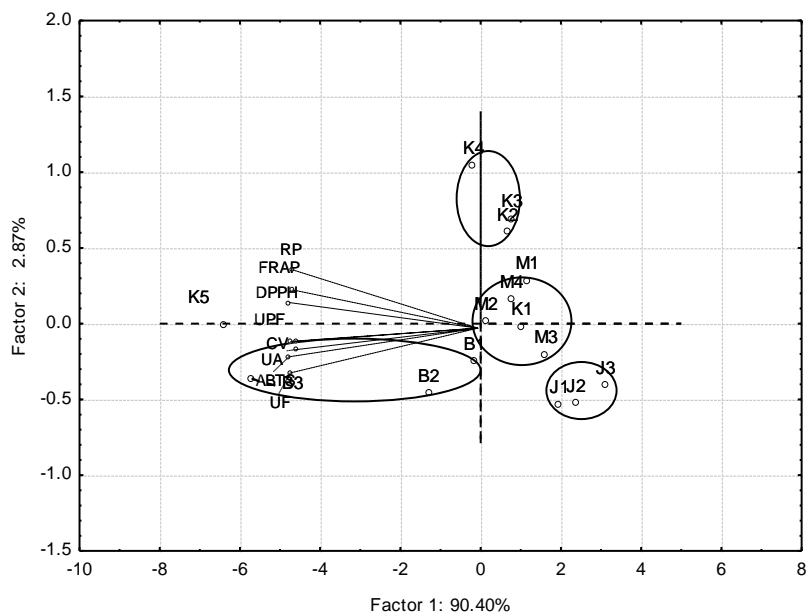
Primenom klaster analize (Ward-ova metoda), ispitana je mogućnost grupisanja uzoraka jagoda, borovnica, kupina i malina na osnovu antioksidativne aktivnosti, ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana. Rezultati grupisanja su predstavljeni na dendrogramu (slika 5.27), gde se uočavaju dva klastera. Prvi klaster se sastoji od dva potklastera: u jednom su uzorci borovnice B1 i B2, a u drugom uzorak borovnice B3 i uzorak kupine K5. Uzorci B3 (uzorak divlje borovnice) i K5 (uzorak divlje kupine) se izdvajaju od ostalih po najvišem sadržaju ukupnih polifenolnih jedinjenja i ukupnih antocijana. U drugom klasteru se uočavaju dva potklastera: u jednom su grupisani uzorci jagode i jedan uzorak maline, M3. U drugom potklasteru su se posebno grupisali uzorci kupina K1, K2, K3 i K4, i posebno uzorci malina M1, M2 i M4. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je vrsta voća dominantan faktor na osnovu koga se uzorci grupišu.



Slika 5.27. Dendrogram grupisanja ispitivanih uzoraka na osnovu antioksidativne aktivnosti, ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana

Primenom PCA analize na dobijene rezultate ispitivanja izvršeno je grupisanje uzoraka, predstavljeno na slici 5.28. Prve dve komponente objašnjavaju 93,27% varijabilnosti. Sa visokim pozitivnim opterećenjem prvog faktora PC1 izdvojili su se uzorci jagoda J1 (1,97), J2 (2,38) i J3 (3,12). Kod uzoraka jagoda je zabeležen najmanji sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja među ispitivanim uzorcima. Uzorci K5 i B3 pokazuju visoko negativno opterećenje prvog faktora ($PC1=-6,39$ i $PC1=-5,70$). Ovi uzorci se

izdvajaju po najvećoj ABTS i DPPH radikal-hvatačkoj aktivnosti. Uzorci kupina i malina pokazuju malo pozitivno opterećenje PC1 i PC2.



Slika 5.28. PC1-PC2 dijagram raspodele uzoraka na osnovu antioksidativne aktivnosti, ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana

5.4. HPLC analiza pojedinačnih polifenolnih jedinjenja jagodastog voća

Primenom HPLC metode, opisane u odeljku 4.5.1., analizirani su ekstrakti uzoraka jagodastog voća, dobijeni korišćenjem zakišelenog 80% metanola, metanola, 96% etanola, 60% etanola, vode i acetona, kao ekstragenasa. Identifikacija pojedinačnih jedinjenja izvršena je poređenjem njihovih UV/Vis spektara i retencionih vremena sa standardima, kao i poređenjem sa literaturno dostupnim podacima.

Od fenolnih kiselina identifikovane su: kafena, ferulna, p-kumarna, i elaginska kiselina. Od flavonola identifikovani su: kvercetin, kvercetin-glukozid, kvercetin-galaktozid, kemferol, kemferol-glukozid i rutin. Od antocijana, u jagodama su identifikovani: pelargonidin-3-*O*-glukozid, pelargonidin-3-*O*-rutinozid, cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-malonilglukozid. U malinama su identifikovani: cijanidin-3-*O*-soforozid, pelargonidin-3-*O*-soforozid, cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-rutinozid. U

kupinama su identifikovani cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid i cijanidin-3-*O*-malonilglukozid. U borovnicama su identifikovani: delfinidin-3-*O*-galaktozid, delfinidin-3-*O*-glukozid, delfinidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-arabinozid, petunidin-3-*O*-galaktozid, peonidin-3-*O*-galaktozid i malvidin-3-*O*-galaktozid.

Kvantifikacija fenolnih kiselina je izvršena na osnovu kalibracionih pravih za standarde kafene, ferulne i *p*-kumarne kiseline u intervalu koncentracija od 0,1 mg/ml do 1 mg/ml, a za elaginsku kiselinu u intervalu koncentracija od 0,2 mg/ml do 1 mg/ml.

Kvantifikacija kvercetina, kemferola i rutina je izvršena na osnovu kalibracionih pravih za standarde kvercetina, kemferola i rutina u intervalu koncentracija od 0,1 mg/ml do 1 mg/ml. Kvercetin-glukozid i kvercetin-galaktozid izračunati su kao ekvivalenti kvercetina, dok je kemferol-glukozid izračunat kao ekvivalent kemferola.

Kvantifikacija cijanidin-3-*O*-glukozida, delfinidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-galaktozida je izvršena na osnovu kalibracionih pravih za standarde cijanidin-3-*O*-glukozida, delfinidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-galaktozida u intervalu koncentracija od 0,1 mg/ml do 1 mg/ml. Cijanidin-3-*O*-rutinozid, cijanidin-3-*O*-malonilglukozid i cijanidin-3-*O*-galaktozid izračunati su kao ekvivalenti cijanidin-3-*O*-glukozida. Delfinidin-3-*O*-galaktozid i delfinidin-3-*O*-arabinozid izračunati su kao ekvivalenti delfinidin-3-*O*-glukozida. Petunidin-3-*O*-arabinozid, petunidin-3-*O*-galaktozid i peonidin-3-*O*-galaktozid izračunati su na osnovu kalibracione prave za cijanidin-3-*O*-glukozid (Nyman i Kumpulainen, 2001). Pelargonidin-3-*O*-glukozid, pelargonidin-3-*O*-rutinozid i pelargonidin-3-*O*-soforozid izračunati su na osnovu kalibracione prave za standard pelargonidin-3-*O*-glukozida u intervalu koncentracija od 0,1 mg/ml do 1 mg/ml.

Sadržaj je dat kao srednja vrednost triju merenja ($c_{sr} \pm SD$, $n = 3$) i izražen je u miligramima po kilogramu uzorka (mg/kg). Rezultati određivanja sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u kiselometanolnim ekstraktima uzoraka jagoda, kupina, borovnica i malina, dati su u tabelama 5.18.-5.23. Rezultati određivanja sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima prikazani su u Prilogu (tabele 1-12).

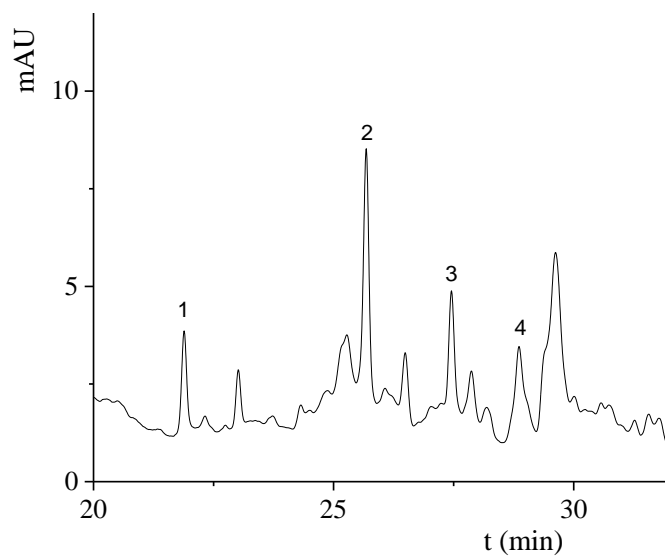
Rezultati određivanja sadržaja kafene, *p*-kumarne, ferulne i elaginske kiseline u kiselometanolnim ekstraktima dati su u tabeli 5.18., a grafički prikaz je dat na slici 5.33. Hromatogrami po jednog uzorka jagode, kupine, borovnice i maline, snimljeni na 320 nm, predstavljeni su na slikama 5.29-5.32. Sadržaj kafene kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 0,741-1,127 mg/kg, u uzorcima borovnica je u opsegu 9,12-14,37 mg/kg i u jednom uzorku

kupine (K5) iznosi 0,981 mg/kg. U uzorcima maline i uzorcima kupine K1, K2, K3 i K4, kafena kiselina nije detektovana. Dobijeni rezultati koji se odnose na sadržaj kafene kiseline u borovnicama i kupinama, niži su od onih u radu *Jakobek i saradnika* (2007), gde je sadržaj kafene kiseline u borovnicama iznosio 27,29 mg/kg, a u kupinama 5,65 mg/kg. U pomenutom radu, kafena kiselina nije detektovana u uzorcima jagode (*Jakobek i sar.*, 2007). Sa druge strane, u uzorcima jagoda iz Finske, sadržaj kafene kiseline je u opsegu 1,71-4,20 mg/kg (*Mattila i sar.*, 2006), što su nešto viši rezultati u odnosu na naše uzorke jagoda iz Srbije.

Sadržaj *p*-kumarne kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 1,51-3,47 mg/kg, što je niži sadržaj u odnosu na literaturno dostupne podatke za jagodu iz Poljske i Finske, koji iznosi 4-17 mg/kg (*Häkkinen i Törrönen*, 2000) i 29-49 mg/kg (*Mattila i sar.*, 2006). Sadržaj *p*-kumarne kiseline u uzorcima kupina je u opsegu 2,27-4,28 mg/kg, a u uzorcima malina je u opsegu 2,84-6,48 mg/kg, što je u skladu sa podacima koji se odnose na kupine i maline iz Hrvatske, gde je sadržaj *p*-kumarne kiseline 5,94 mg/kg, odnosno 4,24 mg/kg (*Jakobek i sar.*, 2007). U uzorcima borovnica *p*-kumarna kiselina nije detektovana, a isto je zabeleženo i u radu *Häkkinen i Törrönen* (2000).

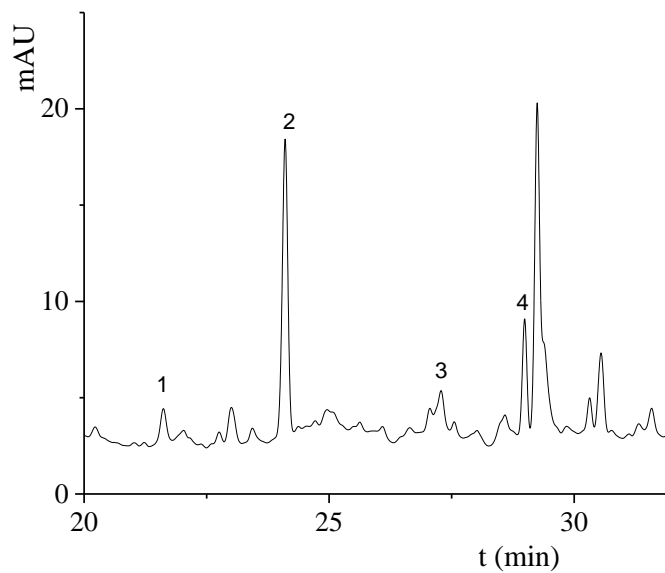
Sadržaj ferulne kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 1,16-1,95 mg/kg, u uzorcima kupina je u opsegu 1,30-2,15 mg/kg i u uzorcima malina je u opsegu 1,45-1,99 mg/kg. Dobijeni rezultati su niži od literaturno dostupnih podataka za sadržaj ferulne kiseline u ovim vrstama voća (*Jakobek i sar.*, 2007; *Mattila i sar.*, 2006). Sadržaj ferulne kiseline u uzorcima borovnica je u opsegu 4,50-26,17 mg/kg, što je u skladu sa podacima za borovnice iz Finske (*Mattila i sar.*, 2006) i Hrvatske (*Jakobek i sar.*, 2007).

Sadržaj elaginske kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 65,07-125,13 mg/kg, u uzorcima kupina je u opsegu 73,68-227,98 mg/kg i u uzorcima malina je u opsegu 105,25-144,06 mg/kg. Dobijeni rezultati su viši od onih u radu *Jakobek i saradnika* (2007) za uzorke jagoda, malina i kupina iz Hrvatske. Takođe, dobijeni rezultati su u saglasnosti ili niži u odnosu na podatke koji se odnose na sadržaj elaginske kiseline u kupinama iz Srbije (18,52-357,01 mg/kg) (*Đurić i sar.*, 2014). Uzrok tome može biti primena kisele hidrolize u trajanju od 2 sata na 85 °C u radu *Đurić i saradnika* (2014). Naime, glavna jedinjenja elagitanina su sanguin H-6 i lambertianin C, koji podležu kiseloj hidrolizi, oslobađaju heksahidroksi-difenoil grupe, koje potom grade elaginsku kiselinu. Zbog toga, kvantifikacija elaginske kiseline zavisi od postupka hidrolize (*Bobinaite i sar.*, 2012). U uzorcima borovnica elaginska kiselina nije detektovana.

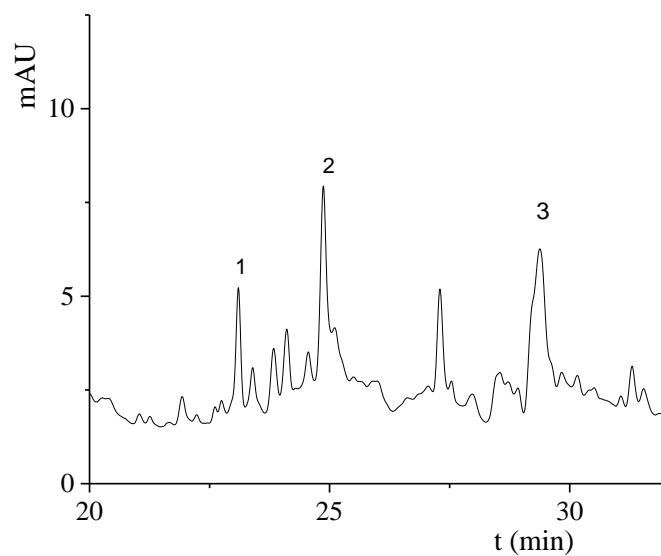


a)

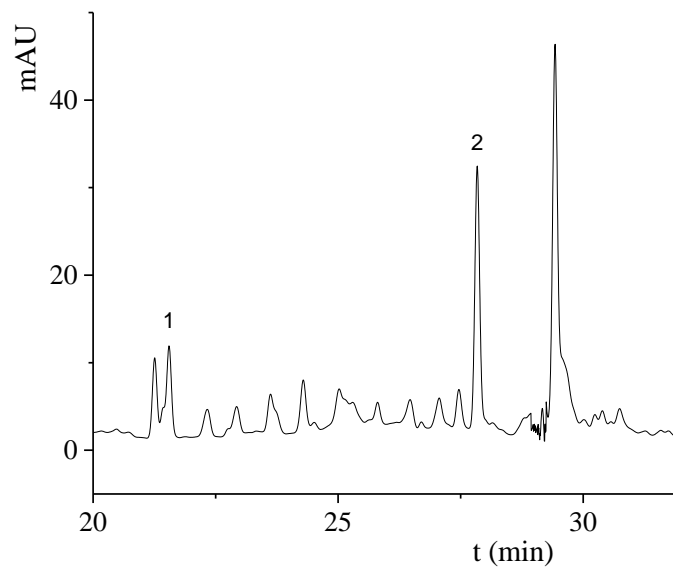
Slika 5.29. HPLC hromatogram uzorka jagode: 1 - kafena kiselina, 2 - *p*-kumarna kiselina, 3 - ferulna kiselina (320 nm) i 4 - elaginska kiselina (280 nm)



Slika 5.30. HPLC hromatogram uzorka kupine: 1 - kafena kiselina, 2 - *p*-kumarna kiselina, 3 - ferulna kiselina (320 nm) i 4 - elaginska kiselina (280 nm)



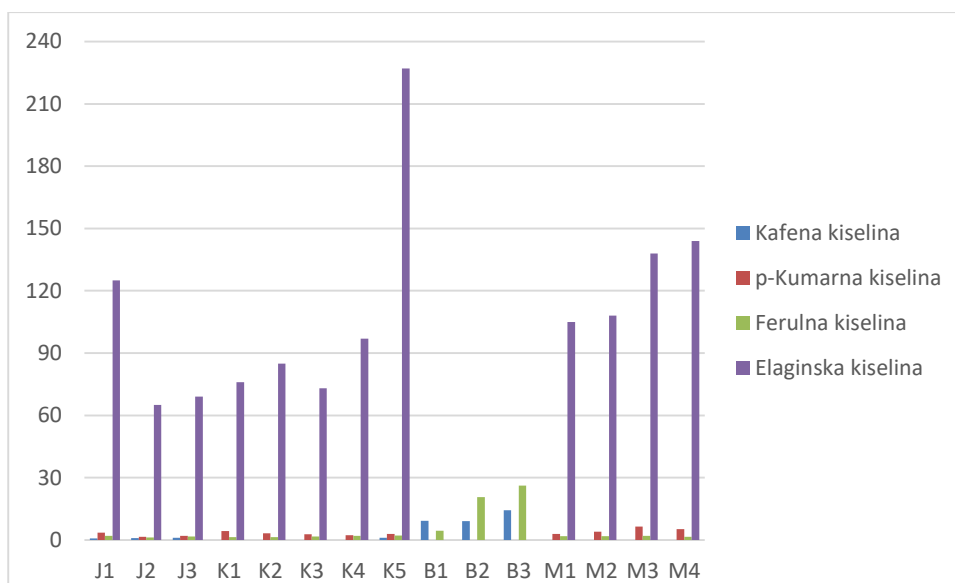
Slika 5.31. HPLC hromatogram uzorka maline: 1- *p*-kumarna kiselina, 2 - ferulna kiselina (320 nm) i 3 - elaginska kiselina (280 nm)



Slika 5.32. HPLC hromatogram uzorka borovnice: 1 - kafena kiselina, 2 - ferulna kiselina (320 nm)

Tabela 5.18. Sadržaj fenolnih kiselina u kiselometanolnim ekstraktima u uzorcima jagoda, kupina, borovnica i malina

Uzorak	Kafena kiselina		<i>p</i> -Kumarna kiselina		Ferulna kiselina		Elaginska kiselina	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
J1	0,741±0,001	0,13	3,47±0,05	1,44	1,95±0,02	1,02	125±3	2,40
J2	0,893±0,003	0,34	1,50±0,03	2,00	1,16±0,01	0,86	65±1	1,54
J3	1,127±0,007	0,62	2,00±0,02	1,00	1,68±0,03	1,78	69±1	1,45
K1	n.d.	-	4,28±0,07	1,63	1,30±0,01	0,77	76±1	1,31
K2	n.d.	-	3,19±0,03	0,94	1,36±0,05	3,68	85±2	2,35
K3	n.d.	-	2,81±0,01	0,35	1,74±0,07	4,02	73±1	1,37
K4	n.d.	-	2,27±0,01	0,44	1,92±0,03	1,56	97±1	1,03
K5	0,981±0,003	0,31	2,83±0,06	2,12	2,15±0,06	2,79	227±5	2,20
B1	9,21±0,05	0,54	n.d.	-	4,50±0,03	0,67	n.d.	-
B2	9,12±0,09	0,99	n.d.	-	20,7±0,3	1,45	n.d.	-
B3	14,37±0,08	0,56	n.d.	-	26,2±0,5	1,91	n.d.	-
M1	n.d.	-	2,84±0,03	1,06	1,84±0,03	1,63	105±5	4,76
M2	n.d.	-	4,05±0,07	1,73	1,80±0,01	0,55	108±6	5,55
M3	n.d.	-	6,48±0,05	0,77	2,00±0,03	1,50	138±4	2,90
M4	n.d.	-	5,23±0,09	1,72	1,45±0,01	0,69	144±3	2,08



Slika 5.33. Pojedinačni sadržaj fenolnih kiselina u uzorcima jagodastog voća u kiselometanolnim ekstraktima

Rezultati određivanja sadržaja kafene, p-kumarne, ferulne i elaginske kiseline u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima jagodastog voća prikazani su u Prilogu (tabele 1-4).

Sadržaj kafene kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 0,708-0,831 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 0,644-1,02 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,50-0,674 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,38-0,671 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 0,364-0,72 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Kafena kiselina je detektovana samo u uzorku kupine K5, a sadržaj kafene kiseline je u opsegu od 9,8 mg/kg u vodenom ekstraktu do 25,8 mg/kg u metanolnom ekstraktu. Sadržaj kafene kiseline u uzorcima borovnica je u opsegu 8,07-11,34 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 7,37-9,06 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 7,98-9,01 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 5,09-6,39 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 5,15-9,01 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Kafena kiselina nije detektovana u uzorcima maline.

Sadržaj p-kumarne kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 1,19-2,40 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,26-1,49 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,79-1,59 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,34-2,67 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,18-2,42 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj p-kumarne kiseline u uzorcima kupina je u opsegu 2,08-4,09 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 2,05-3,35 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 2,17-3,38 mg/kg u 60%

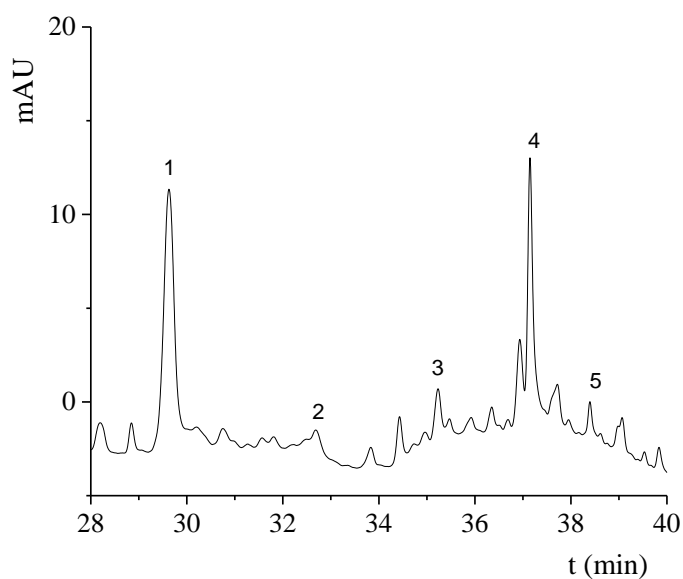
etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,61-2,76 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,34-2,38 mg/kg u acetonskim ekstraktima. *p*-Kumarna kiselina nije detektovana u uzorcima borovnice. Sadržaj *p*-kumarne kiseline u uzorcima malina je u opsegu 2,15-3,63 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,98-3,93 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 2,59-4,59 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,46-2,71 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,21-3,88 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj ferulne kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 1,05-1,21 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 0,837-1,246 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,13-1,25 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,783-1,51 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 0,769-0,993 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ferulne kiseline u uzorcima kupina je u opsegu 1,21-1,86 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 0,67-2,14 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,19-1,32 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,13-1,50 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 0,79-1,28 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ferulne kiseline u uzorcima borovnica je u opsegu 3,13-25,9 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 3,64-22,2 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 4,2-24,5 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 3,00-22,4 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 4,52-24,51 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj ferulne kiseline u uzorcima malina je u opsegu 1,18-1,45 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,29-1,39 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,21-1,35 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,25-1,34 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,09-1,43 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

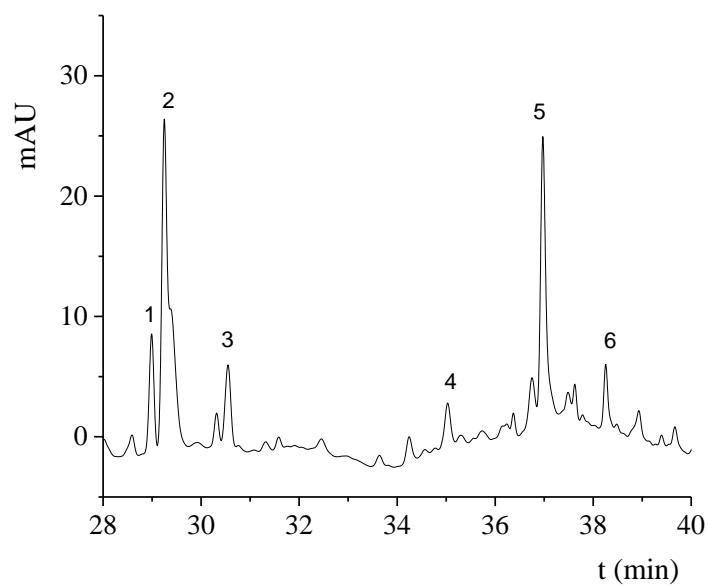
Sadržaj elaginske kiseline u uzorcima jagoda je u opsegu 62-110 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 63-105 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 51-80 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 46-94 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 52-76 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj elaginske kiseline u uzorcima kupina je u opsegu 64-215 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 58-177 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 67-187 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 68-170 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 67-143 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Elaginska kiselina nije detektovana u uzorcima borovnice. Sadržaj elaginske kiseline u uzorcima malina je u opsegu 76-91 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 72-82 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 61-88 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 62-88 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 63-92 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Rezultati određivanja flavonola u kiselometanolnim ekstraktima ispitivanih uzoraka prikazani su u tabeli 5.19. Grafički prikaz dat je na slici 5.38. Hromatogrami po jednog uzorka jagode, kupine, borovnice i maline, snimljeni na 360 nm, predstavljeni su na slikama 5.34-5.37. Identifikovani su i kvantifikovani kvercetin, kvercetin-glukozid, kvercetin-galaktozid, kemferol, kemferol-glukozid i rutin.

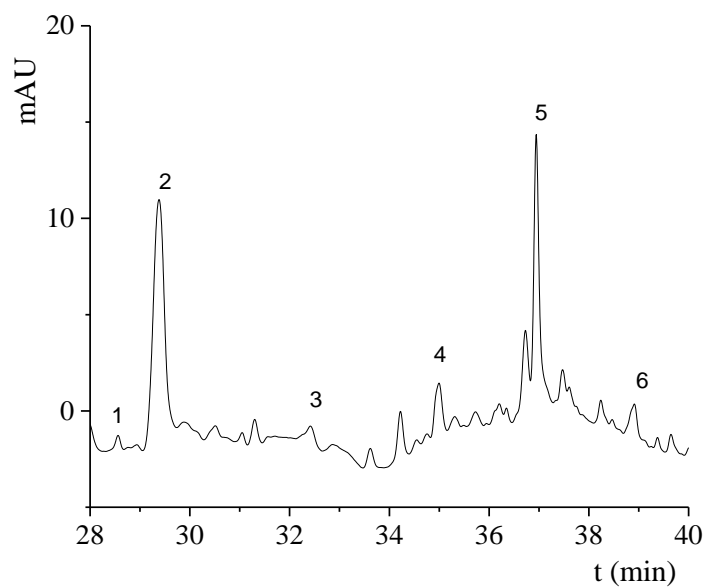
Sadržaj kvercetina u uzorcima jagoda je u opsegu 12,90-21,26 mg/kg, u uzorcima kupina je u opsegu 8,09-11,59 mg/kg, u uzorcima borovnica je u opsegu 13,99-16,47 mg/kg, u uzorcima malina je u opsegu 12,23-20,63 mg/kg. Sadržaj kvercetin-glukozida u uzorcima jagoda je u opsegu 2,48-3,33 mg/kg, u uzorcima kupina je u opsegu 1,55-15,72 mg/kg, u uzorcima borovnica je u opsegu 2,32-2,69 mg/kg, u uzorcima malina je u opsegu 1,98-4,25 mg/kg. Sadržaj kvercetin-galaktozida u uzorcima jagoda je u opsegu 21,9-32,1 mg/kg, u uzorcima kupina je u opsegu 24,3-40,1 mg/kg, u uzorcima borovnica je u opsegu 29,8-38,6 mg/kg, u uzorcima malina je u opsegu 24,7-34,6 mg/kg. Sadržaj kemferola u uzorcima jagoda je u opsegu 1,77-3,01 mg/kg, u uzorcima kupina je u opsegu 1,55-2,74 mg/kg, u uzorcima borovnica je u opsegu 1,58-1,86 mg/kg, u uzorcima malina je u opsegu 2,07-3,36 mg/kg. Sadržaj kemferol-glukozida u uzorcima jagoda je u opsegu 2,34-3,30 mg/kg, u uzorcima kupina je u opsegu 1,76-3,08 mg/kg, u uzorcima borovnica je u opsegu 3,05-3,40 mg/kg, u uzorcima malina je u opsegu 3,18-5,63 mg/kg. Sadržaj rutina u uzorcima u uzorcima kupina je u opsegu 2,42-16,4 mg/kg, u uzorcima borovnica je u opsegu 7,2-31,1 mg/kg, u uzorcima malina je u opsegu 4,37-7,73 mg/kg. Rutin nije detektovan u uzorcima jagoda. Prema *Mikulic-Petkovsek i saradnicima* (2012), glikozidi kvercetina predstavljaju 46-100% ukupnih flavonola u različitim vrstama bobičastog voća. Na osnovu dobijenih rezultata, uočava se da su u ispitivanim uzorcima jagodastog voća od flavonola najzastupljeniji glikozidi kvercetina, pri čemu je sadržaj kvercetin-galaktozida i do 15 puta veći od sadržaja kvercetin-glukozida. Sadržaj kvercetina u ispitivanim uzorcima, veći je u poređenju sa rezultatima ispitivanja uzoraka jagoda, borovnica i malina iz Finske datih u radu *Häkkinen i saradnika* (1999). Sadržaj kemferola u jagodama je niži, a u malinama i borovnicama veći od literaturnih podataka (*Häkkinen i sar.* 1999). U pomenutom radu nisu evidentirani glikozidi kvercetina i kemferola, kao ni rutin. U literaturi nema puno podataka o zastupljenosti rutina u jagodastom voću. Sadržaj rutina u malinama i kupinama znatno je niži u poređenju sa rezultatima u radu *Okatan-a* (2020). Neslaganje sa literaturnim podacima može biti posledica same sorte voća, načina gajenja, kao i geografskog porekla.



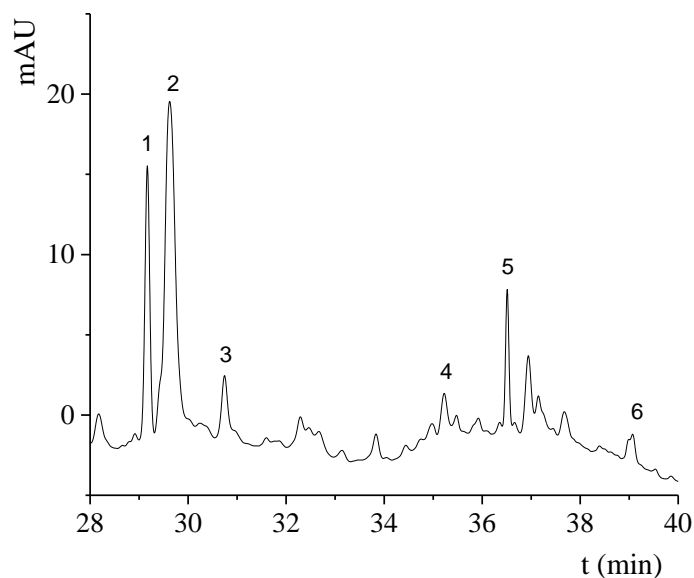
Slika 5.34. HPLC hromatogram uzorka jagode, snimljen na 360 nm (1 – kvercetin-galaktozid, 2 – kvercetin-glukozid, 3 – kemferol-glukozid, 4 – kvercetin, 5 – kemferol)



Slika 5.35. HPLC hromatogram uzorka kupine, snimljen na 360 nm (1 – rutin, 2 – kvercetin-galaktozid, 3 – kvercetin-glukozid, 4 – kemferol-glukozid, 5 – kvercetin, 6 – kemferol)



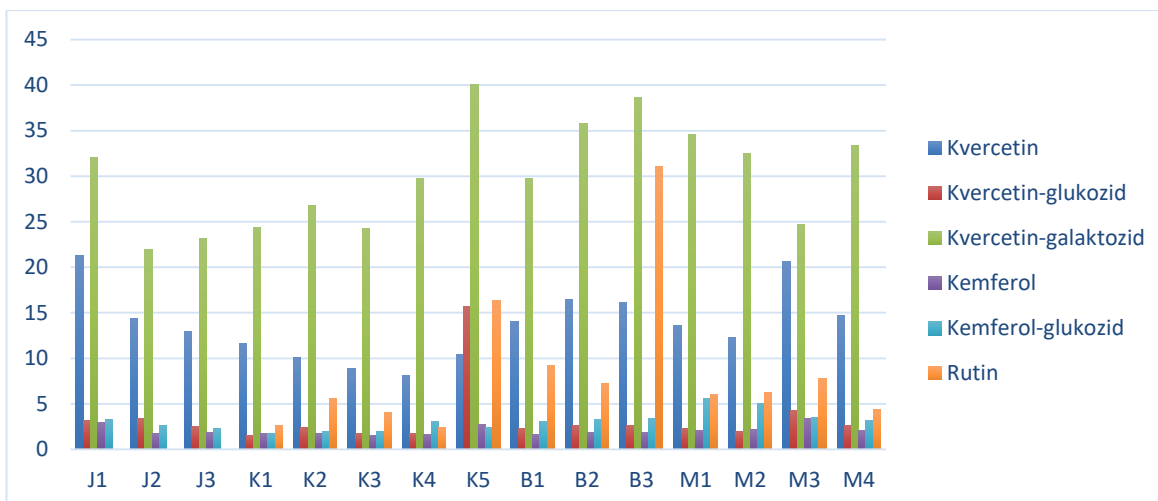
Slika 5.36. HPLC hromatogram uzorka maline, snimljen na 360 nm (1 – rutin, 2 – kvercetin-galaktozid, 3 – kvercetin-glukozid, 4 – kemferol-glukozid, 5 – kvercetin, 6 – kemferol)



Slika 5.37. HPLC hromatogram uzorka borovnice, snimljen na 360 nm (1 – rutin, 2 – kvercetin-galaktozid, 3 – kvercetin-glukozid, 4 – kemferol-glukozid, 5 – kvercetin, 6 – kemferol)

Tabela 5.19. Sadržaj flavonola u kiselometanolnim ekstraktima u uzorcima jagoda, kupina, borovnica i malina

Uzorak	Kvercetin		Kvercetin-glukozid		Kvercetin-galaktozid		Kemferol		Kemferol-glukozid		Rutin	
	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD
	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
J1	21,26±0,5	2,35	3,16±0,03	0,95	32,1±0,1	0,31	3,01±0,01	0,33	3,30±0,02	0,61	n.d.	-
J2	14,37±0,2	1,39	3,33±0,05	1,50	21,9±0,3	1,37	1,77±0,02	1,13	2,58±0,07	2,71	n.d.	-
J3	12,90±0,7	5,43	2,48±0,04	1,61	23,2±0,5	2,16	1,84±0,03	1,63	2,34±0,05	2,14	n.d.	-
K1	11,59±0,02	0,43	1,55±0,02	1,29	24,4±0,3	1,23	1,72±0,06	3,49	1,76±0,01	0,57	2,59±0,03	1,16
K2	10,14±0,1	0,99	2,44±0,01	0,41	26,8±0,7	2,61	1,69±0,05	2,96	1,95±0,03	1,54	5,61±0,05	0,89
K3	8,95±0,01	0,89	1,68±0,01	0,60	24,3±0,2	0,82	1,55±0,03	1,94	1,94±0,03	1,55	4,09±0,07	1,71
K4	8,09±0,01	0,12	1,76±0,03	1,70	29,8±0,3	1,01	1,66±0,04	2,41	3,08±0,07	2,27	2,42±0,04	1,65
K5	10,45±0,02	0,19	15,72±0,05	0,32	40,1±0,5	1,25	2,74±0,05	1,82	2,37±0,06	2,53	16,4±0,3	1,83
B1	13,99±0,5	3,57	2,32±0,07	3,02	29,8±0,6	2,01	1,58±0,01	0,63	3,05±0,02	0,66	9,2±0,03	0,33
B2	16,47±0,3	1,82	2,65±0,03	1,13	35,8±0,3	0,84	1,82±0,01	0,55	3,30±0,04	1,21	7,2±0,01	0,14
B3	16,17±0,3	1,86	2,69±0,08	2,97	38,6±0,7	1,81	1,86±0,02	1,08	3,40±0,01	0,29	31,1±0,9	2,89
M1	13,60±0,05	0,37	2,30±0,04	1,74	34,6±0,4	1,16	2,11±0,01	0,47	5,63±0,08	1,42	6,06±0,05	0,83
M2	12,23±0,03	0,25	1,98±0,05	2,53	32,5±0,7	2,15	2,15±0,03	1,40	5,04±0,04	0,79	6,28±0,07	1,11
M3	20,63±0,04	0,19	4,25±0,03	0,71	24,7±0,5	2,02	3,36±0,01	0,30	3,52±0,01	0,28	7,73±0,04	0,52
M4	14,74±0,2	1,36	2,63±0,05	1,90	33,4±0,5	1,50	2,07±0,02	0,97	3,18±0,01	0,31	4,37±0,05	1,14



Slika 5.38. Sadržaj pojedinačnih flavonola u uzorcima jagodastog voća u kiselometanolnim ekstraktima

Rezultati određivanja sadržaja kvercetina, kvercetin-glukozida, kvercetin-galaktozida, kemferola, kemferol-glukozida i rutina u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima jagodastog voća prikazani su u Prilogu (tabele 5-8). Ekstrakcija prirodnih proizvoda je složen proces, gde svaka varijabla, pojedinačno ili u kombinaciji sa drugima, može uticati na rezultate. Zbog složene prirode matriksa uzoraka i različitih hemijskih karakteristika flavonoida, smatra se da ne postoji jedinstvena i standardna metoda koja bi se koristila za svaki uzorak ili flavonoide koji će se ekstrahovati (Chaves i sar., 2020). Prema dobijenim rezultatima, metanol i 60%-tni etanol su se pokazali kao bolji ekstragensi u poređenju sa vodom i acetonom. Efikasna ekstrakcija flavonola iz jabuka postiže se primenom metanola i zakišeljelog metanola (Rupashinge i sar., 2011). U literaturi je za ekstrakciju flavonola iz uzoraka crnog luka opisan postupak primenom 70% metanola (Kim i sar., 2014), subkritične vode (Ko i sar., 2011) i etanola (Numata i Tanaka, 2011).

Sadržaj kvercetina u uzorcima jagoda je u opsegu 10,57-14,53 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 10,3-17,2 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 11,5-13,8 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 8,7-14,7 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 11,4-15,7 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetina u uzorcima kupina je u opsegu 7,32-9,34 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 6,13-8,58 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 6,40-8,43 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 5,28-6,67 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 5,75-7,55 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetina u uzorcima borovnica je u opsegu 13,6-16,0 mg/kg u

metanolnim ekstraktima, u opsegu 12,0-14,0 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 10,7-14,1 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 13,00-16,3 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 11,0-11,6 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetina u uzorcima malina je u opsegu 8,7-12,7 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 5,0-6,8 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 8,6-12,3 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 8,8-11,6 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 3,3-8,0 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj kvercetin-glukozida u uzorcima jagoda je u opsegu 2,08-2,51 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,62-1,95 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,12-1,85 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,11-2,79 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,27-2,18 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetin-glukozida u uzorcima kupina je u opsegu 1,39-14,6 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,28-13,0 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,20-12,2 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,80-10,4 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 0,92-10,5 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetin-glukozida u uzorcima borovnica je u opsegu 1,93-2,31 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,64-2,17 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,53-2,12 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,35-2,13 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,42-1,98 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetin-glukozida u uzorcima malina je u opsegu 1,03-1,81 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,16-2,46 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,15-1,58 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,27-1,47 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,17-1,32 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj kvercetin-galaktozida u uzorcima jagoda je u opsegu 23,8-25,4 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 22,6-26,5 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 22,3-27,6 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 19,5-30,0 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 14,8-21,6 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetin-galaktozida u uzorcima kupina je u opsegu 23,5-37,0 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 17,1-29,5 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 19,7-34,3 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 15,1-26,8 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 18,3-27,9 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetin-galaktozida u uzorcima borovnica je u opsegu 28,8-33,3 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 20,5-27,4 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 22,6-25,5 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 20,4-26,6 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 21,6-23,6 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kvercetin-galaktozida u uzorcima malina je u opsegu 23,1-27,2 mg/kg

u metanolnim ekstraktima, u opsegu 24,3-29,8 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 21,5-24,1 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 20,4-25,2 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 21,4-25,9 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj kemferola u uzorcima jagoda je u opsegu 1,30-2,53 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,03-1,60 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,03-2,25 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,76-1,55 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 0,77-2,11 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kemferola u uzorcima kupina je u opsegu 1,35-2,38 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,24-2,07 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,09-1,83 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,83-1,46 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 0,94-1,48 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kemferola u uzorcima borovnica je u opsegu 1,08-1,76 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 0,87-1,42 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,89-1,41 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,79-1,14 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 0,62-0,74 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kemferola u uzorcima malina je u opsegu 1,64-2,08 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,43-1,66 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,56-1,96 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,72-2,01 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,63-1,80 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Sadržaj kemferol-glukozida u uzorcima jagoda je u opsegu 1,95-2,15 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,48-2,12 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,94-2,85 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,74-2,59 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,58-2,04 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kemferol-glukozida u uzorcima kupina je u opsegu 1,59-2,42 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,17-2,19 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,34-1,64 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 0,86-1,32 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,15-1,49 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kemferol-glukozida u uzorcima borovnica je u opsegu 2,10-2,63 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,69-2,01 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, 1,53-2,07 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 2,01-2,66 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,71-1,77 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj kemferol-glukozida u uzorcima malina je u opsegu 2,01-2,38 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,57-1,85 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,85-2,36 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 2,20-2,62 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,75-2,13 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Rutin nije detektovan u uzorcima jagoda. Sadržaj rutina u uzorcima kupina je u opsegu 1,93-14,49 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 1,17-12,53 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,32-11,12 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 1,23-8,65 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 1,17-9,53 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj rutina u uzorcima borovnica je u opsegu 6,35-24,6 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 5,72-19,8 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 4,91-22,0 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 4,88-21,1 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 4,60-20,6 mg/kg u acetonskim ekstraktima. Sadržaj rutina u uzorcima malina je u opsegu 3,94-5,50 mg/kg u metanolnim ekstraktima, u opsegu 3,46-6,11 mg/kg u 96% etanolnim ekstraktima, u opsegu 3,87-5,23 mg/kg u 60% etanolnim ekstraktima, u opsegu 3,68-4,23 mg/kg u vodenim ekstraktima i u opsegu 3,29-5,15 mg/kg u acetonskim ekstraktima.

Rezultati određivanja pojedinačnih antocijana u kiselometanolnim ekstraktima ispitivanih uzoraka prikazani su u tabelama 5.20-5.23. Kao najefikasniji ekstragens pokazao se zakišeljani metanol u poređenju sa ostalim rastvaračima. Rezultati određivanja pojedinačnih antocijana u u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima jagodastog voća prikazani su u Prilogu (tabele 9-12). Hromatogrami po jednog uzorka jagode, kupine, borovnice i maline, snimljeni na 520 nm, predstavljeni su na slikama 5.39-5.42.

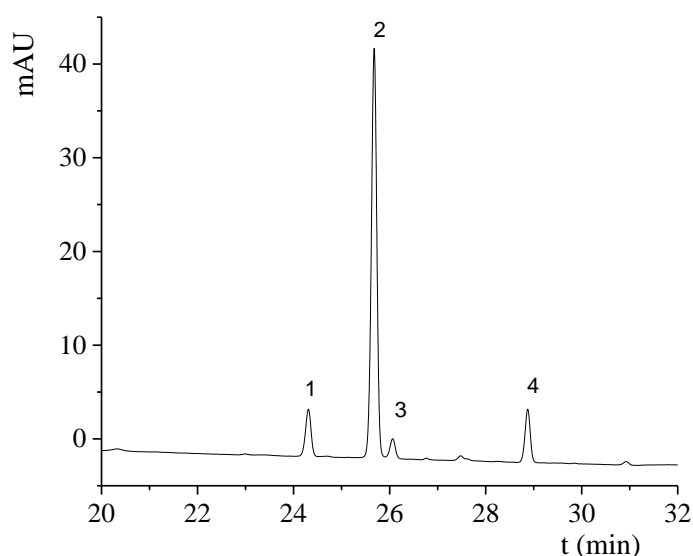
U jagodama su identifikovani pelargonidin-3-*O*-glukozid, pelargonidin-3-*O*-rutinozid, cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-malonilglukozid, a njihov sadržaj je predstavljen u tabeli 5.20. i na slici 5.43. Najzastupljeniji u svim uzorcima je pelargonidin-3-*O*-glukozid (80,85% u uzorku J1, 73,81% u uzorku J2 i 80,74% u uzorku J3), što je u skladu sa podacima iz literature (*da Silva i sar.*, 2007), dok se zastupljenost ostalih antocijana menja u zavisnosti od sorte.

U kupinama su identifikovani cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid i cijanidin-3-*O*-malonilglukozid, a njihov sadržaj je predstavljen u tabeli 5.21. i slici 5.44. Ovi antocijani su identifikovani i u velikom broju uzoraka kupina iz Amerike, Francuske, Makedonije i Čilea (*Fang-Chiang i Wrolstad*, 2005). Cijanidin-3-*O*-glukozid je najzastupljeniji u svim uzorcima kupina (90,93% u uzorku K1, 91,06% u uzorku K2, 89,78% u uzorku K3, 86,01% u uzorku K4 i 94,29% u uzorku K5).

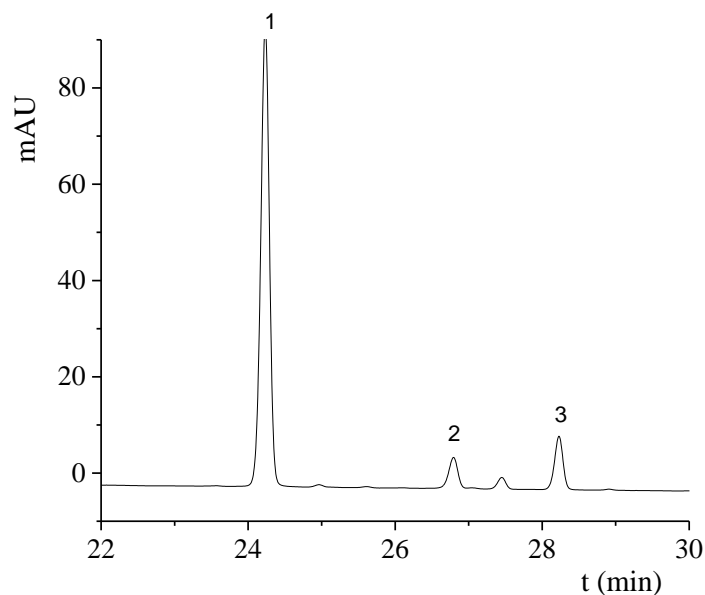
U borovnicama su identifikovani sledeći antocijani: delfinidin-3-*O*-galaktozid, delfinidin-3-*O*-glukozid, delfinidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-arabinozid, petunidin-3-*O*-arabinozid, petunidin-3-*O*-

galaktozid, peonidin-3-*O*-galaktozid i malvidin-3-*O*-galaktozid, a njihov sadržaj je predstavljen u tabeli 5.22.i na slici 5.45. Poređenjem sa radovima *Bae i saradnika* (2015), kao i *Trošt i saradnika* (2008), zaključuje se da borovnice iz Srbije pokazuju visok stepen sličnosti u pogledu sastava pojedinačnih antocijana sa borovnicama iz Slovenije i Južne Koreje. U ispitivanim uzorcima borovnica, najzastupljeniji su glikozidi delfinidina (33,41% u uzorku B1, 39,05% u uzorku B2 i 34,46% u uzorku B3), a zatim slede glikozidi cijanidina (27,53% u uzorku B1, 26,08% u uzorku B2 i 28,01% u uzorku B3).

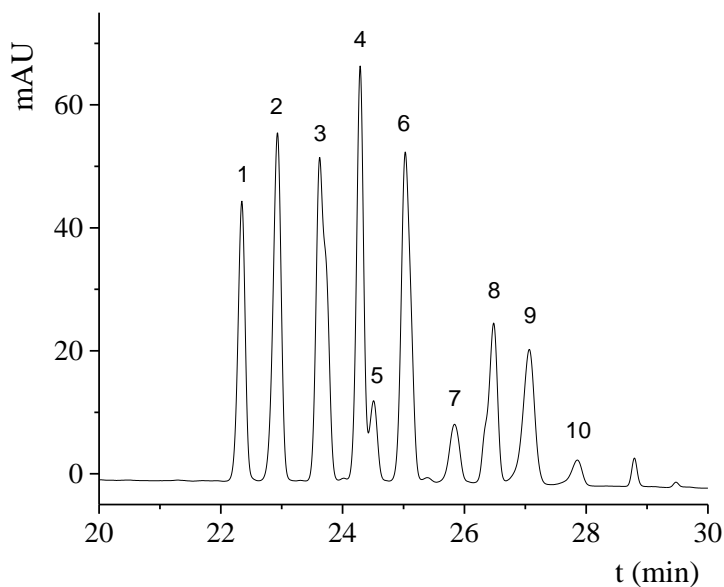
U malinama su identifikovani: cijanidin-3-*O*-soforozid, pelargonidin-3-*O*-soforozid, cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-rutinozid (tabela 5.23., slika 5.46.), što je u saglasnosti sa podacima iz literature koji se odnose na antocijane identifikovane u različitim sortama maline (*Vinčić*, 2017; *Mazur i sar.*, 2014; *Garcia-Viguera i sar.*, 1998). Cijanidin-3-soforozid je karakterističan za evropske sorte maline (*Rao i Snyder*, 2010), i najzastupljeniji je u ispitivanim uzorcima (73,60% u uzorku M1, 51,60% u uzorku M2, 72,68% u uzorku M3 i 73,33% u uzorku M4).



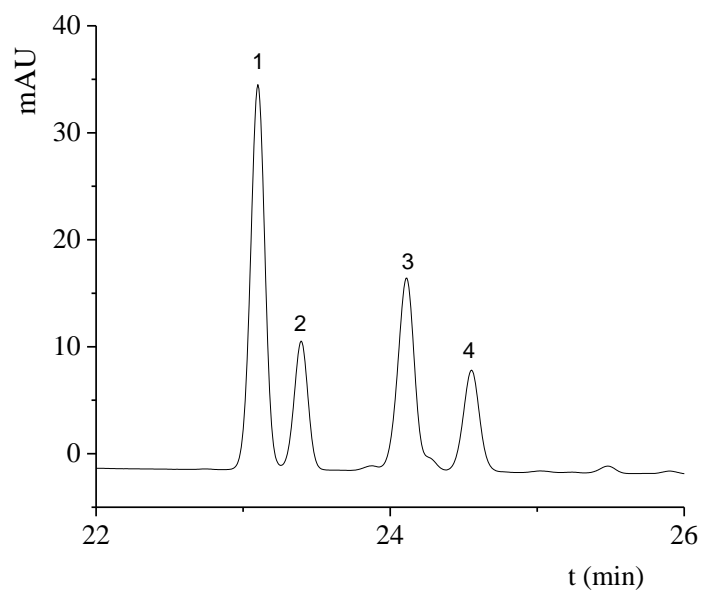
Slika 5.39. HPLC hromatogram uzorka jagode, snimljen na 520 nm (1 – cijanidin-3-*O*-glukozid, 2 – pelargonidin-3-*O*-glukozid, 3 – pelargonidin-3-*O*-rutinozid, 4 – cijanidin-3-*O*-malonilglukozid)



Slika 5.40. HPLC hromatogram uzorka kupine, snimljen na 520 nm (1 – cijanidin-3-*O*-glukozid, 2 – cijanidin-3-*O*-rutinozid, 3 – cijanidin-3-*O*-malonilglukozid)



Slika 5.41. HPLC hromatogram uzorka borovnice, snimljen na 520 nm (1 – delfinidin-3-*O*-galaktozid, 2 – delfinidin-3-*O*-glukozid, 3 – cijanidin-3-*O*-galaktozid, 4 – delfinidin-3-*O*-arabinozid, 5 – cijanidin-3-*O*-glukozid, 6 – petunidin-3-*O*-galaktozid, 7 – cijanidin-3-*O*-arabinozid, 8 – peonidin-3-*O*-galaktozid, 9 – petunidin-3-*O*-arabinozid, 10 – malvidin-3-*O*-galaktozid)



Slika 5.42. HPLC hromatogram uzorka maline, snimljen na 520 nm (1 – cijanidin-3-*O*-soforozid, 2 – pelargonidin-3-*O*-soforozid, 3 – cijanidin-3-*O*-glukozid, 4 – cijanidin-3-*O*-rutinozid)

Tabela 5.20. Sadržaj pojedinačnih antocijana u kiselometanolnim ekstraktima u uzorcima jagoda

Uzorak	Pelargonidin-3- <i>O</i> -glukozid		Pelargonidin-3- <i>O</i> -rutinozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -malonilglukozid	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
J1	76±1	1,31	4,08±0,03	0,73	2,31±0,04	1,73	11,6±0,1	0,86
J2	84±2	2,38	6,05±0,05	0,83	9,77±0,03	0,31	14,0±0,2	1,43
J3	135±5	3,70	6,51±0,05	0,77	12,4±0,1	0,80	13,3±0,1	0,75

Tabela 5.21. Sadržaj pojedinačnih antocijana u kiselometanolnim ekstraktima u uzorcima kupina

Uzorak	Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -malonilglukozid	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
K1	338±8	2,37	22,9±0,2	0,87	10,84±0,05	0,46
K2	336±5	1,49	20,2±0,4	1,98	12,8±0,1	0,78
K3	202±4	1,98	13,3±0,1	0,75	9,8±0,1	1,02
K4	246±4	1,63	16,7±0,3	1,80	23,8±0,3	1,26
K5	438±7	1,60	14,3±0,1	0,70	12,21±0,07	0,57

Tabela 5.21. Sadržaj pojedinačnih antocijana u kiselometanolnim ekstraktima u uzorcima borovnica

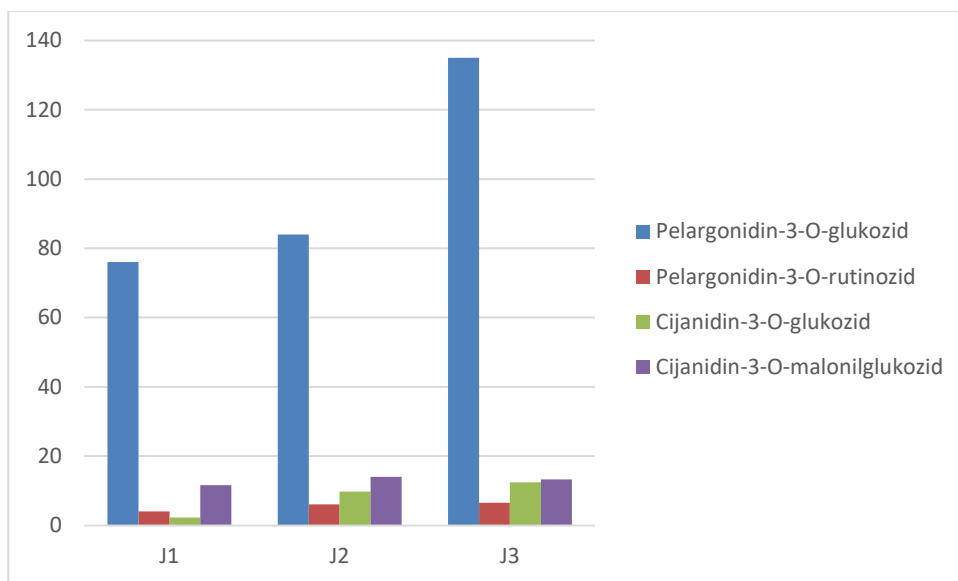
Uzorak	Delfinidin-3- <i>O</i> -galaktozid		Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid		Delfinidin-3- <i>O</i> -arabinozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
B1	67±3	4,48	23,4±0,3	1,28	n.d.	-	24,2±0,5	2,07	29±1	3,45
B2	127±4	3,15	128±2	1,56	69±3	4,35	41±2	4,88	149±4	2,68
B3	157±2	1,27	192±3	1,57	57±1	1,75	160±6	3,75	90±1	1,11

Tabela 5.21. Nastavak

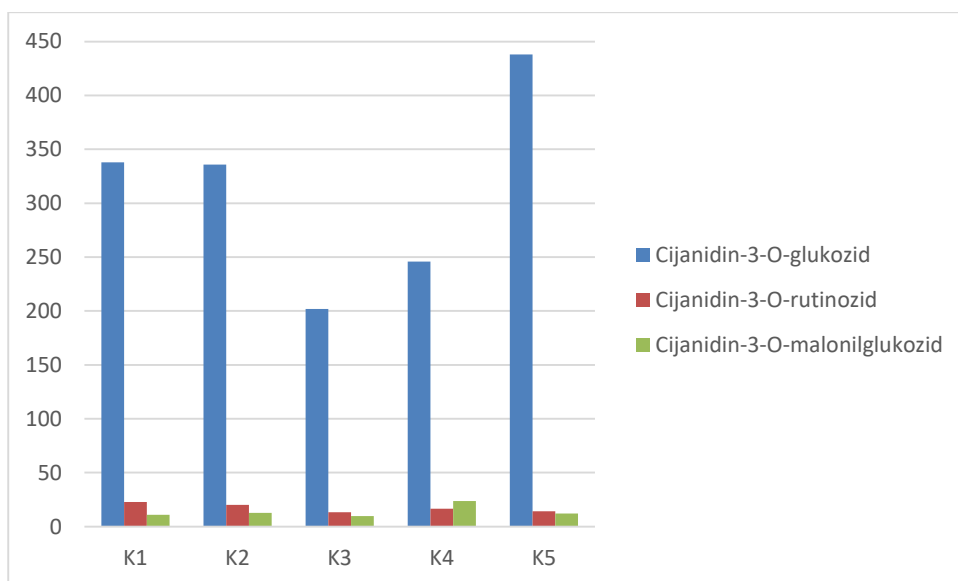
Uzorak	Cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid		Petunidin-3- <i>O</i> -arabinozid		Petunidin-3- <i>O</i> -galaktozid		Peonidin-3- <i>O</i> -galaktozid		Malvidin-3- <i>O</i> -galaktozid	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
B1	21,3±0,1	0,47	14,1±0,2	1,42	20±1	5,00	36±1	2,78	35,6±0,2	0,56
B2	26,4±0,1	0,38	111±3	2,70	96±2	2,08	56±1	1,78	26,2±0,1	0,38
B3	80±2	2,50	151±2	1,32	172±3	1,74	71±2	2,82	48±1	2,08

Tabela 5.21. Sadržaj pojedinačnih antocijana u kiselometanolnim ekstraktima u uzorcima malina

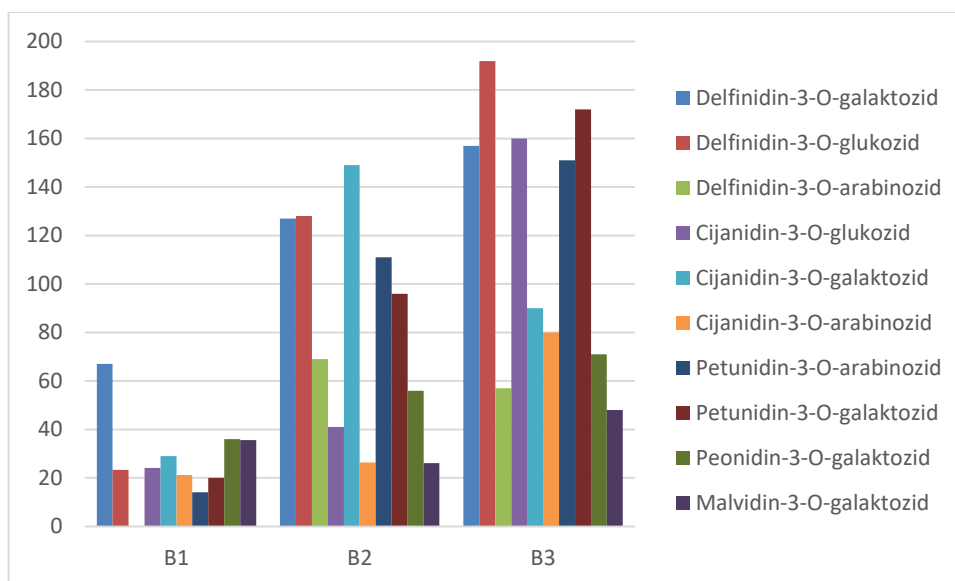
Uzorak	Cijanidin-3- <i>O</i> -soforozid		Pelargonidin-3- <i>O</i> -soforozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid	
	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
M1	106±5	4,72	8,72±0,3	3,44	19,8±0,1	0,51	9,5±0,2	2,11
M2	77±1	1,30	7,62±0,1	1,31	47,6±0,8	1,68	17,0±0,1	0,59
M3	203±7	3,45	9,19±0,4	4,35	56,3±0,4	0,71	10,8±0,1	0,93
M4	91±3	3,30	7,77±0,1	1,29	28,8±0,5	1,74	n.d.	-



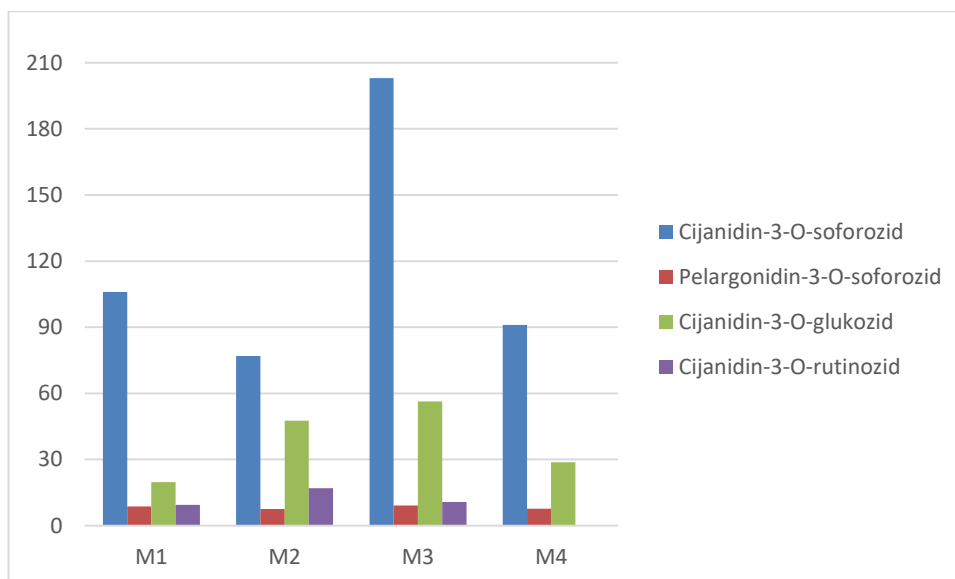
Slika 5.43. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima jagoda u kiselometanolnim ekstraktima



Slika 5.44. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima kupina u kiselometanolnim ekstraktima



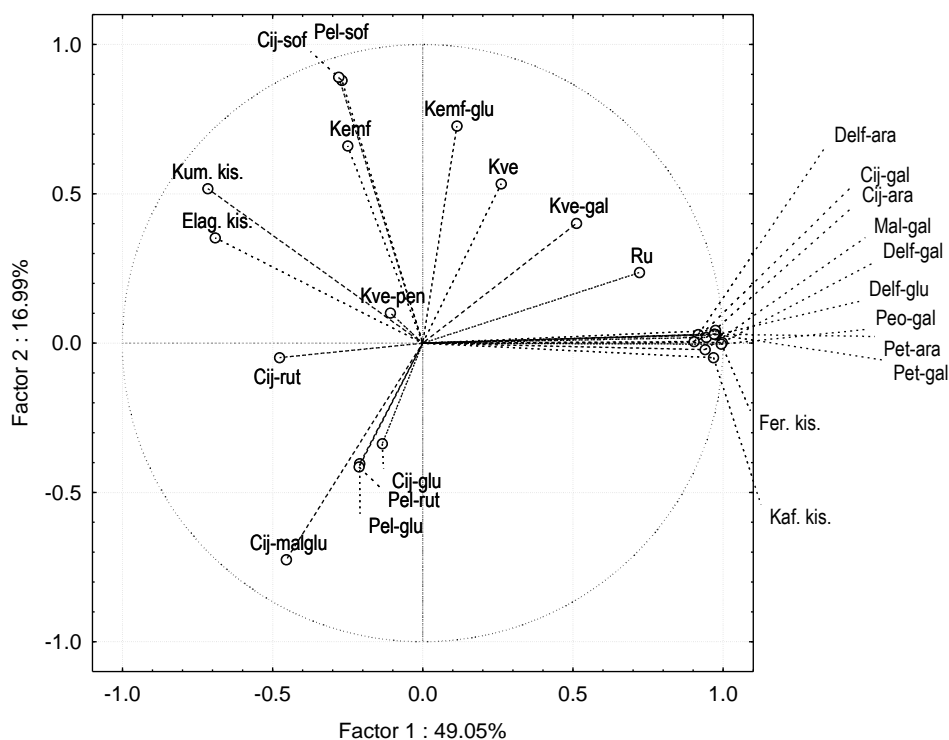
Slika 5.45. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima borovnica u kiselometanolnim ekstraktima



Slika 5.46. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima malina u kiselometanolnim ekstraktima

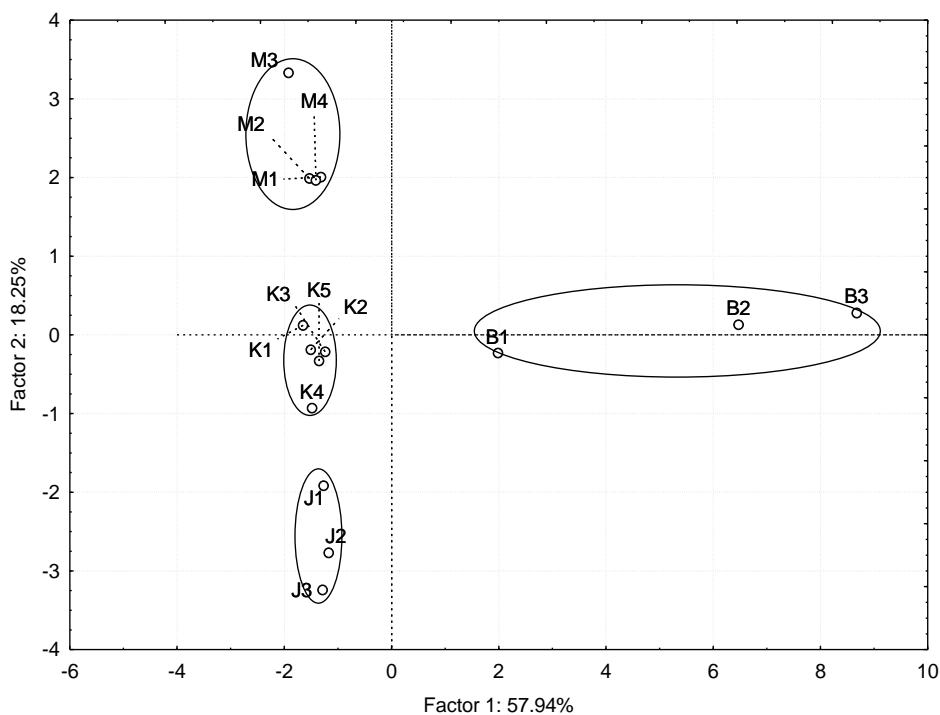
U cilju diferenciranja uzoraka jagodastog voća, na osnovu sadržaja fenolnih kiselina, flavonola i pojedinačnih antocijana, primenjena je analiza glavnih komponenti – PCA. Formirana matrica podataka dimenzije 15×26 sa sadržajem fenolnih kiselina, pojedinačnih flavonola i pojedinačnih antocijana u kolonama (26) i uzorcima jagodastog voća u redovima (15).

Na osnovu dobijenog PCA dijagrama raspodele u odnosu na prve dve ose glavnih komponenti (slika 5.47.), zapaža se da su pojedinačna polifenolna jedinjenja razvrstana u nekoliko grupa. Prvu grupu čine antocijani zastupljeni u borovnicama-arabinozidi i galaktozidi delfinidina, peonidina, petunidina, malvidina i cijanidina koji se po drugoj osi izdvajaju i nalaze se u desnom delu dijagrama, tj. sa pozitivnim vrednostima prvog faktora i vrednostima drugog faktora oko nule. Ovde spadaju i kafena i ferulna kiselina, koje su jedine kiseline detektovane u borovnicama. Drugu grupu čine flavonoli, sa pozitivnim vrednostima prvog i drugog faktora. Treću grupu čine *p*-kumarna i elaginska kiselina, kao soforozidi cijanidina i pelargonidina, detektovani jedino u malinama, sa pozitivnim vrednostima drugog faktora i negativnim vrednostima prvog faktora. U četvrtoj grupi se nalaze rutinozidi i glukozidi cijanidina i pelargonidina, sa negativnim vrednostima prvog i drugog faktora.



Slika 5.47. PC1-PC2 dijagram pojedinačnih polifenolnih jedinjenja dobijen na osnovu sadržaja u uzorcima jagodastog voća

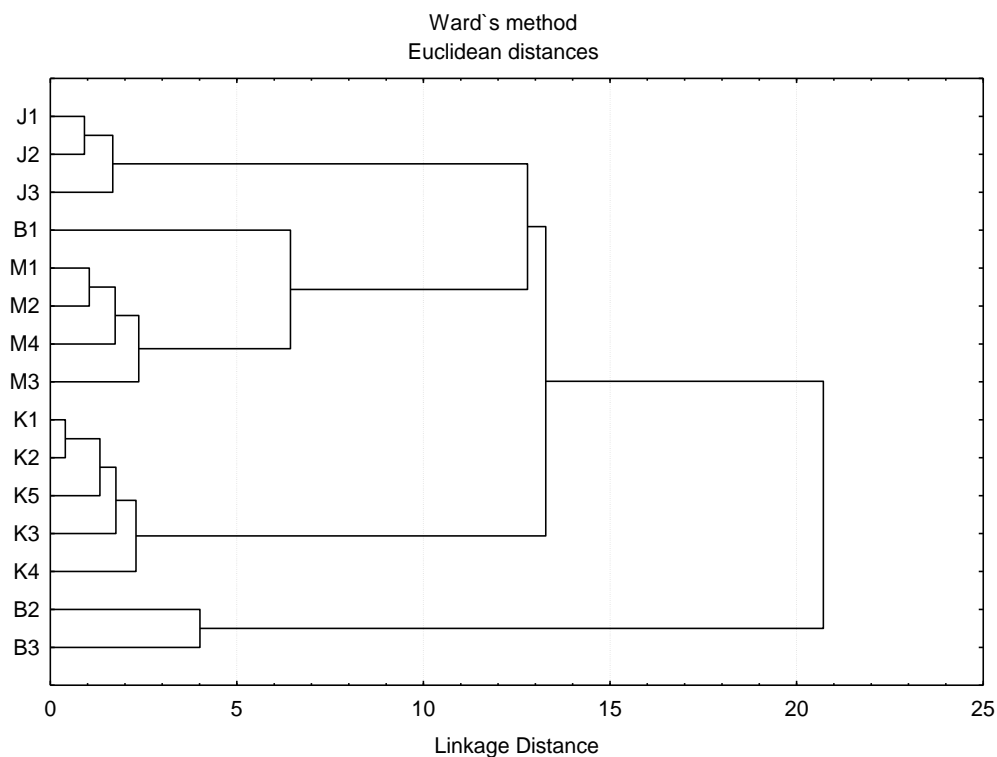
Primenom PCA analize na dobijene rezultate ispitivanja izvršeno je grupisanje uzoraka, predstavljeno na slici 5.36. Prve dve komponente objašnjavaju 76,2% varijabilnosti. Na osnovu dobijenog PCA dijagrama raspodele u odnosu na prve dve ose, svi uzorci mogu da se svrstaju u četiri grupe (slika 5.48.). Prvu grupu čine uzorci malina, koji se odlikuju negativnim vrednostima prvog faktora i visokim pozitivnim vrednostima drugog faktora. Unutar ove grupe izdvaja se uzorak maline M3, koji se odlikuje većim sadržajem pojedinačnih antocijana i kvercetina u odnosu na ostale uzorke maline. Drugu grupu čine uzorci kupina, sa negativnim vrednostima prvog faktora i vrednostima drugog faktora bliskih nuli. Treću grupu čine uzorci jagode, sa negativnim vrednostima prvog i drugog faktora. Četvrtu grupu čine uzorci borovnice, unutar koje se izdvaja uzorak B1, sa nižim sadržajem ferulne kiseline i pojedinačnih antocijana, u odnosu na uzorke B2 i B3.



Slika 5.48. PC1-PC2 dijagram raspodele ispitivanih uzoraka jagodastog voća

Na slici 5.49. je prikazan dendrogram grupisanja uzoraka jagodastog voća, na osnovu Euklidskog rastojanja, po Ward-ovoj metodi. Uzorci su grupisani u dva klastera. Prvi klaster čine uzorci borovnica B2 i B3. U drugom klasteru se zapažaju tri potklastera. U prvom potklasteru su uzorci jagoda J1, J2 i J3. U drugom potklasteru uzorci malina M1, M2, M3, M4 i jedan uzorak borovnice, B1. Uzorak borovnice B1 se odlikuje nižim sadržajem svih identifikovanih pojedinačnih antocijana, kao i nižim sadržajem ferulne

kiseline od uzoraka borovnica B2 i B3. Treći potklaster obuhvata uzorke kupina K1, K2, K3, K4 i K5.



Slika 5.49. Dendrogram grupisanja uzoraka jagodastog voća na osnovu sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja

Grupisanje uzoraka jagodastog voća na osnovu sadržaja pojedinačnih polifenolnih jedinjenja klaster analizom potvrdilo je grupisanje uzoraka dobijeno primenom PCA analize.

5.5. Kinetika termičke degradacije ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida, antocijana i pojedinačnih antocijana u džemovima od malina, kupina, borovnica i jagoda

5.5.1. Termička degradacija ukupnih polifenolnih jedinjenja i flavonoida

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima pripremljenih džemova od malina, kupina, borovnica i jagoda dati su u tabelama 5.22-5.25, dok je grafički prikaz promene sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja predstavljen na

slikama 5.50-5.57. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja veći je u džemovima sa manjim sadržajem šećera, pošto je za pripremu korišćena veća količina voćnog pirea. U skladu s tim praćeno je i diskutovano procentualno smanjenje kolićine ukupnih polifenolnih jedinjenja.

Sa porastom temperature, dućine kuvanja i kolićine šećera u džemovima, sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja se smanjuje. Linearni trend opadanja koncentracije ukupnih polifenola uoćava se do 30. minuta na 90 °C i 95 °C, do 20. minuta na 100 °C i do 15. minuta na 105 °C. Nakon ovih perioda dolazi do odstupanja od linearnosti, što ukazuje na činjenicu da se ukupni polifenoli brće transformišu do krajnjih proizvoda razgradnje na višim temperaturama. Najmanji gubitak u sadržaju ukupnih polifenola uoćava se nakon 5 minuta kuvanja na 90 °C i iznosi: 10,26% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 7,80% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 10,42% u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 9,31% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 8,95% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 3,40% u džemu sa manjim sadržajem šećera; 7,16% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 3,98% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera. Najveći gubitak u sadržaju ukupnih polifenola zapaćen je nakon 30 minuta kuvanja na 105 °C i iznosi 64,57% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 51,15% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 72,51% u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 50,12% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 73,63% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 59,55% u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 62,50% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 55,68% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera.

Rezultati odrećivanja sadržaja ukupnih flavonoida u uzorcima pripremljenih džemova dati su u tabelama 5.26-5.29. Grafićki prikaz promene sadržaja ukupnih flavonoida tokom kuvanja džemova dat je na slikama 5.58-5.65.

Sa porastom temperature, dućine kuvanja i kolićine šećera, sadržaj ukupnih flavonoida se smanjuje, pri ćemu se najmanji gubitak uoćava nakon 5 minuta kuvanja na 90 °C i iznosi 17,65% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 2,55% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 13,79% u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 9,31% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 13,22% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 2,76% u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 11,61% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 6,28% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera. Najveći gubitak u sadržaju ukupnih flavonoida zapaćen je nakon 30 minuta kuvanja na 105 °C i iznosi 66,18% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 50,68% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 69,95% u džemu od kupina sa

većim sadržajem šećera i 55,87% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 60,34% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 46,36% u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 62,42% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 46,01% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera.

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoida u svim uzorcima džemova izraženi su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($c_{sr}\pm SD$, $n=3$), dok je početna koncentracija (pre početka kuvanja) označena zvezdicom (*).

Tabela 5.22. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemovima od malina sa većim i manjim sadržajem šećera

Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)
				3,02±0,02*	0,66
90	5	2,71±0,03	1,11	3,19±0,01	0,31
	10	2,44±0,04	1,64	3,02±0,01	0,33
	15	2,21±0,02	0,90	2,88±0,01	0,35
	20	2,06±0,06	2,91	2,69±0,01	0,37
	30	1,73±0,04	2,31	2,55±0,02	0,78
95	5	2,6±0,1	3,85	3,14±0,01	0,32
	10	2,28±0,06	2,63	2,89±0,02	0,69
	15	1,88±0,03	1,60	2,64±0,01	0,38
	20	1,81±0,03	1,66	2,53±0,04	1,58
	30	1,43±0,07	4,90	2,25±0,01	0,44
100	5	2,48±0,04	1,61	3,05±0,02	0,66
	10	2,14±0,04	1,87	2,76±0,01	0,36
	15	1,74±0,07	4,02	2,39±0,01	0,42
	20	1,38±0,03	2,17	2,28±0,01	0,44
	30	1,21±0,01	0,83	2,00±0,01	0,50
105	5	2,35±0,02	0,85	2,96±0,01	0,34
	10	1,74±0,03	1,72	2,49±0,01	0,40
	15	1,47±0,02	1,36	2,05±0,01	0,49
	20	1,23±0,01	0,81	1,88±0,02	1,06
	30	1,07±0,01	0,93	1,69±0,02	1,18

Tabela 5.23. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemovima od kupina sa većim i manjim sadržajem šećera

Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)
				3,31±0,01*	0,3
90	5	2,956±0,002	0,07	3,80±0,07	1,84
	10	2,59±0,03	1,16	3,66±0,01	0,27
	15	2,33±0,01	0,43	3,38±0,05	1,48
	20	1,94±0,05	2,58	3,218±0,004	0,12
	30	1,55±0,01	0,64	2,94±0,03	1,02
95	5	2,89±0,03	1,04	3,75±0,05	1,33
	10	2,435±0,002	0,08	3,42±0,02	0,58
	15	1,91±0,05	2,62	3,06±0,03	0,98
	20	1,65±0,01	0,61	2,845±0,004	0,14
	30	1,315±0,004	0,30	2,72±0,01	0,37
100	5	2,73±0,03	1,10	3,58±0,01	0,28
	10	2,09±0,05	1,83	3,15±0,03	0,95
	15	1,45±0,03	2,07	2,86±0,03	1,05
	20	1,35±0,05	3,70	2,64±0,02	0,75
	30	1,10±0,07	6,36	2,29±0,03	1,31
105	5	2,62±0,01	0,38	3,50±0,07	2,00
	10	1,49±0,03	2,01	2,97±0,02	0,67
	15	1,103±0,002	0,18	2,62±0,03	1,14
	20	1,03±0,04	3,88	2,32±0,01	0,43
	30	0,91±0,01	1,10	2,09±0,05	2,39

Tabela 5.24. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemovima od borovnica sa većim i manjim sadržajem šećera

Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)
		4,02±0,03*	0,75	5,29±0,01*	0,19
90	5	3,66±0,06	1,64	5,11±0,02	0,39
	10	2,85±0,06	2,10	4,43±0,01	0,23
	15	2,32±0,01	0,43	4,02±0,04	0,99
	20	1,89±0,01	0,53	3,70±0,03	0,81
	30	1,69±0,01	0,59	3,28±0,04	1,22
95	5	3,54±0,01	0,28	5,00±0,07	1,40
	10	2,52±0,06	2,38	4,20±0,04	0,95
	15	1,89±0,01	0,38	3,52±0,03	0,85
	20	1,59±0,01	0,53	3,31±0,04	1,21
	30	1,36±0,07	5,15	3,19±0,03	0,94
100	5	3,32±0,03	0,90	4,77±0,05	1,05
	10	2,26±0,04	1,77	3,82±0,05	1,31
	15	1,60±0,04	2,50	3,09±0,08	2,59
	20	1,30±0,03	2,31	2,95±0,05	1,69
	30	1,21±0,01	0,83	2,24±0,04	1,78
105	5	3,01±0,03	1,00	4,63±0,01	0,22
	10	1,98±0,04	2,02	3,27±0,01	0,31
	15	1,32±0,01	0,75	2,78±0,02	0,72
	20	1,19±0,01	0,84	2,63±0,02	0,76
	30	1,06±0,01	0,94	2,14±0,04	1,87

Tabela 5.25. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemovima od jagoda sa većim i manjim sadržajem šećera

Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg GAE/g)	RSD (%)
				2,80±0,07*	2,53
90	5	2,66±0,06	2,13	3,26±0,05	1,65
	10	2,54±0,04	1,39	3,19±0,03	0,85
	15	2,32±0,01	0,61	3,11±0,03	1,05
	20	2,16±0,08	3,83	3,05±0,03	0,96
	30	2,06±0,01	0,69	2,98±0,07	2,23
95	5	2,56±0,01	0,28	3,14±0,07	2,36
	10	2,37±0,02	0,90	3,07±0,05	1,61
	15	2,16±0,01	0,65	2,9±0,1	4,94
	20	2,03±0,01	0,70	2,75±0,05	1,79
	30	1,78±0,05	2,78	2,6±0,1	4,20
100	5	2,38±0,01	0,59	2,98±0,03	0,84
	10	2,15±0,08	3,63	2,81±0,05	1,61
	15	1,88±0,04	2,26	2,57±0,04	1,65
	20	1,71±0,04	2,48	2,37±0,06	2,51
	30	1,50±0,07	4,30	2,22±0,01	0,40
105	5	2,10±0,01	0,67	2,77±0,03	1,02
	10	1,69±0,08	5,02	2,27±0,01	0,44
	15	1,45±0,01	0,78	2,14±0,03	1,19
	20	1,24±0,08	6,30	1,92±0,03	1,37
	30	1,07±0,04	5,77	1,8±0,1	6,20

Tabela 5.26. Sadržaj ukupnih flavonoida u džemovima od malina sa većim i manjim sadržajem šećera

Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem		Džem sa manjim sadržajem	
		šećera		šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)
		0,34±0,01*	2,94	0,588±0,001*	0,17
90	5	0,28±0,01	3,57	0,573±0,001	0,17
	10	0,26±0,01	3,85	0,539±0,001	0,19
	15	0,245±0,007	2,86	0,510±0,002	0,39
	20	0,228±0,006	2,63	0,494±0,001	0,20
	30	0,210±0,004	1,90	0,419±0,002	0,48
95	5	0,27±0,01	3,70	0,563±0,004	0,71
	10	0,244±0,003	1,23	0,512±0,005	0,98
	15	0,222±0,004	1,80	0,466±0,004	0,86
	20	0,205±0,005	2,44	0,431±0,005	1,16
	30	0,185±0,005	2,70	0,371±0,006	1,62
100	5	0,257±0,006	2,33	0,543±0,008	1,47
	10	0,227±0,007	3,08	0,475±0,007	1,47
	15	0,186±0,005	2,69	0,40±0,01	2,50
	20	0,171±0,004	2,34	0,37±0,01	2,70
	30	0,151±0,006	3,97	0,323±0,004	1,24
105	5	0,244±0,003	1,23	0,521±0,003	0,58
	10	0,204±0,003	1,47	0,406±0,008	1,97
	15	0,148±0,004	2,70	0,353±0,008	2,27
	20	0,131±0,003	2,29	0,315±0,007	2,22
	30	0,115±0,002	1,74	0,29±0,01	3,45

Tabela 5.27. Sadržaj ukupnih flavonoida u džemovima od kupina sa većim i manjim sadržajem šećera

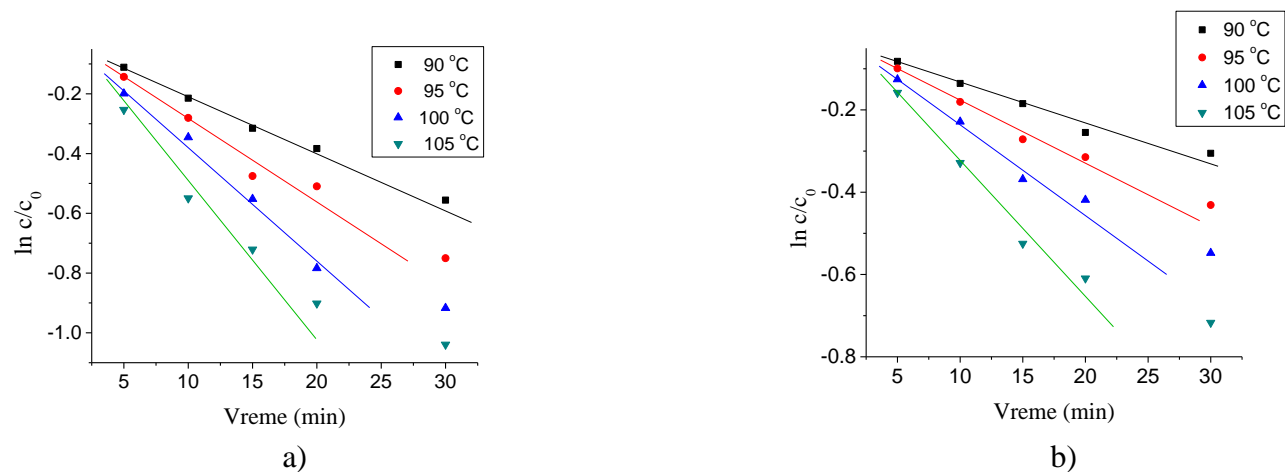
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)
				0,203±0,002*	0,98
90	5	0,175±0,005	2,86	0,224±0,003	1,34
	10	0,164±0,003	1,83	0,213±0,001	0,47
	15	0,148±0,001	0,67	0,199±0,005	2,51
	20	0,140±0,002	1,43	0,180±0,006	3,33
	30	0,131±0,005	3,82	0,17±0,01	5,88
95	5	0,17±0,01	5,92	0,22±0,00	0,00
	10	0,151±0,003	1,99	0,197±0,003	1,52
	15	0,136±0,003	2,21	0,180±0,002	1,11
	20	0,120±0,002	1,67	0,166±0,007	4,22
	30	0,110±0,005	4,54	0,143±0,003	2,10
100	5	0,160±0,002	1,25	0,21±0,01	4,76
	10	0,129±0,002	1,55	0,184±0,005	2,72
	15	0,117±0,003	2,56	0,165±0,002	1,21
	20	0,095±0,000	0,00	0,148±0,001	0,67
	30	0,076±0,002	2,63	0,130±0,002	1,54
105	5	0,15±0,01	6,67	0,205±0,005	2,44
	10	0,112±0,007	6,25	0,177±0,003	1,69
	15	0,095±0,005	5,26	0,150±0,003	2,00
	20	0,080±0,002	2,50	0,125±0,002	1,60
	30	0,061±0,001	1,64	0,109±0,002	1,83

Tabela 5.28. Sadržaj ukupnih flavonoida u džemovima od borovnica sa većim i manjim sadržajem šećera

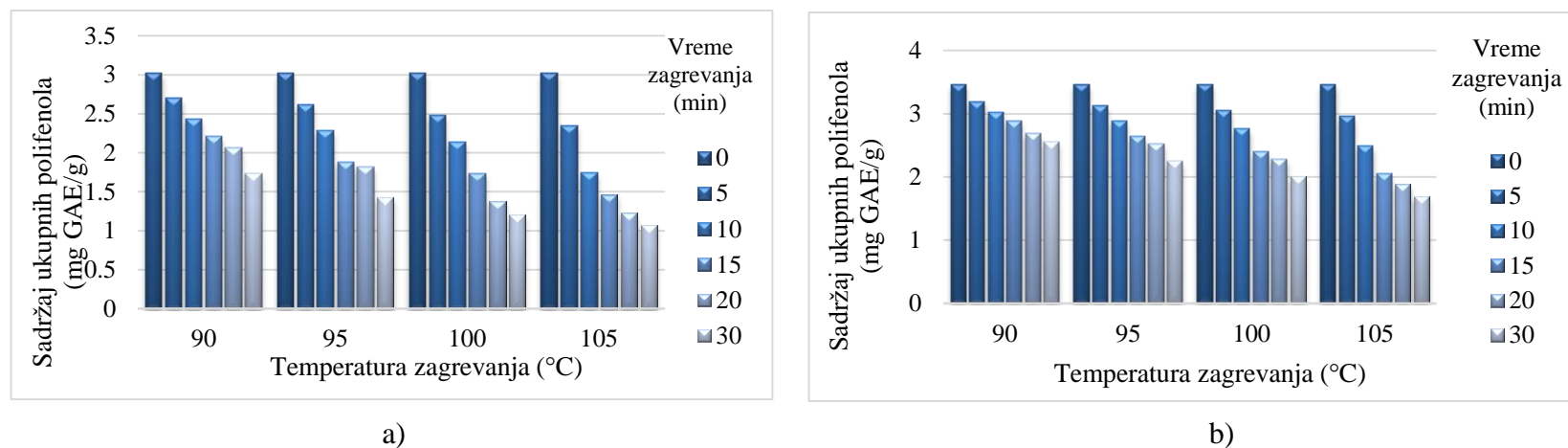
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)
				$0,348 \pm 0,004^*$	1,15
90	5	$0,302 \pm 0,006$	1,98	$0,388 \pm 0,001$	0,26
	10	$0,262 \pm 0,004$	1,53	$0,355 \pm 0,001$	0,28
	15	$0,227 \pm 0,001$	0,44	$0,322 \pm 0,001$	0,31
	20	$0,200 \pm 0,002$	1,00	$0,304 \pm 0,002$	0,66
	30	$0,182 \pm 0,003$	1,65	$0,291 \pm 0,002$	0,69
95	5	$0,295 \pm 0,001$	0,34	$0,383 \pm 0,002$	0,52
	10	$0,251 \pm 0,001$	0,40	$0,343 \pm 0,003$	0,87
	15	$0,205 \pm 0,003$	1,46	$0,299 \pm 0,004$	1,34
	20	$0,182 \pm 0,001$	0,55	$0,283 \pm 0,001$	0,35
	30	$0,162 \pm 0,001$	0,62	$0,270 \pm 0,001$	0,37
100	5	$0,281 \pm 0,001$	0,36	$0,374 \pm 0,003$	0,80
	10	$0,235 \pm 0,001$	0,43	$0,314 \pm 0,001$	0,32
	15	$0,191 \pm 0,003$	1,57	$0,273 \pm 0,001$	0,37
	20	$0,171 \pm 0,001$	0,58	$0,253 \pm 0,003$	1,18
	30	$0,152 \pm 0,002$	1,32	$0,237 \pm 0,001$	0,42
105	5	$0,275 \pm 0,002$	0,73	$0,360 \pm 0,002$	0,55
	10	$0,217 \pm 0,001$	0,46	$0,298 \pm 0,004$	1,34
	15	$0,171 \pm 0,002$	1,17	$0,251 \pm 0,001$	0,40
	20	$0,156 \pm 0,001$	0,64	$0,227 \pm 0,003$	1,32
	30	$0,138 \pm 0,002$	1,45	$0,214 \pm 0,004$	1,87

Tabela 5.29. Sadržaj ukupnih flavonoida u džemovima od jagoda sa većim i manjim sadržajem šećera

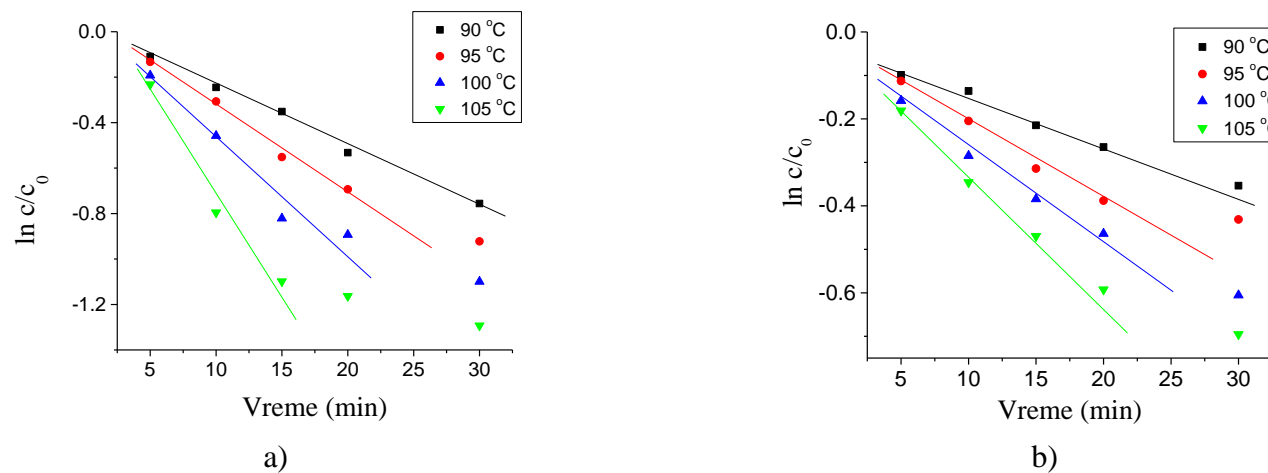
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg CE/g)	RSD (%)
				0,287±0,003*	1,05
90	5	0,254±0,005	1,97	0,335±0,003	0,89
	10	0,229±0,008	3,50	0,329±0,005	1,52
	15	0,217±0,003	1,39	0,310±0,002	0,65
	20	0,193±0,001	0,52	0,291±0,005	1,72
	30	0,167±0,001	0,60	0,279±0,008	2,86
95	5	0,248±0,005	2,02	0,329±0,005	1,52
	10	0,218±0,001	0,46	0,303±0,008	2,64
	15	0,192±0,003	1,56	0,295±0,001	0,34
	20	0,175±0,007	3,99	0,276±0,005	1,81
	30	0,148±0,005	3,38	0,247±0,003	1,22
100	5	0,231±0,001	0,43	0,316±0,005	1,58
	10	0,204±0,001	0,49	0,285±0,003	1,05
	15	0,170±0,003	1,77	0,266±0,005	1,88
	20	0,157±0,005	3,18	0,257±0,009	3,50
	30	0,135±0,001	0,74	0,224±0,007	3,12
105	5	0,226±0,007	3,10	0,303±0,005	1,65
	10	0,182±0,003	1,65	0,257±0,008	3,11
	15	0,152±0,003	1,98	0,221±0,007	3,17
	20	0,133±0,005	3,77	0,204±0,002	0,98
	30	0,108±0,007	6,49	0,193±0,005	2,59



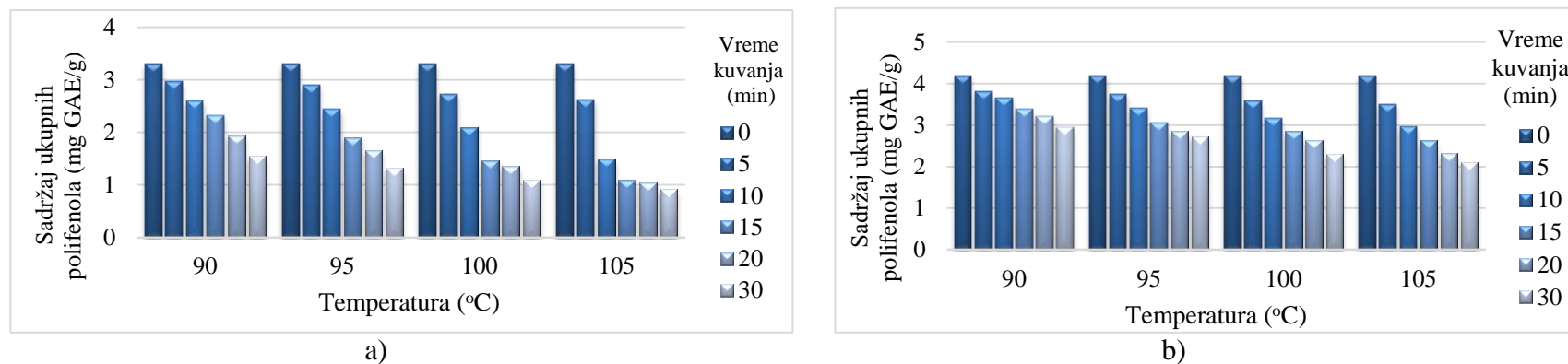
Slika 5.50. Promena sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



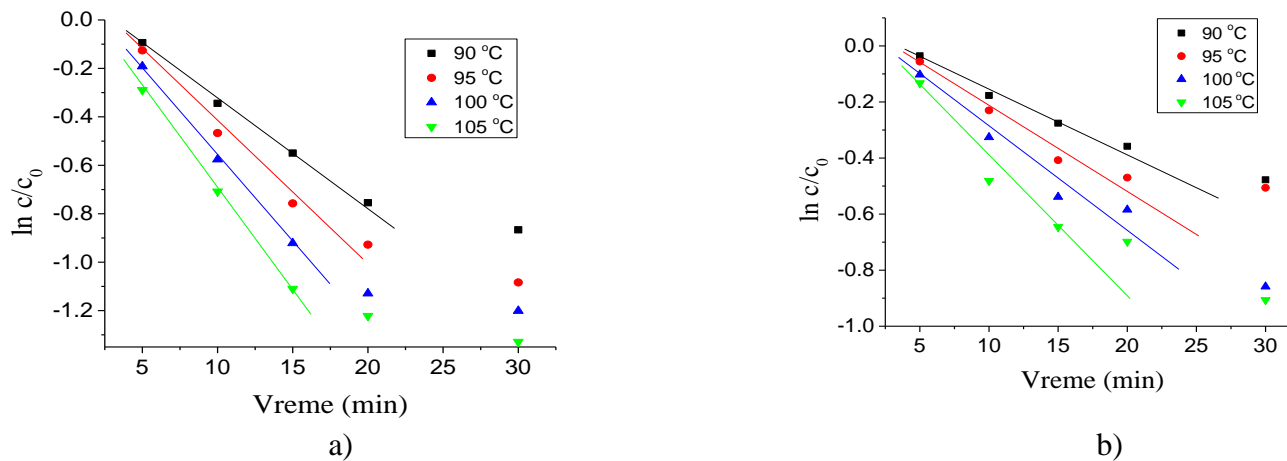
Slika 5.51. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera



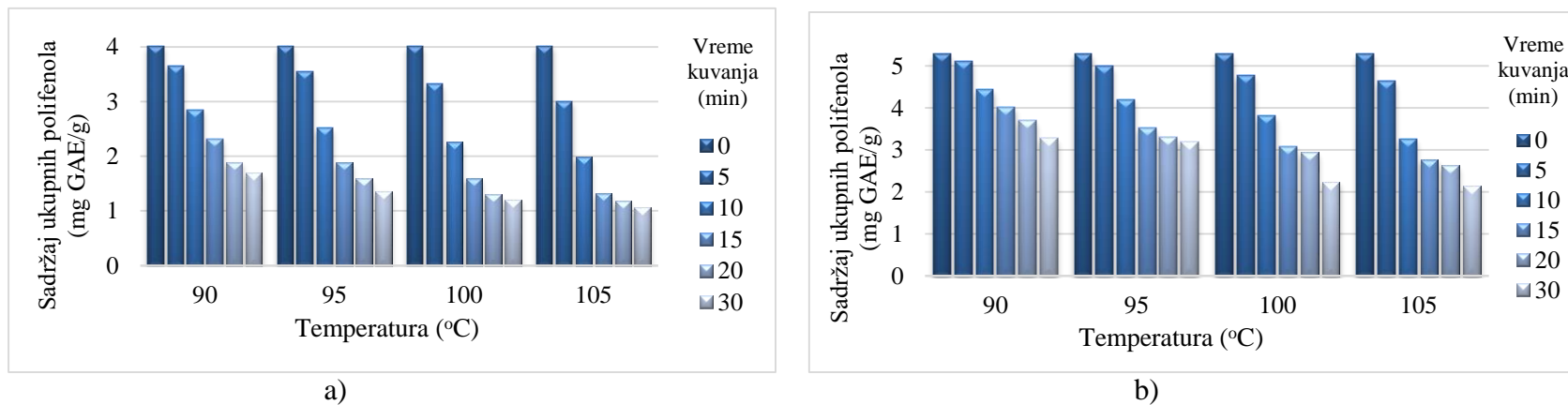
Slika 5.52. Promena sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od kupina sa a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



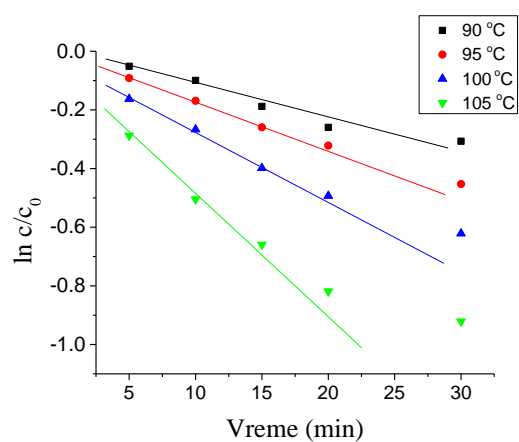
Slika 5.53. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od kupina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera



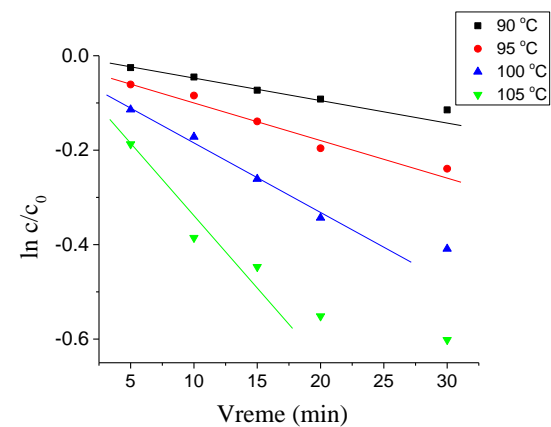
Slika 5.54. Promena sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



Slika 5.55. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

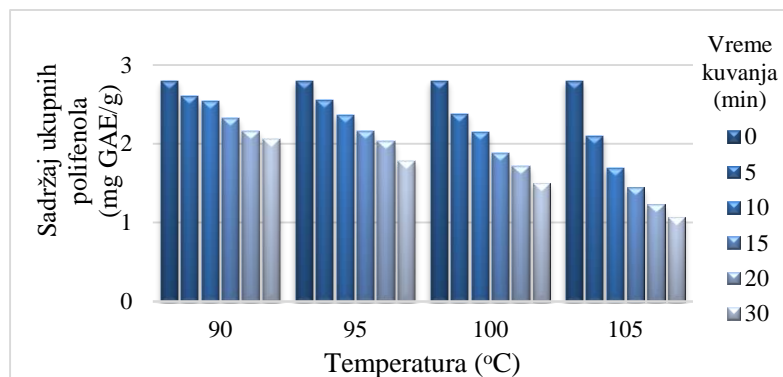


a)

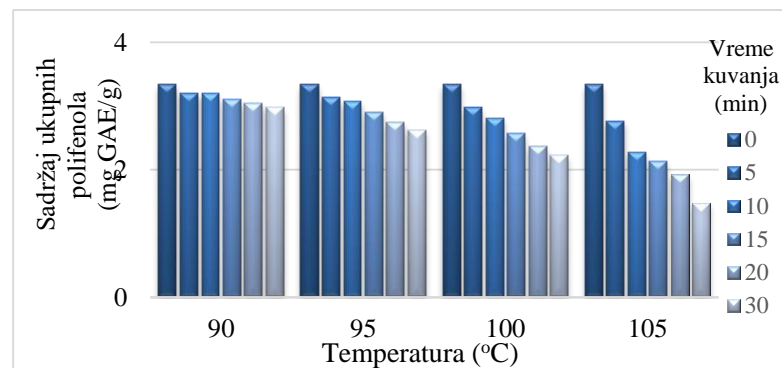


b)

Slika 5.56. Promena sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama

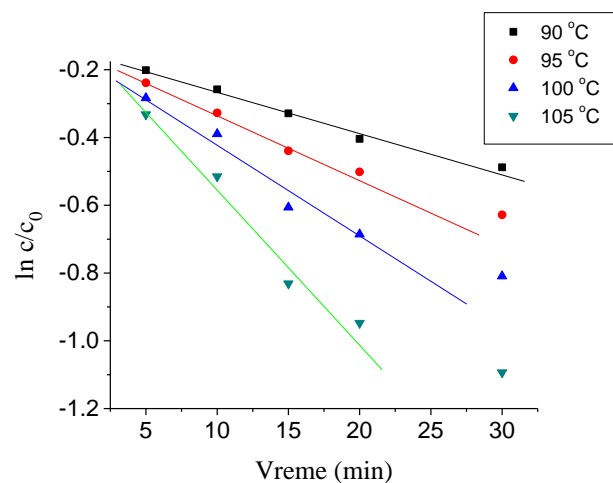


a)

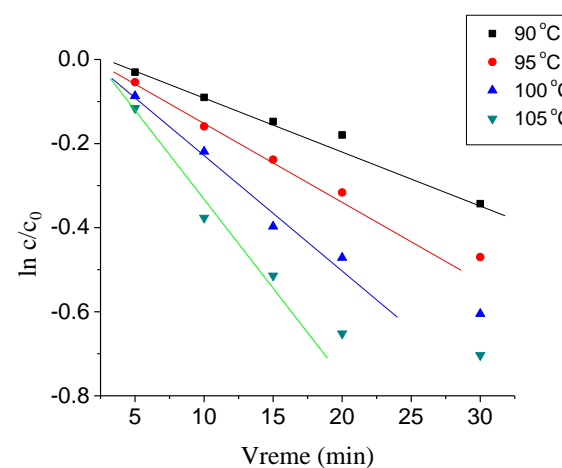


b)

Slika 5.57. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u džemu od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

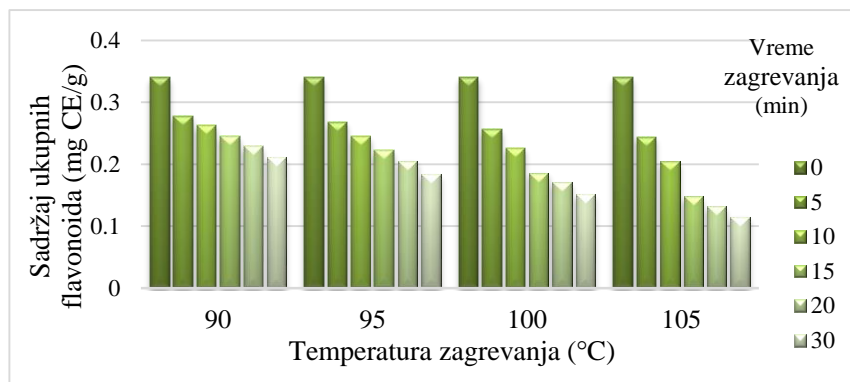


a)

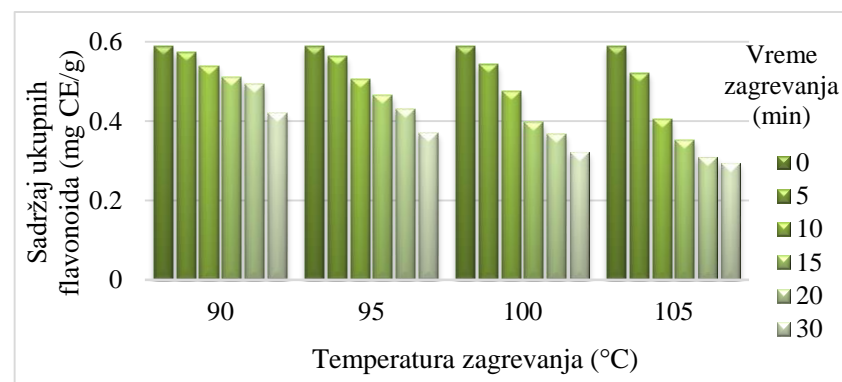


b)

Slika 5.58. Promena sadržaja ukupnih flavonoida u džemu od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama

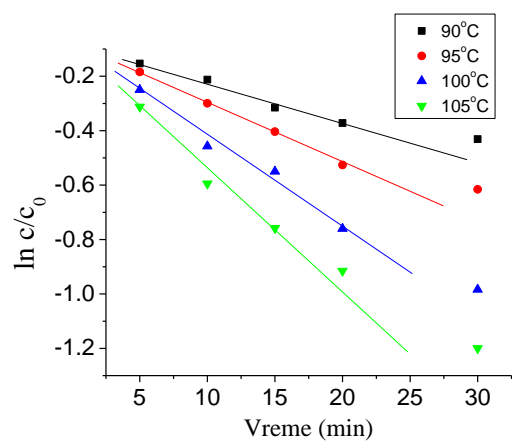


a)

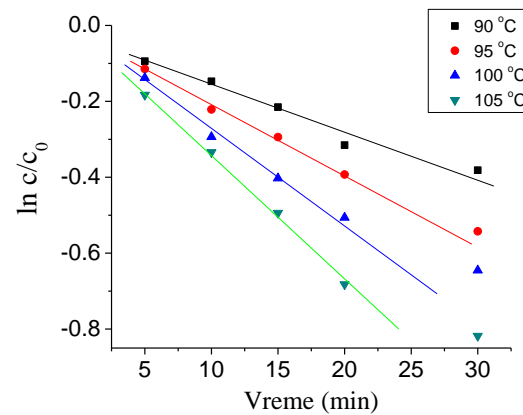


b)

Slika 5.59. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih flavonoida u džemu od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

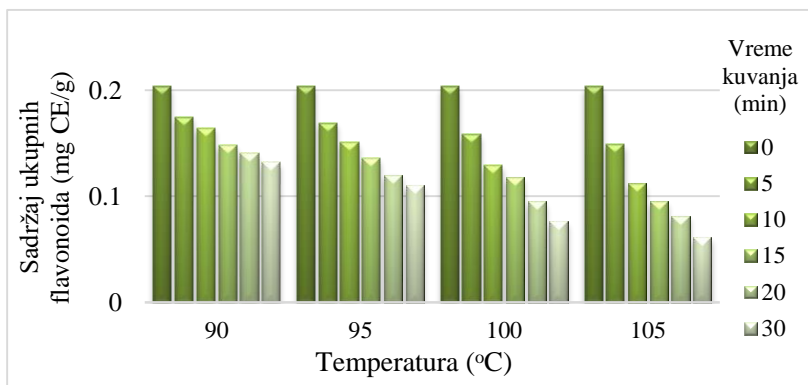


a)

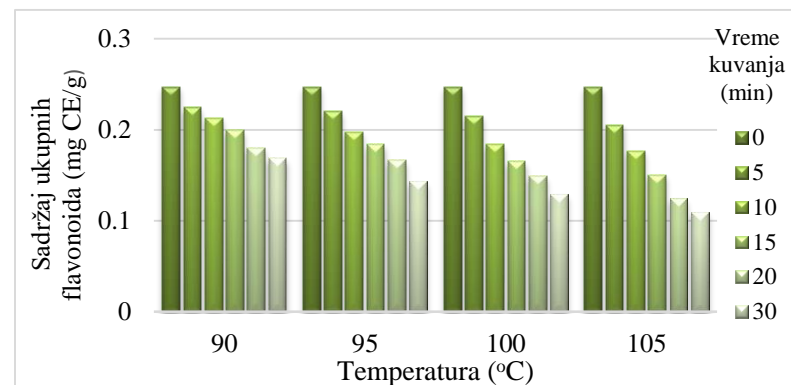


b)

Slika 5.60. Promena sadržaja ukupnih flavonoida u džemu od kupina sa a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama

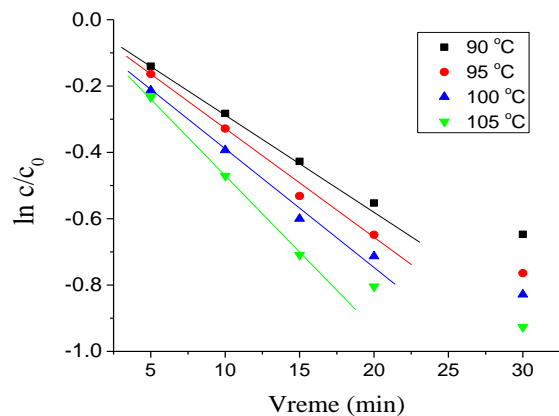


a)

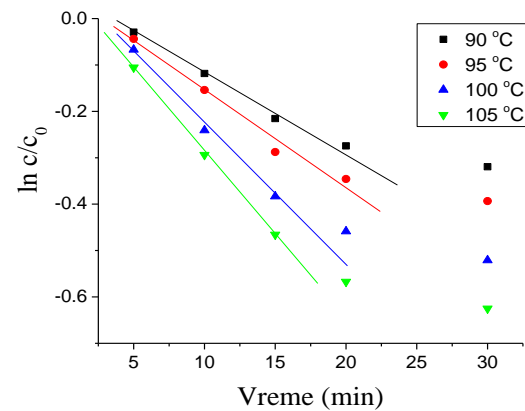


b)

Slika 5.61. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih flavonoida u džemu od kupina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

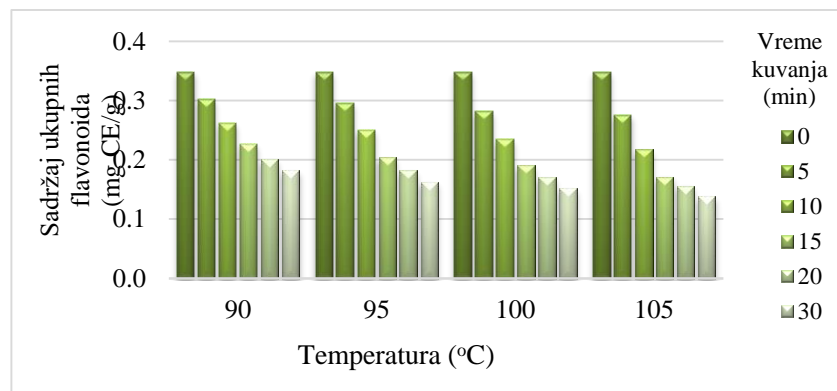


a)

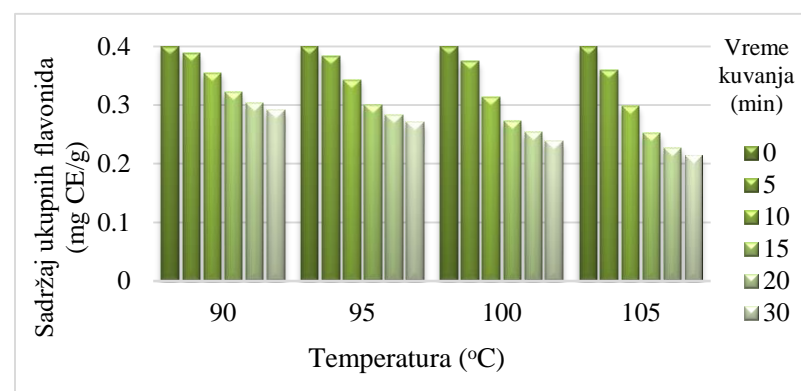


b)

Slika 5.62. Promena sadržaja ukupnih flavonoida u džemu od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama

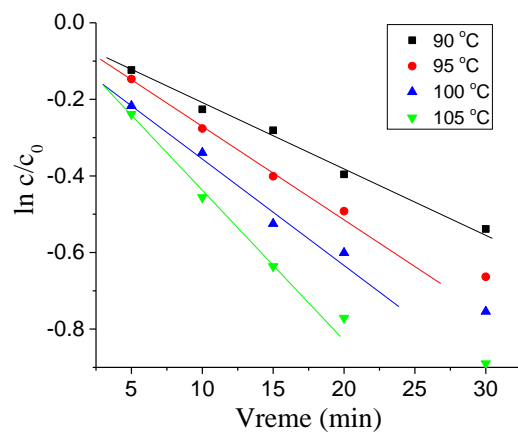


a)

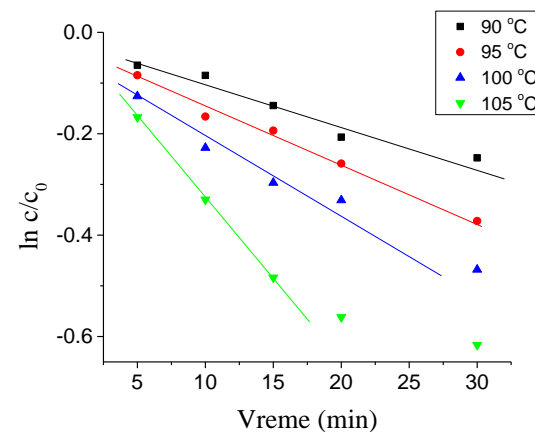


b)

Slika 5.63. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih flavonoida u džemu od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

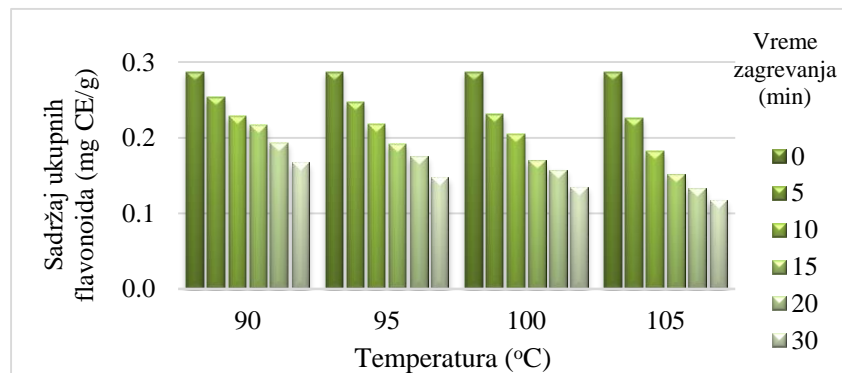


a)

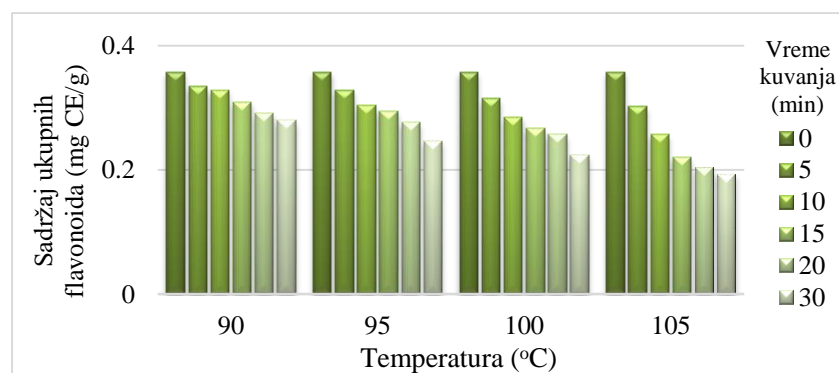


b)

Slika 5.64. Promena sadržaja ukupnih flavonoida u džemu od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



a)



b)

Slika 5.65. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih flavonoida u džemu od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

5.5.2. Termička degradacija ukupnih antocijana

Rezultati određivanja ukupnih antocijana u džemovima od malina, kupina, borovnica i jagoda su prikazani u tabelama 5.30-5.33. Grafički prikaz promene koncentracije ukupnih monomernih antocijana tokom kuvanja džemova dat je na slikama 5.66.-5.73.

Sadržaj ukupnih antocijana se smanjuje sa porastom temperature i dužine kuvanja u obe vrste džema, pri čemu je smanjenje izraženije u džemu sa većim sadržajem šećera. Najmanji gubitak u sadržaju ukupnih antocijana detektovan je nakon 5 minuta kuvanja na 90 °C i iznosi: 27,92% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 6,33% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 32,47% u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 3,47% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 26,40% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 5,16% u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 19,84% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 6,62% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera.

Najveći gubitak u sadržaju ukupnih antocijana detektovan je nakon 30 minuta kuvanja na 105 °C i iznosi 84,42% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 57,76% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 81,38% u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 57,03% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 76,02% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 49,60% u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 82,26% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 54,17% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera.

Na osnovu dobijenih podataka, može se zaključiti da su promene u sadržaju ukupnih monomernih antocijana izraženije u džemovima sa većim sadržajem šećera u poređenju sa džemovima sa manjim sadržajem šećera.

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih monomernih antocijana u svim uzorcima džemova izraženi su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($c_{sr} \pm SD$, $n=3$), dok je početna koncentracija (pre početka kuvanja) označena zvezdicom (*).

Tabela 5.30. Sadržaj ukupnih antocijana u džemovima od malina sa većim i manjim sadržajem šećera

Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem		Džem sa manjim sadržajem	
		šećera		šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg cy-3-glu/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg cy-3-glu/g)	RSD (%)
		0,57±0,01*	1,75	0,69±0,01*	1,45
90	5	0,409±0,003	0,73	0,641±0,006	0,94
	10	0,38±0,01	2,63	0,596±0,008	1,34
	15	0,352±0,006	1,70	0,570±0,008	1,40
	20	0,298±0,003	1,01	0,52±0,01	1,92
	30	0,275±0,006	2,18	0,448±0,005	1,12
95	5	0,390±0,008	2,05	0,612±0,006	0,98
	10	0,336±0,008	2,38	0,560±0,004	0,71
	15	0,302±0,003	0,99	0,525±0,006	1,14
	20	0,239±0,004	1,67	0,466±0,008	1,72
	30	0,189±0,003	1,59	0,411±0,008	1,95
100	5	0,354±0,002	0,56	0,596±0,009	1,51
	10	0,274±0,004	1,46	0,511±0,008	1,57
	15	0,230±0,007	3,04	0,469±0,003	0,64
	20	0,158±0,002	1,27	0,428±0,006	1,40
	30	0,136±0,003	2,21	0,350±0,006	1,71
105	5	0,327±0,004	1,22	0,568±0,006	1,06
	10	0,230±0,005	2,17	0,454±0,006	1,32
	15	0,156±0,001	0,64	0,404±0,002	0,50
	20	0,126±0,001	0,79	0,324±0,004	1,23
	30	0,088±0,001	1,14	0,289±0,003	1,04

Tabela 5.31. Sadržaj ukupnih antocijana u džemovima od kupina sa većim i manjim sadržajem šećera

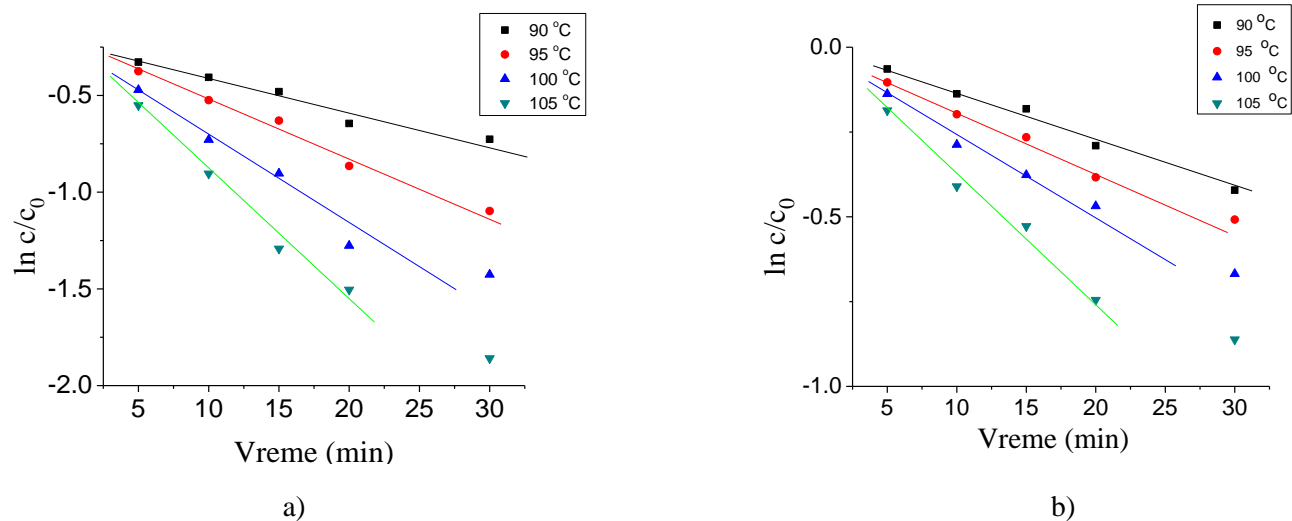
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem		Džem sa manjim sadržajem	
		šećera		šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg cy-3-glu/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg cy-3-glu/g)	RSD (%)
		0,953±0,002*	0,21	1,02±0,01*	0,98
90	5	0,643±0,001	0,15	0,981±0,003	0,31
	10	0,612±0,001	0,16	0,903±0,001	0,11
	15	0,586±0,002	0,34	0,866±0,004	0,46
	20	0,543±0,001	0,18	0,767±0,003	0,39
	30	0,474±0,002	0,42	0,68±0,04	5,88
95	5	0,615±0,003	0,49	0,946±0,002	0,21
	10	0,564±0,003	0,53	0,852±0,001	0,12
	15	0,461±0,002	0,43	0,781±0,002	0,26
	20	0,435±0,000	0,00	0,68±0,01	1,47
	30	0,388±0,002	0,51	0,587±0,003	0,51
100	5	0,573±0,003	0,52	0,904±0,004	0,44
	10	0,470±0,001	0,21	0,784±0,002	0,25
	15	0,354±0,003	0,85	0,684±0,002	0,29
	20	0,320±0,002	0,62	0,631±0,001	0,16
	30	0,271±0,001	0,37	0,54±0,01	1,85
105	5	0,527±0,003	0,57	0,859±0,002	0,23
	10	0,369±0,002	0,54	0,685±0,002	0,29
	15	0,230±0,003	1,30	0,580±0,003	0,52
	20	0,203±0,003	1,48	0,51±0,01	1,96
	30	0,177±0,002	1,13	0,437±0,002	0,46

Tabela 5.32. Sadržaj ukupnih antocijana u džemovima od borovnica sa većim i manjim sadržajem šećera

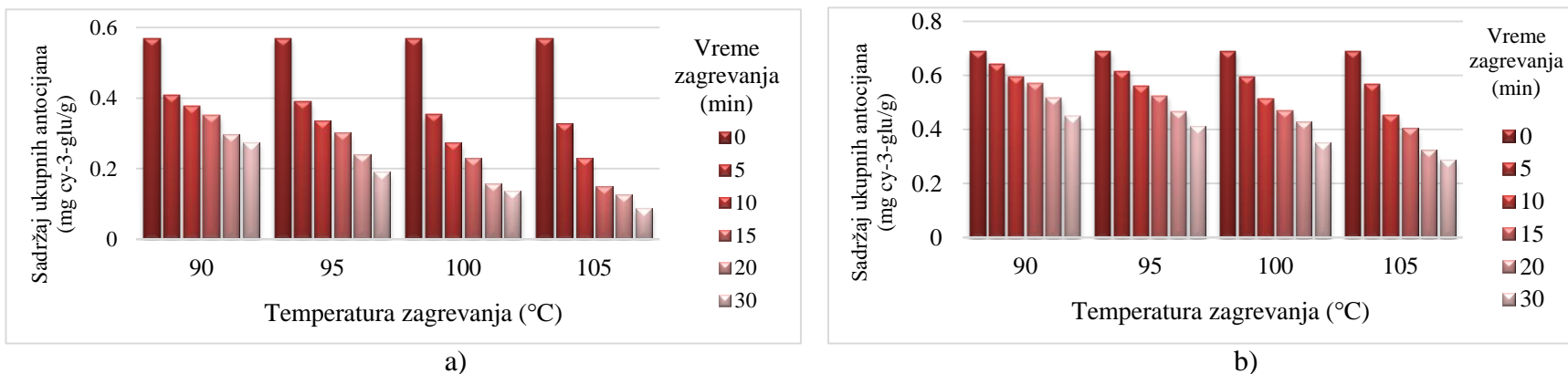
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD^*$	RSD
		(mg cy-3-glu/g)		(mg cy-3-glu/g)	(%)
		1,88±0,01*	0,53	2,41±0,02*	0,83
90	5	1,39±0,01	0,72	2,28±0,02	0,88
	10	1,26±0,01	0,79	2,14±0,04	1,87
	15	1,16±0,02	1,72	1,98±0,02	1,01
	20	1,07±0,01	0,93	1,83±0,02	1,09
	30	0,93±0,01	1,07	1,63±0,05	3,07
95	5	1,33±0,01	0,75	2,21±0,06	2,71
	10	1,11±0,01	0,90	2,01±0,03	1,49
	15	0,98±0,02	2,04	1,79±0,06	3,35
	20	0,86±0,02	2,32	1,64±0,03	1,83
	30	0,72±0,01	1,39	1,44±0,04	2,78
100	5	1,20±0,02	1,67	2,12±0,05	2,36
	10	0,99±0,02	2,02	1,85±0,08	4,32
	15	0,81±0,02	2,47	1,68±0,04	2,38
	20	0,73±0,01	1,37	1,51±0,02	1,32
	30	0,61±0,01	1,64	1,35±0,02	1,48
105	5	1,11±0,01	0,90	2,04±0,03	1,47
	10	0,84±0,01	1,19	1,73±0,01	0,58
	15	0,64±0,01	1,56	1,46±0,02	1,37
	20	0,53±0,01	1,87	1,30±0,02	1,54
	30	0,45±0,01	2,22	1,21±0,01	0,83

Tabela 5.33. Sadržaj ukupnih antocijana u džemovima od jagoda sa većim i manjim sadržajem šećera

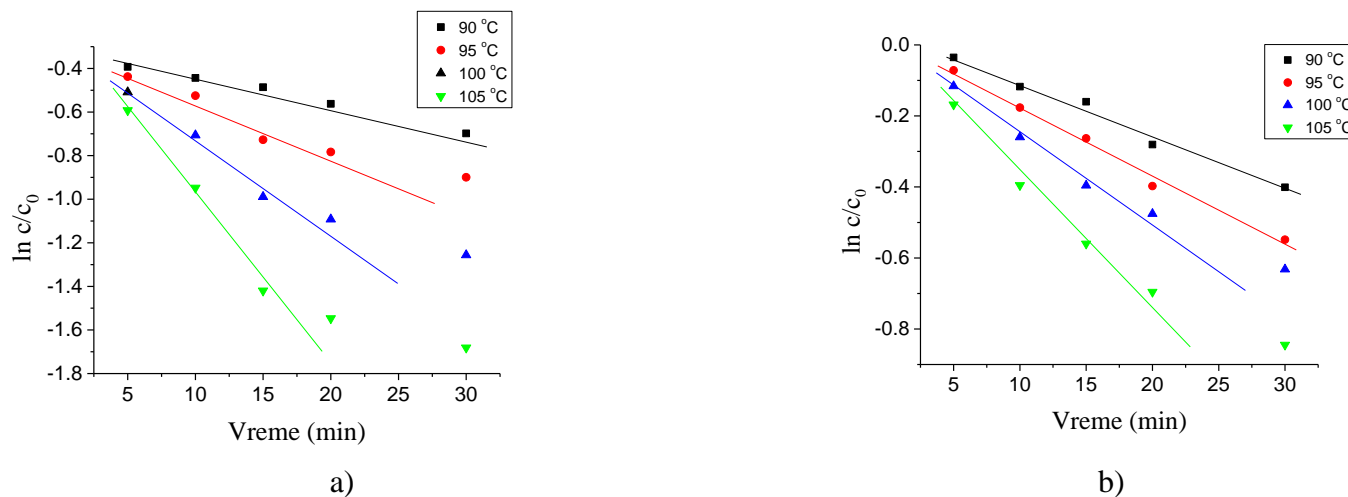
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg cy-3-glu/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg cy-3-glu/g)	RSD (%)
		0,48±0,01*	1,37	0,641±0,002*	0,35
90	5	0,39±0,02	6,27	0,60±0,02	2,77
	10	0,357±0,004	1,13	0,57±0,01	2,00
	15	0,32±0,01	1,80	0,51±0,01	2,11
	20	0,28±0,01	2,23	0,48±0,02	3,28
	30	0,22±0,01	4,94	0,42±0,02	5,78
95	5	0,37±0,02	6,55	0,58±0,04	6,65
	10	0,33±0,01	3,83	0,524±0,005	0,88
	15	0,30±0,01	3,90	0,48±0,02	4,72
	20	0,24±0,01	5,33	0,429±0,001	0,24
	30	0,19±0,01	2,99	0,37±0,02	6,07
100	5	0,35±0,01	3,26	0,57±0,01	1,77
	10	0,29±0,01	4,83	0,50±0,02	3,43
	15	0,25±0,02	6,27	0,45±0,04	8,13
	20	0,20±0,01	5,29	0,40±0,02	5,20
	30	0,14±0,01	4,96	0,32±0,01	3,85
105	5	0,321±0,004	1,39	0,524±0,007	1,33
	10	0,25±0,01	2,52	0,45±0,03	7,57
	15	0,16±0,01	6,28	0,40±0,02	6,23
	20	0,12±0,01	6,21	0,35±0,03	8,37
	30	0,09±0,01	7,07	0,29±0,01	4,14



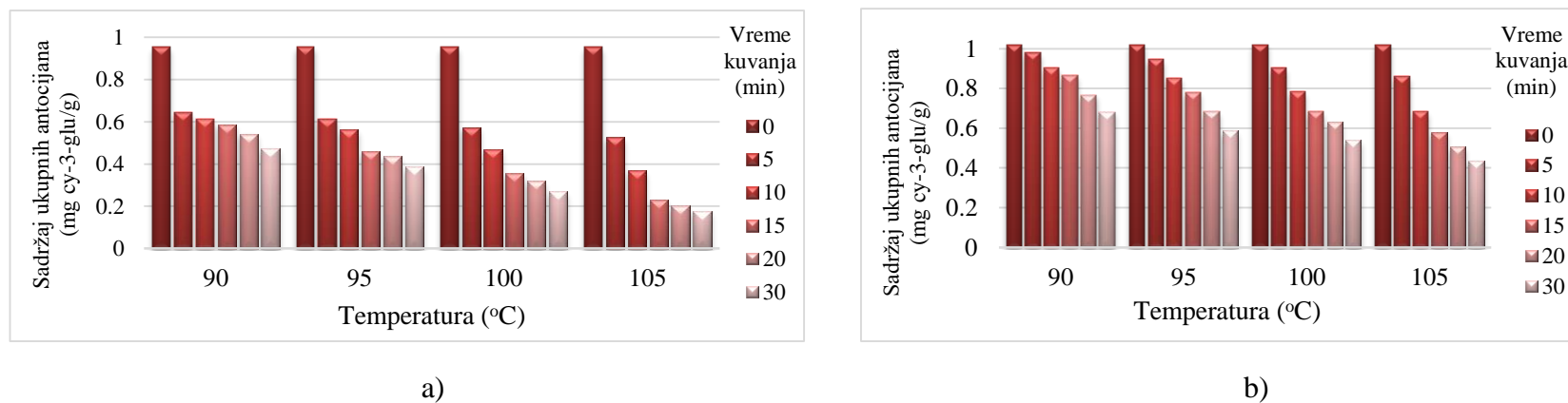
Slika 5.66. Promena sadržaja ukupnih antocijana u džemu od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



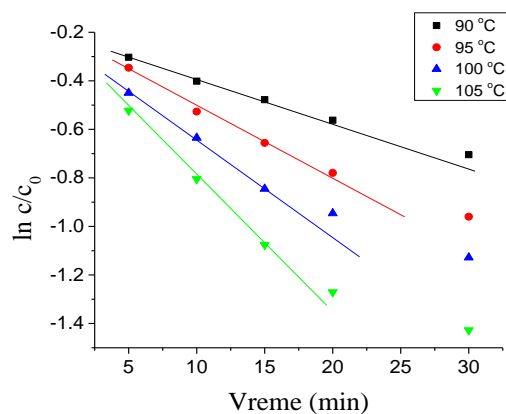
Slika 5.67. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih antocijana u džemu od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera



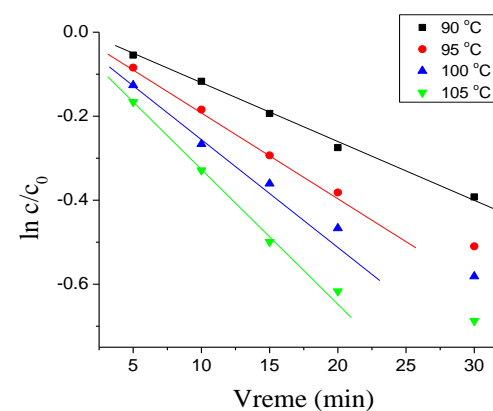
Slika 5.68. Promena sadržaja ukupnih antocijana u džemu od kupina sa a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



Slika 5.69. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih antocijana u džemu od kupina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

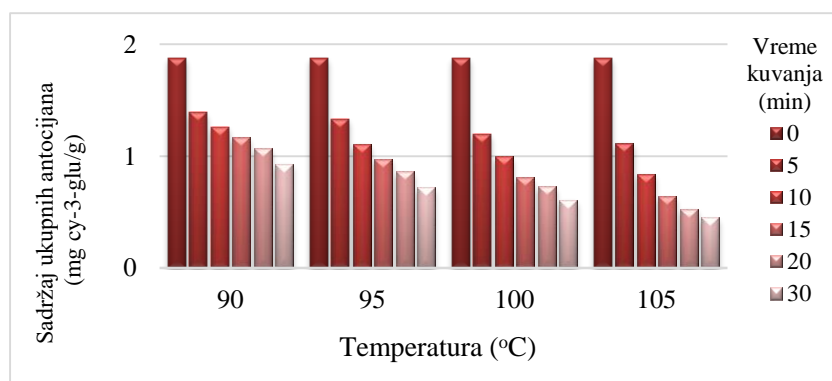


a)

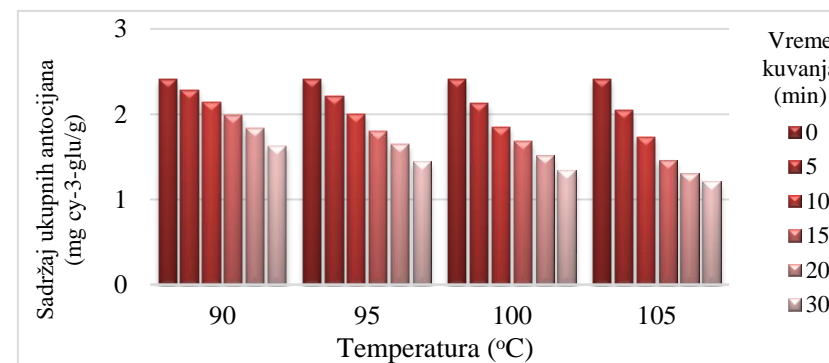


b)

Slika 5.70. Promena sadržaja ukupnih antocijana u džemu od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama

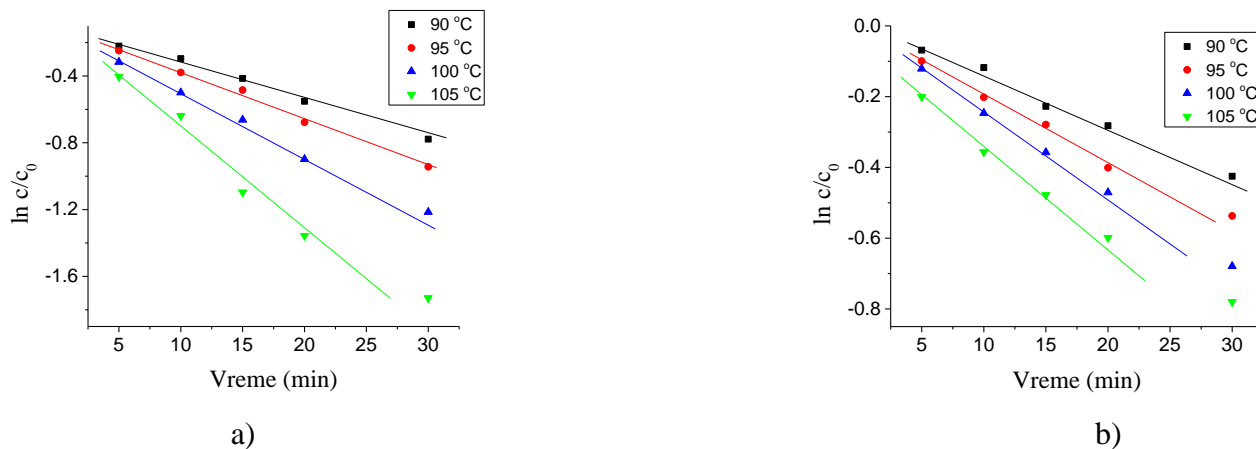


a)

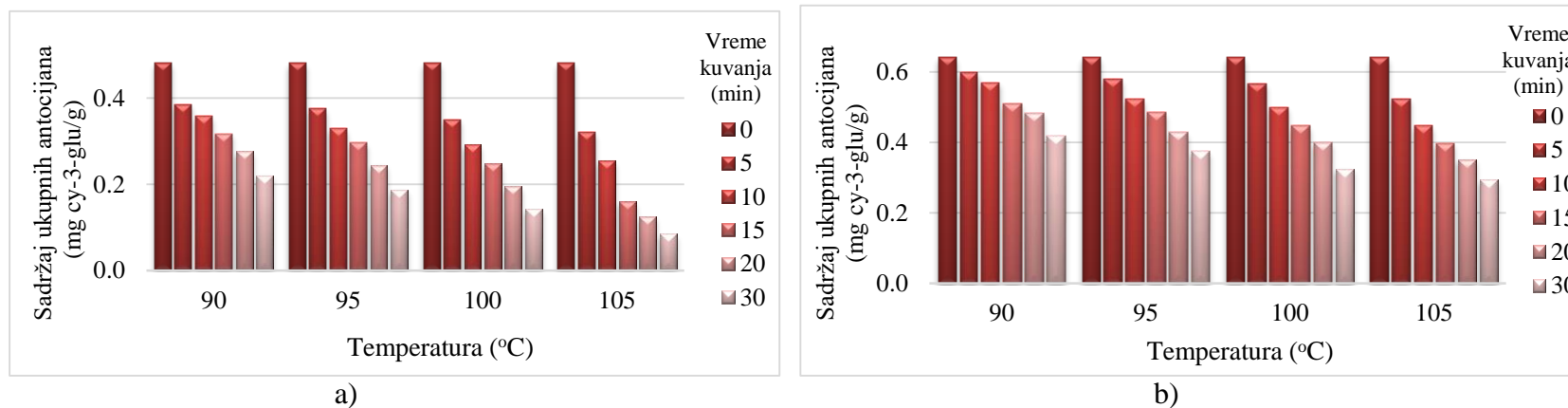


b)

Slika 5.71. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih antocijana u džemu od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera



Slika 5.72. Promena sadržaja ukupnih antocijana u džemu od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



Slika 5.73. Uticaj temperature i vremena kuvanja na sadržaj ukupnih antocijana u džemu od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

Kinetički parametri reakcije degradacije ukupnih monomernih antocijana tokom kuvanja džemova od malina, kupina, borovnica i jagoda dati su u tabelama 5.34.-5.37.

Brzina reakcije degradacije antocijana raste sa porastom temperature i vremena kuvanja džemova i sledi reakciju prvog reda. Kinetička jednačina reakcije prvog reda je data sledećim izrazom 5.1. (*Kirca i Cemeroğlu, 2003; Harbourne i sar., 2008*):

$$c = c_0 e^{-kt} \quad (5.1.)$$

gde je:

c – koncentracija ukupnih monomernih antocijana nakon vremena t (mg/g), c_0 – početna koncentracija ukupnih monomernih antocijana (mg/g), t – vreme trajanja reakcije (min), k – konstanta brzine reakcije prvog reda (min^{-1}).

Arenijusova jednačina (5.2) pokazuje uticaj temperature na konstantu brzine hemijske reakcije:

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (5.2)$$

gde je: A – predeksponencijalni faktor (s^{-1}), E_a – energija aktivacije (kJ/mol), R – univerzalna gasna konstanta (8,314 J/molK), T – apsolutna temperatura (K).

Iz grafičke zavisnosti $\ln(c/c_0) = f(t)$, na osnovu nagiba datih pravih (slika 5.62a-d) izračunate su konstante brzine reakcije degradacije. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije, ($0,9410 < r^2 < 0,9895$ za džem od malina, $0,9009 < r^2 < 0,9891$ za džem od kupina, $0,9724 < r^2 < 0,9978$ za džem od borovnica i $0,9601 < r^2 < 0,9984$ za džem od jagoda), takođe idu u prilog tvrdnji da je u pitanju reakcija prvog reda (tabele 5.34.-5.37).

Vreme poluraspada ($t_{1/2}$) je vreme potrebno da se za polovinu smanji početna koncentracija antocijana i izračunato je prema jednačini (5.3):

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k} \quad (5.3)$$

U džemovima sa većom količinom šećera zapaženo je približno dvostruko smanjenje vremena poluraspada antocijana i skoro dvostruko povećanje konstante brzine reakcije degradacije. Vreme poluraspada antocijana, $t_{1/2}$, u džemovima sa manjim sadržajem šećera kreće se od 12,9 minuta do 28,4 minuta, dok je kod džemova sa većim sadržajem šećera u opsegu od 5,9 minuta do 15,9 minuta.

Zavisnost logaritma konstante brzine reakcije od temperature kuvanja džemova od malina, kupina, borovnica i jagoda sa većim i manjim sadržajem šećera grafički je prikazana na slici 5.74.

Energija aktivacije za reakcije degradacije ukupnih monomernih antocijana izračunate su iz logaritamskog oblika Arenijusove jednačine, a na osnovu nagiba datih pravih (slika 5.62) i iznose 68,9 kJ/mol u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 53,6 kJ/mol u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 57,4 kJ/mol u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 48,0 kJ/mol u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 51,0 kJ/mol u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 40,0 kJ/mol u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 61,0 kJ/mol u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 47,0 kJ/mol u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera.

Viša vrednost energije aktivacije reakcije degradacije ukupnih antocijana u džemovima sa većim sadržajem šećera ukazuje na činjenicu da je degradacija ukupnih antocijana u ovoj vrsti džema osetljivija na temperaturne promene u odnosu na džemove sa manjim sadržajem šećera.

Dobijene vrednosti energija aktivacije reakcije degradacije ukupnih monomernih antocijana u džemovima su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji se odnose na termalnu degradaciju antocijana iz zove i crne ribizle (56 kJ/mol i 50 kJ/mol) (*Dyrby i sar.*, 2001), kao i na termalnu degradaciju antocijana u soku i koncentratu od kupine (65,06 kJ/mol i 75,5 kJ/mol) (*Wang i Xu*, 2007). Takođe, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja *De Rosso i Mercandante* (2007), gde je pokazano da dodatak šećera ima negativan uticaj na stabilnost antocijana iz tropskog voća. Pionirski rad *Meschter-a* (1953) je pokazao da šećeri i degradacioni produkti šećera ubrzavaju degradaciju pigmenata jagode.

Tabela 5.34. Uticaj temperature kuvanja na vrednost konstante brzine (k), vremena poluraspada ($t_{1/2}$) i energije aktivacije (E_a) degradacije ukupnih monomernih antocijana u uzorcima džema od malina sa većim i manjim sadržajem šećera

Džem od malina sa većim sadržajem šećera				
Temperatura (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	4,5±0,1	0,9410	15,3	68±1
95	6,8±0,1	0,9835	10,1	
100	8,9±0,3	0,9678	7,8	
105	11,6±0,2	0,9799	5,9	
Džem od malina sa manjim sadržajem šećera				
Temperatura (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	2,6±0,2	0,9871	26,3	54±2
95	3,2±0,1	0,9862	21,8	
100	4,2±0,1	0,9895	16,6	
105	5,4±0,2	0,9802	12,9	

Tabela 5.35. Uticaj temperature kuvanja na vrednost konstante brzine (k), vremena poluraspada ($t_{1/2}$) i energije aktivacije (E_a) degradacije ukupnih monomernih antocijana u uzorcima džema od kupina sa većim i manjim sadržajem šećera

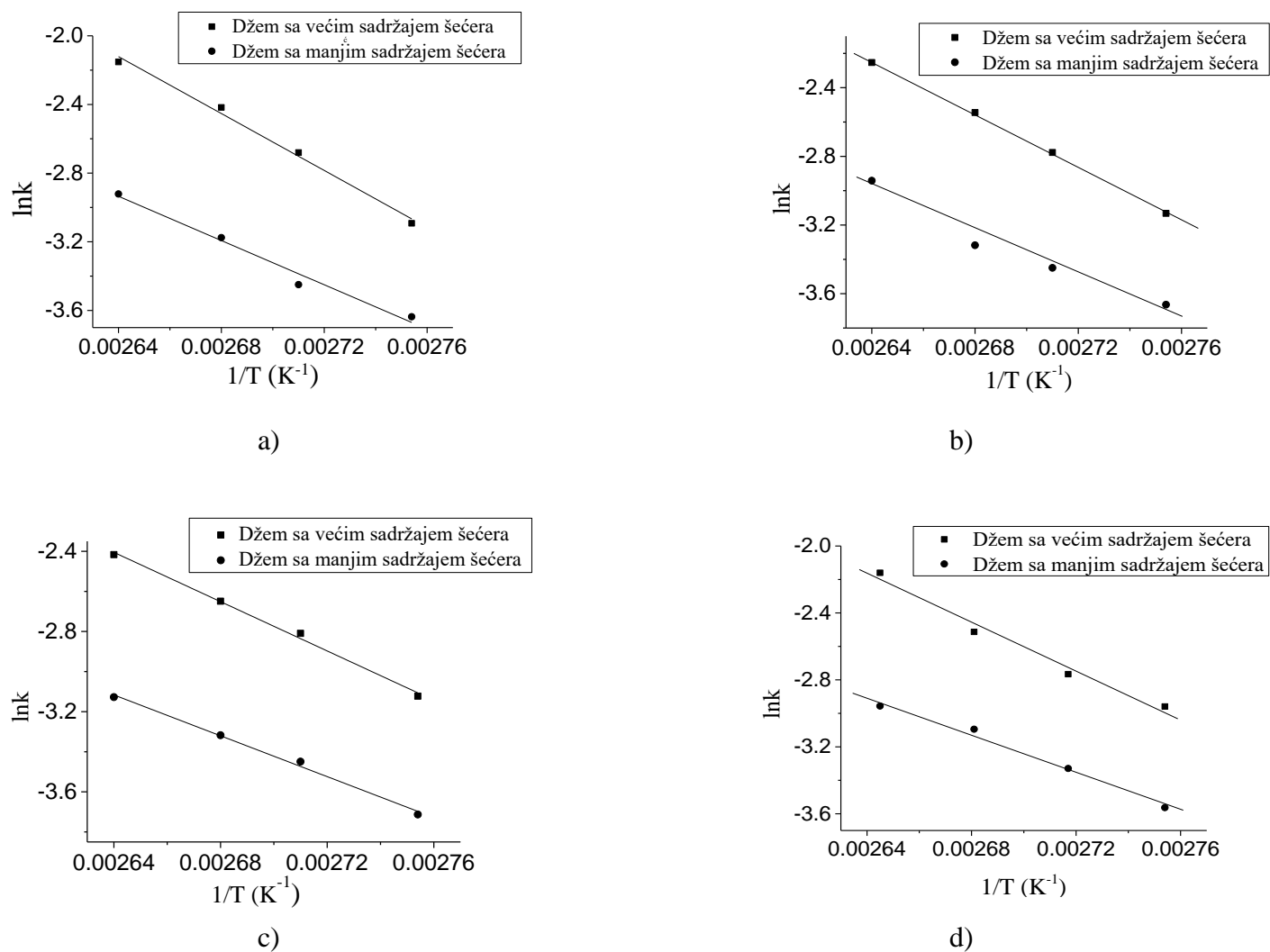
Džem od kupina sa većim sadržajem šećera				
Temperatura (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	4,4±0,2	0,9868	15,9	57,4±0,5
95	5,6±0,1	0,9077	12,3	
100	7,9±0,2	0,9009	8,8	
105	10,5±0,5	0,9386	6,6	
Džem od kupina sa manjim sadržajem šećera				
Temperatura (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	2,5±0,4	0,9813	27,7	48±1
95	3,4±0,2	0,9891	20,2	
100	3,9±0,3	0,9649	17,6	
105	5,3±0,5	0,9256	13,1	

Tabela 5.36. Uticaj temperature kuvanja na vrednost konstante brzine (k), vremena poluraspada ($t_{1/2}$) i energije aktivacije (E_a) degradacije ukupnih monomernih antocijana u uzorcima džema od borovnica sa većim i manjim sadržajem šećera

Džem od borovnica sa većim sadržajem šećera				
Temperatura (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	4,4±0,3	0,9948	15,7	51±1
95	6,0±0,3	0,9857	11,5	
100	7,1±0,5	0,9724	9,8	
105	8,9±0,4	0,9908	7,8	
Džem od borovnica sa manjim sadržajem šećera				
Temperatura (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	2,4±0,1	0,9947	28,4	40±1
95	3,2±0,2	0,9978	21,8	
100	3,6±0,1	0,9889	19,1	
105	4,3±0,2	0,9904	16,2	

Tabela 5.37. Uticaj temperature kuvanja na vrednost konstante brzine (k), vremena poluraspada ($t_{1/2}$) i energije aktivacije (E_a) degradacije ukupnih monomernih antocijana u uzorcima džema od jagoda sa većim i manjim sadržajem šećera

Džem od jagoda sa većim sadržajem šećera				
Temperatura (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	5,2±0,1	0,9881	13,4	61±3
95	6,3±0,1	0,9925	11,0	
100	8,1±0,1	0,9953	8,6	
105	11,5±0,3	0,9601	6,0	
Džem od jagoda sa manjim sadržajem šećera				
Temperature (°C)	$k \times 10^2$ (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	E_a (kJ/mol)
90	2,8±0,1	0,9881	24,5	47±1
95	3,6±0,1	0,9877	19,3	
100	4,5±0,2	0,9984	15,3	
105	5,2±0,1	0,9832	13,3	



Slika 5.74. Zavisnost logaritma konstante brzine degradacije ukupnih monomernih antocijana od recipročne vrednosti temperature u džemovima od: a) malina, b) kupina, c) borovnica i d) jagoda sa većim i manjim sadržajem šećera

5.5.3. Uticaj zagrevanja na antioksidativnu aktivnost džemova

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti džemova od malina, kupina, borovnica i jagoda prikazani su u tabelama 5.38-5.41., a izraženi su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($c_{sr} \pm SD$, $n=3$). Antioksidativna aktivnost uzoraka džemova pre početka zagrevanja označena je zvezdicom (*). Grafički prikaz promene antioksidativne aktivnosti tokom kuvanja džemova prikazan je na slikama 5.75-5.82.

Antioksidativna aktivnost džemova sa manjim sadržajem šećera veća je u odnosu na džemove sa većim sadržajem šećera, što je u skladu sa sadržajem ukupnih flavonoida i antocijana u ovim proizvodima.

Najmanji gubitak antioksidativne aktivnosti uočava se nakon 5 minuta kuvanja na 90 °C i iznosi 14,02% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 9,21% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 10,46% u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 8,29% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 9,98% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 5,69% u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 3,83% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 2,00% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera.

Sa porastom temperature i dužine kuvanja antioksidativna aktivnost opada. Najveći gubitak antioksidativne aktivnosti je nakon 30 minuta kuvanja na 105 °C i iznosi 67,03% u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 39,95% u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 68,64% u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 35,19% u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 68,64% u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 38,58% u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 60,69% u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 46,69% u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera.

Dobijeni rezultati koji se odnose na smanjenje sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana, kao i na smanjenje antioksidativne aktivnosti džemova su u saglasnosti sa podacima iz literature. U radu *Rababah i saradnika* (2011) pokazano je da pripremanje džemova i skladištenje u toku pet meseci uzrokuje smanjenje sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih antocijana, kao i antioksidativne aktivnosti džemova od jagoda, višanja, kajsija, smokava i narandži. U studiji *Garcia-Viguera i saradnika* (1998) zabeleženo je smanjenje sadržaja ukupnih antocijana do 40% prilikom pripreme džema od crvenih malina. Prilikom kuvanja džema od jagode duže od 15 minuta, dolazi do smanjenja u sadržaju ukupnih antocijana do 80% (*Garcia-Viguera i Zafrilla*, 2001).

Tabela 5.38. Antioksidativna (DPPH) aktivnost džemova od malina sa većim i manjim sadržajem šećera

Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)
				3,27±0,03*	0,92
90	5	2,81±0,01	0,36	3,71±0,03	0,81
	10	2,54±0,02	0,79	3,62±0,01	0,28
	15	2,39±0,03	1,26	3,55±0,01	0,28
	20	2,08±0,04	1,92	3,37±0,01	0,30
	30	1,88±0,02	1,06	3,17±0,01	0,32
95	5	2,73±0,01	0,37	3,66±0,01	0,27
	10	2,35±0,02	0,85	3,52±0,01	0,28
	15	2,15±0,02	0,93	3,40±0,01	0,29
	20	1,74±0,03	1,72	3,12±0,01	0,32
	30	1,53±0,01	0,65	2,94±0,01	0,34
100	5	2,58±0,03	1,16	3,59±0,01	0,29
	10	2,13±0,01	0,47	3,38±0,01	0,30
	15	1,70±0,01	0,59	3,18±0,01	0,31
	20	1,58±0,05	3,16	2,85±0,01	0,35
	30	1,33±0,02	1,50	2,73±0,02	0,73
105	5	2,44±0,04	1,71	3,55±0,01	0,28
	10	1,99±0,03	1,24	3,13±0,03	0,96
	15	1,48±0,04	2,68	2,81±0,01	0,36
	20	1,25±0,04	3,39	2,63±0,02	0,76
	30	1,08±0,04	4,00	2,45±0,02	0,82

Tabela 5.39. Antioksidativna (DPPH) aktivnost džemova od kupina sa većim i manjim sadržajem šećera

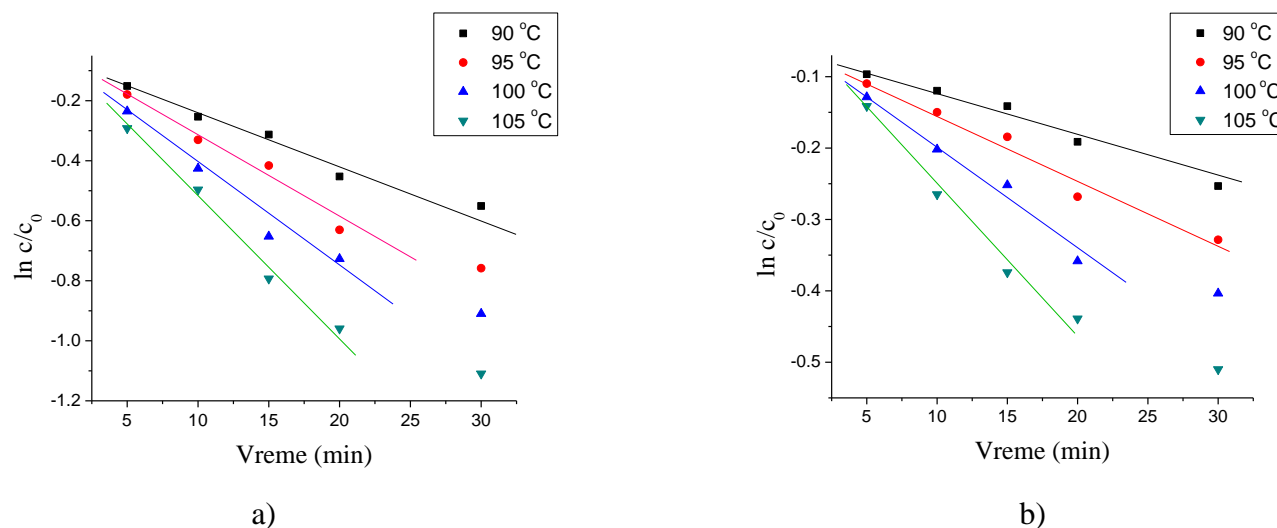
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)
		0,426±0,005*	1,17	0,326±0,001*	0,31
90	5	0,38±0,02	5,26	0,299±0,002	0,67
	10	0,337±0,008	2,37	0,296±0,003	1,01
	15	0,307±0,000	0,0	0,29±0,01	3,45
	20	0,263±0,006	2,54	0,281±0,002	0,71
	30	0,210±0,005	2,38	0,27±0,01	3,70
95	5	0,37±0,01	2,70	0,296±0,003	1,01
	10	0,314±0,005	1,59	0,287±0,001	0,35
	15	0,280±0,009	3,21	0,283±0,001	0,35
	20	0,233±0,003	1,29	0,272±0,003	1,10
	30	0,178±0,001	0,56	0,257±0,001	0,39
100	5	0,357±0,003	0,84	0,290±0,002	0,69
	10	0,3±0,0	0,00	0,280±0,002	0,71
	15	0,244±0,004	1,64	0,271±0,005	1,85
	20	0,206±0,002	0,97	0,26±0,01	3,84
	30	0,2±0,0	0,0	0,236±0,003	1,27
105	5	0,342±0,003	0,88	0,286±0,005	1,75
	10	0,247±0,007	2,83	0,268±0,001	0,37
	15	0,200±0,003	1,50	0,247±0,002	0,81
	20	0,164±0,003	1,83	0,241±0,002	0,83
	30	0,134±0,004	2,98	0,211±0,005	2,37

Tabela 5.40. Antioksidativna (DPPH) aktivnost džemova od borovnica sa većim i manjim sadržajem šećera

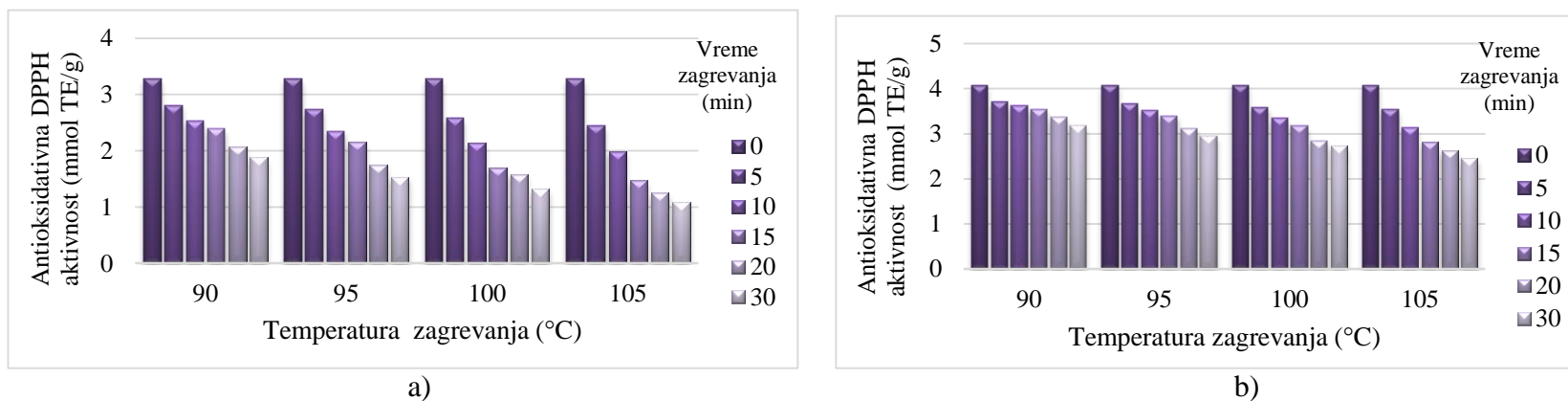
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD^*$ (mmol TE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)
				$3,01 \pm 0,05^*$	1,66
90	5	$2,71 \pm 0,03$	1,11	$3,35 \pm 0,07$	2,09
	10	$2,38 \pm 0,01$	0,42	$3,30 \pm 0,04$	1,21
	15	$2,14 \pm 0,01$	0,47	$3,24 \pm 0,06$	1,85
	20	$1,86 \pm 0,04$	2,15	$3,18 \pm 0,02$	0,63
	30	$1,48 \pm 0,02$	1,35	$3,08 \pm 0,03$	0,97
95	5	$2,63 \pm 0,07$	2,66	$3,32 \pm 0,08$	2,41
	10	$2,22 \pm 0,02$	0,90	$3,25 \pm 0,04$	1,23
	15	$1,99 \pm 0,04$	2,01	$3,12 \pm 0,01$	0,32
	20	$1,65 \pm 0,02$	1,21	$3,05 \pm 0,01$	0,33
	30	$1,26 \pm 0,02$	1,59	$2,85 \pm 0,04$	1,40
100	5	$2,56 \pm 0,06$	2,34	$3,28 \pm 0,02$	0,61
	10	$1,97 \pm 0,02$	1,01	$3,18 \pm 0,03$	0,94
	15	$1,67 \pm 0,03$	1,80	$3,05 \pm 0,02$	0,66
	20	$1,39 \pm 0,02$	1,44	$2,91 \pm 0,04$	1,37
	30	$1,11 \pm 0,06$	5,40	$2,68 \pm 0,03$	1,12
105	5	$2,47 \pm 0,02$	0,81	$3,20 \pm 0,03$	0,94
	10	$1,77 \pm 0,01$	0,56	$3,08 \pm 0,05$	1,62
	15	$1,37 \pm 0,01$	0,73	$2,92 \pm 0,03$	1,03
	20	$1,16 \pm 0,02$	1,72	$2,76 \pm 0,03$	1,09
	30	$0,95 \pm 0,01$	1,05	$2,23 \pm 0,06$	2,69

Tabela 5.41. Antioksidativna (DPPH) aktivnost džemova od jagoda sa većim i manjim sadržajem šećera

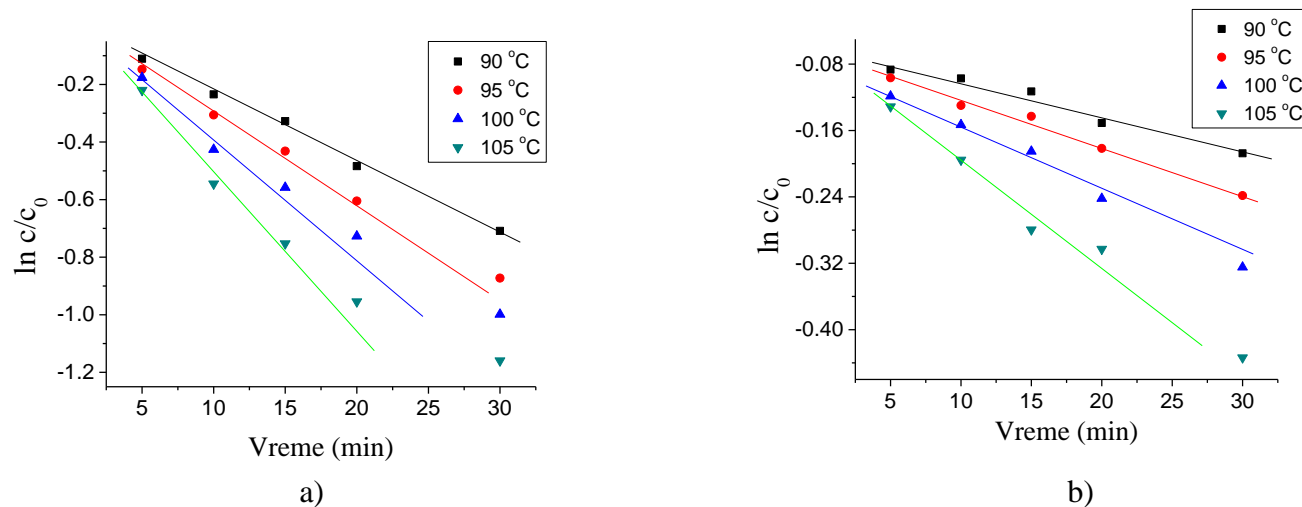
Temperatura (°C)	Vreme kuvanja (min)	Džem sa većim sadržajem šećera		Džem sa manjim sadržajem šećera	
		$c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mmol TE/g)	RSD (%)
				2,20±0,07*	3,34
90	5	2,119±0,003	0,15	2,82±0,09	3,02
	10	2,04±0,04	1,91	2,75±0,03	0,96
	15	1,9±0,1	5,01	2,60±0,02	0,58
	20	1,80±0,05	2,58	2,54±0,02	0,90
	30	1,63±0,03	1,76	2,46±0,07	2,92
95	5	2,04±0,05	2,39	2,71±0,05	1,75
	10	1,87±0,07	3,65	2,60±0,03	1,18
	15	1,76±0,09	4,86	2,40±0,02	0,81
	20	1,65±0,03	1,55	2,26±0,07	2,93
	30	1,33±0,05	3,43	2,15±0,09	4,27
100	5	1,91±0,06	3,01	2,58±0,07	2,82
	10	1,72±0,09	5,43	2,31±0,02	0,86
	15	1,603±0,003	0,17	2,1±0,1	5,58
	20	1,39±0,01	1,00	1,97±0,2	8,33
	30	1,11±0,06	5,10	1,79±0,01	0,53
105	5	1,86±0,05	2,92	2,40±0,06	2,59
	10	1,62±0,06	4,00	2,08±0,06	2,65
	15	1,28±0,06	5,05	1,97±0,04	2,09
	20	1,15±0,02	1,39	1,76±0,04	2,01
	30	0,87±0,01	1,52	1,53±0,06	3,78



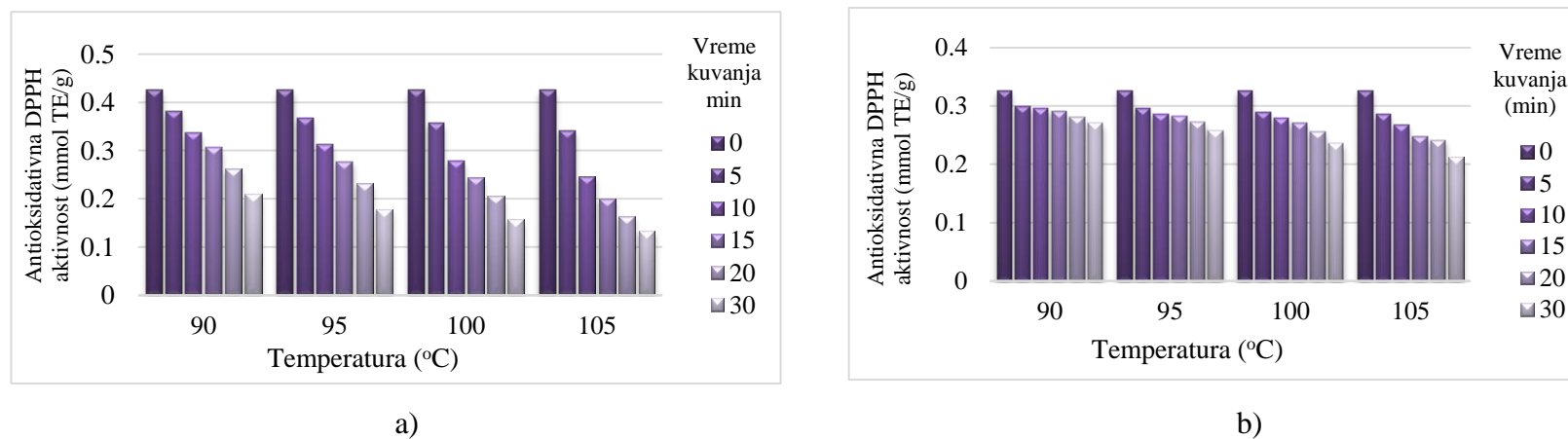
Slika 5.75. Promena antioksidativne DPPH aktivnosti džema od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



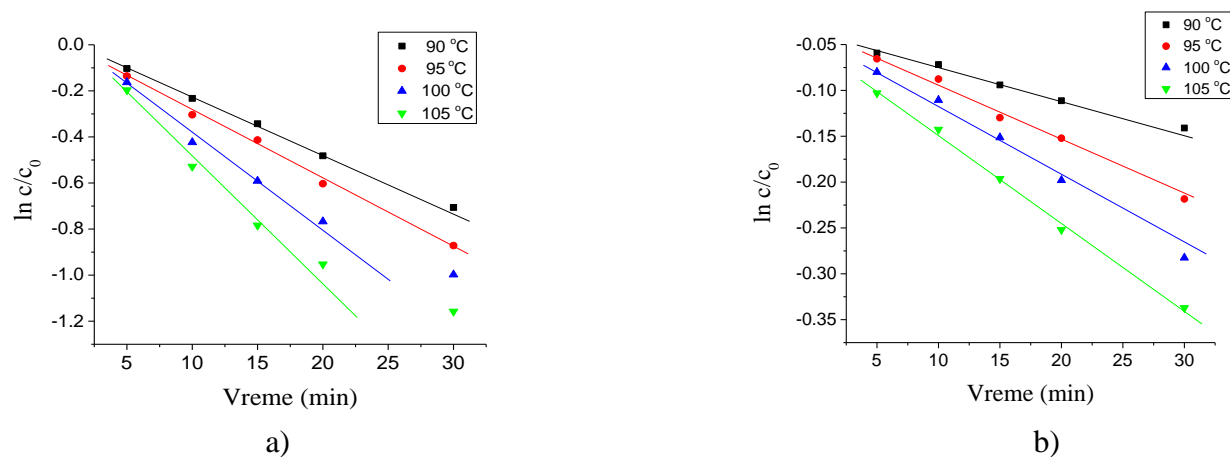
Slika 5.76. Uticaj temperature i vremena kuvanja na antioksidativnu aktivnost džema od malina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera



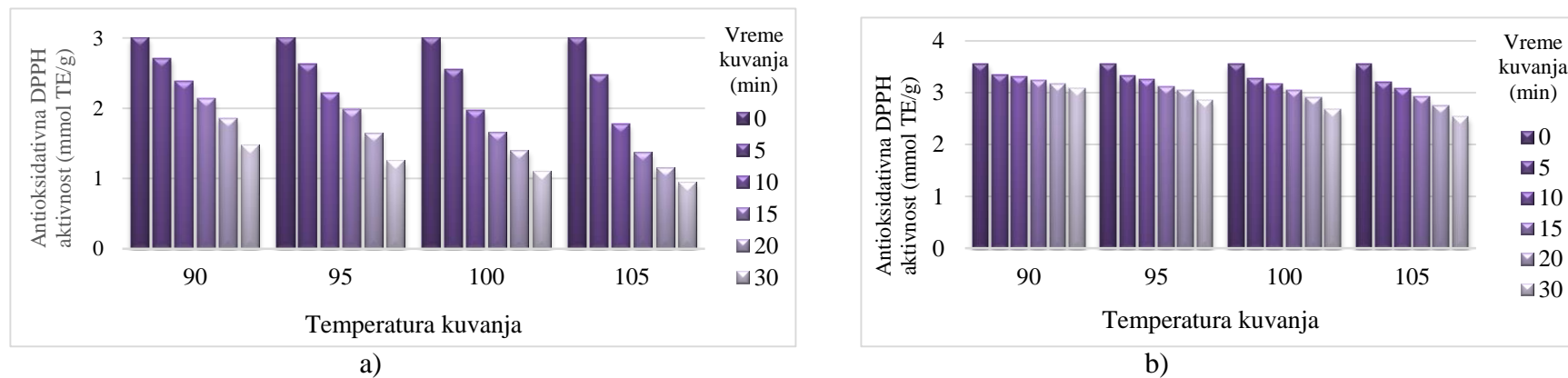
Slika 5.77. Promena antioksidativne aktivnosti džema od kupina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



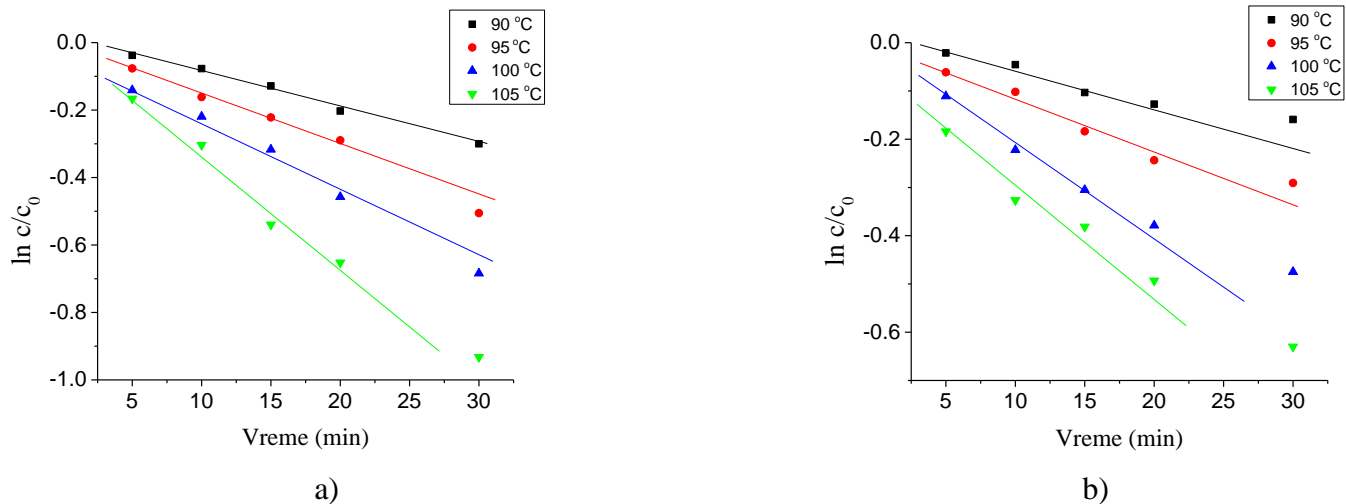
Slika 5.78. Uticaj temperature i vremena kuvanja na antioksidativnu aktivnost džema od kupina sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera



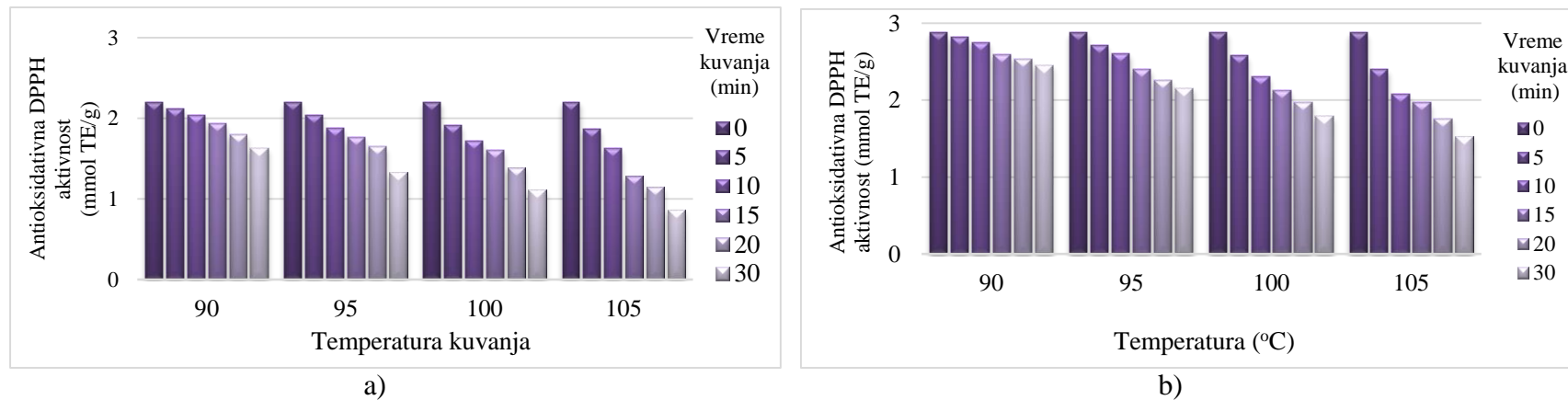
Slika 5.79. Promena antioksidativne aktivnosti u džemu od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



Slika 5.80. Uticaj temperature i vremena kuvanja na antioksidativnu DPPH aktivnost džema od borovnica sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera



Slika 5.81. Promena antioksidativne aktivnosti u džemu od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera tokom kuvanja na različitim temperaturama



Slika 5.82. Uticaj temperature i vremena kuvanja na antioksidativnu DPPH aktivnost džema od jagoda sa: a) većim i b) manjim sadržajem šećera

5.5.4. Termička degradacija pojedinačnih antocijana

Primenom HPLC analize, u džemovima od malina su identifikovani sledeći pojedinačni antocijani: cijanidin-3-soforozid, cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid i pelargonidin-3-soforozid. Cijanidin-3-soforozid je najzastupljeniji, a zatim slede cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid i pelargonidin-3-soforozid.

U džemu od malina sa manjim sadržajem šećera je primećena veća stabilnost pojedinačnih antocijana, sa manjim gubicima na svim primenjenim temperaturama kuvanja. Najmanji gubitak u sadržaju cijanidin-3-soforozida, cijanidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida i pelargonidin-3-soforozida, zabeležen je nakon 5 minuta kuvanja na 90 °C i iznosi 35,6%, 38,4%, 29,6% i 10,1% u džemu sa većim sadržajem šećera i 13,4%, 24,6%, 11,7% i 4,47% u džemu sa manjim sadržajem šećera. Najveći gubitak u sadržaju cijanidin-3-soforozida, cijanidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida i pelargonidin-3-soforozida je zabeležen nakon 30 minuta kuvanja na 105 °C i iznosi 74,5%, 81,1%, 71,7% i 56,4% u džemu sa većim sadržajem šećera i 44,2%, 55,1%, 42,6% i 42,2% u džemu sa manjim sadržajem šećera.

Prema dobijenim rezultatima (tabele 5.42. i 5.43.), pelargonidin-3-soforozid je bio najstabilniji antocijan u obe vrste džema. Cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-soforozid su ispoljili relativno ujednačenu stabilnost u džemu sa manjim sadržajem šećera, dok je u džemu sa većim sadržajem šećera razlika u stabilnosti nešto veća u korist cijanidin-3-rutinozida. Glukozidi cijanidina sa disaharidima rutinozom i soforozom ispoljili su veću stabilnost od cijanidin-3-glukozida, koji je bio najnestabilniji od identifikovanih pojedinačnih antocijana u obe vrste džema. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature. U radu *Garcia-Viguera i saradnika* (1998), cijanidin-3-glukozid je bio najnestabilniji prilikom pripreme i čuvanja džema od malina.

Veća stabilnost pelargonidina posledica je prisustva dva H atoma u položajima 3 i 5 na B prstenu (*Fleschhut i sar.*, 2006) dok je cijanidin podložniji degradaciji zbog prisustva vicinalne hidroksilne grupe (*Francis*, 1989). Tip šećera koji je u položaju 3 vezan za antocijanidin utiče na stabilnost molekula. U radu *Rommel i saradnika* (1990), cijanidin-3-soforozid je najzastupljeniji i najstabilniji pigment u soku i vinu od malina, a sadrži disaharid soforozu. U istom radu je zapaženo da je cijanidin-3-glukozid (u položaju 3 je monosaharid glukoza) najnestabilniji i najreaktivniji pigment, koji brže polimerizuje od ostalih antocijana, sa povećanjem intenziteta tamnjenja.

Tabela 5.42. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od malina sa većim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Cijanidin-3-soforozid	RSD (%)	Cijanidin-3-glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3-rutinozid	RSD (%)	Pelargonidin-3-soforozid	RSD (%)
		226±6*	2,65	60±1*	1,67	10,7±0,3*	2,80	7,23±0,02	0,28
90	5	204±6	2,94	51±2	3,92	9,8±0,3	3,06	6,50±0,03	0,46
	10	186±5	2,69	47±1	2,13	9,3±0,3	3,22	6,23±0,05	0,80
	15	168±5	2,98	42±1	2,38	8,8±0,3	3,41	5,92±0,05	0,84
	20	155±4	2,58	40±2	5,00	8,2±0,3	3,66	5,54±0,03	0,54
	30	145±4	2,76	37±3	8,11	7,6±0,2	2,63	5,11±0,03	0,59
95	5	188±5	2,66	45±1	2,22	9,0±0,3	3,33	6,21±0,02	0,32
	10	167±5	2,99	40±1	2,50	8,3±0,2	2,41	5,94±0,02	0,34
	15	151±4	2,65	37±1	2,70	8,0±0,2	2,50	5,37±0,04	0,74
	20	131±3	2,29	33±1	3,03	7,3±0,2	2,74	5,01±0,05	1,00
	30	124±3	2,42	30±1	3,33	6,7±0,1	1,49	4,87±0,05	1,03
100	5	139±3	2,16	35±1	2,85	8,0±0,2	2,50	5,85±0,04	0,68
	10	126±3	2,38	32±1	3,12	7,2±0,2	2,78	5,26±0,02	0,38
	15	114±2	1,75	27,2±0,4	1,47	6,3±0,2	3,17	4,87±0,01	0,21
	20	105±2	1,90	24,1±0,4	1,66	5,6±0,1	1,78	4,39±0,03	0,68
	30	99±2	2,02	22,0±0,4	1,82	5,0±0,2	4,00	3,9±0,05	1,28
105	5	107±5	4,67	27,1±0,4	1,48	6,2±0,2	3,22	5,27±0,04	0,76
	10	92±2	2,17	22,7±0,3	1,32	5,5±0,1	1,82	4,83±0,06	1,24
	15	80±2	2,50	20,1±0,3	1,49	5,1±0,1	1,96	4,04±0,04	0,99
	20	75±2	2,67	15,2±0,3	1,97	4,1±0,1	2,44	3,29±0,03	0,91
	30	58±1	1,72	11,2±0,2	1,78	3,0±0,1	3,33	3,14±0,07	2,23

Tabela 5.43. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od malina sa manjim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Cijanidin-3-soforozid	RSD (%)	Cijanidin-3-glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3-rutinozid	RSD (%)	Pelargonidin-3-soforozid	RSD (%)
		381±9*	2,36	92±2*	2,17	17,6±0,3*	1,70	8,95±0,03	0,34
90	5	368±8	2,17	85±2	2,35	17,1±0,3	1,75	8,55±0,02	0,23
	10	354±8	2,26	80±2	2,50	16,8±0,3	1,78	8,23±0,03	0,36
	15	352±6	1,70	76±1	1,31	16,3±0,3	1,84	8,01±0,01	0,12
	20	335±6	1,79	72±2	2,78	16,1±0,3	1,86	7,87±0,03	0,38
	30	329±5	1,52	69±3	4,35	15,5±0,2	1,29	7,50±0,01	0,13
95	5	355±6	1,69	82±2	2,44	17,0±0,3	1,76	8,26±0,05	0,61
	10	343±6	1,75	78±1	1,28	16,2±0,3	1,85	8,05±0,01	0,12
	15	322±5	1,55	75±1	1,33	15,5±0,2	1,29	7,84±0,03	0,38
	20	310±5	1,61	69±1	1,45	15,0±0,2	1,33	7,41±0,03	0,40
	30	300±4	1,33	67±1	1,49	14,3±0,2	1,40	7,12±0,01	0,14
100	5	322±5	1,55	77±2	2,60	15,7±0,2	1,27	7,70±0,02	0,26
	10	303±5	1,65	73±2	2,74	14,8±0,2	1,35	7,34±0,02	0,27
	15	298±5	1,68	66±1	1,51	14,1±0,2	1,42	6,98±0,03	0,43
	20	287±4	1,39	62±2	3,23	13,6±0,3	2,21	6,65±0,01	0,15
	30	279±4	1,43	59±1	1,69	13,1±0,1	0,76	6,21±0,01	0,16
105	5	302±5	1,66	69±2	2,90	14,3±0,2	1,40	7,13±0,04	0,56
	10	288±5	1,74	59±1	1,69	13,3±0,2	1,50	6,74±0,03	0,45
	15	267±4	1,50	52±1	1,92	12,7±0,2	1,57	6,12±0,01	0,16
	20	245±4	1,63	47±1	2,13	11,4±0,2	1,75	5,53±0,01	0,18
	30	213±4	1,88	41±1	2,44	10,1±0,1	0,99	5,17±0,01	0,19

Primenom HPLC analize, u džemovima od kupina identifikovani su sledeći pojedinačni antocijani: cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-malonilglukozid (tabele 5.44. i 5.45.). Najzastupljeniji je cijanidin-3-glukozid, a zatim redom slede cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-malonilglukozid, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (*Fang-Chiang i Wrolstad*, 2005). U džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera primećena je veća stabilnost pojedinačnih antocijana, sa manjim gubicima na svim primenjenim temperaturama kuvanja. Najmanji gubici u sadržaju cijanidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-malonilglukozida zabeleženi su nakon 5 minuta kuvanja na 90 °C i iznose 44,24%, 23,25% i 22,40% u džemu sa većim sadržajem šećera i 15,92%, 8,23% i 25,46% u džemu sa manjim sadržajem šećera.

Najveći gubici u sadržaju cijanidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-malonilglukozida zabeleženi su nakon 30 minuta kuvanja na 105 °C i iznose 89,24%, 86,48% i 86,03% u džemu sa većim sadržajem šećera i 69,36%, 67,81% i 79,41% u džemu sa manjim sadržajem šećera. Na osnovu ovih podataka, u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera, najveća stabilnost je zabeležena kod cijanidin-3-rutinozida, a zatim slede cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-malonilglukozid.

Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature. Manja stabilnost cijanidin-3-malonilglukozida u odnosu na cijanidin-3-glukozid je zabeležena je tokom skladištenja na 5 °C i 30 °C, kao i prilikom blanširanja visokožbunaste kupine u istraživanju *Gancel i saradnika* (2011). Prilikom zagrevanja soka od kupina na 70 °C, 80 °C i 90 °C, takođe je zabeležena veća stabilnost cijanidin-3-glukozida u odnosu na cijanidin-3-malonilglukozid (*Zhang i sar.*, 2012).

Veća stabilnost cijanidin-3-rutinozida u odnosu na cijanidin-3-glukozid, zabeležena je prilikom zagrevanja na 100 °C u kiselim vodenim rastvorima, pri aerobnim i anaerobnim uslovima (*Adams*, 1973). Prilikom tretiranja paste od malina koje je podrazumevalo kombinovanje povišenih temperatura (90 °C, 100 °C, 110 °C i 115 °C) sa povišenim pritiskom (200, 400, 550 i 700 MPa), takođe je utvrđena veća stabilnost cijanidin-3-rutinozida u odnosu na cijanidin-3-glukozid (*Verbeyst i sar.*, 2011).

Niža termička stabilnost cijanidin-3-malonilglukozida može biti posledica mesta glikozilacije i prisustva acilovanih supstituenata (*Torskangerpoll i Andersen*, 2005). Međutim, degradacija cijanidin-3-malonilglukozida se može odvijati i tako da prvo dolazi do gubitka malonil-grupe i formiranja cijanidin-3-glukozida, čime je realna brzina degradacije cijanidin-3-glukozida „maskirana“ (*Gancel i sar.*, 2011).

U džemu od kupina sa većim sadržajem šećera zabeležena je približna stabilnost cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-malonilglukozida, dok je cijanidin-3-glukozid bio najnestabilniji. Zbog veće količine šećera u džemu, uslovi verovatno pogoduju nastanku furfurala i njegovih derivata. Naime, degradacioni proizvodi dobijeni od šećera su furfural i 5-hidroksimetilfurfural (*Shinoda i sar.*, 2005), za koje je pokazano da dovode do degradacije antocijana iz kupine, u puferovanom rastvoru pri kiselim uslovima (*Debicki-Pospisil i sar.*, 1983). U ovom slučaju, veća stabilnost cijanidin-3-malonilglukozida može biti posledica prisustva malonil-grupe koja, usled sternih smetnji, onemogućava ili usporava reakciju ovih jedinjenja sa antocijanima (*Mazza i Brouillard*, 1987).

Tabela 5.44. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od kupina sa većim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Cijanidin-3-glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3-rutinozid	RSD (%)	Cijanidin-3-malonilglukozid	RSD (%)
		449,30±0,04*	0,01	28,99±0,04*	0,14	14,82±0,06*	0,40
90	5	250,53±0,01	0,003	22,25±0,05	0,22	11,5±0,1	0,87
	10	246,05±0,02	0,01	18,55±0,06	0,32	9,41±0,02	0,21
	15	221,7±0,3	0,13	17,88±0,02	0,11	8,91±0,05	0,56
	20	218,08±0,05	0,02	15,25±0,04	0,26	8,27±0,05	0,60
	30	178,37±0,01	0,01	12,39±0,05	0,40	7,5±0,1	1,33
95	5	224,01±0,02	0,01	17,7±0,1	0,56	9,47±0,02	0,21
	10	223,28±0,01	0,004	15,82±0,02	0,13	8,51±0,04	0,47
	15	201,35±0,05	0,02	14,30±0,06	0,42	7,86±0,05	0,64
	20	166,06±0,02	0,01	11,43±0,04	0,35	6,20±0,01	0,16
	30	147,1±0,2	0,13	11,26±0,07	0,62	5,343±0,003	0,06
100	5	203,09±0,07	0,03	14,5±0,3	2,07	7,67±0,04	0,52
	10	189,6±0,4	0,21	13,68±0,05	0,36	7,34±0,02	0,27
	15	183,89±0,01	0,01	12,31±0,06	0,49	6,34±0,07	1,10
	20	153,41±0,05	0,03	11,39±0,07	0,61	6,1±0,2	3,28
	30	139,52±0,02	0,01	10,19±0,06	0,59	5,18±0,05	0,96
105	5	113,37±0,01	0,01	8,64±0,01	0,11	4,91±0,01	0,20
	10	97,3±0,3	0,31	6,43±0,01	0,15	4,22±0,05	1,18
	15	90,02±0,01	0,01	6,15±0,07	1,14	3,97±0,07	1,76
	20	63,38±0,04	0,06	4,39±0,02	0,45	2,5±0,1	4,00
	30	48,33±0,05	0,10	3,92±0,06	1,53	2,07±0,01	0,48

Tabela 5.45. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od kupina sa manjim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Cijanidin-3-glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3-rutinozid	RSD (%)	Cijanidin-3-malonilglukozid	RSD (%)
		550,0±0,1*	0,02	35,01±0,05*	0,14	17,87±0,05*	0,28
90	5	462,43±0,02	0,004	32,13±0,08	0,25	13,32±0,07	0,52
	10	391,29±0,06	0,01	27,4±0,3	1,09	10,85±0,02	0,18
	15	356,75±0,01	0,002	25,17±0,02	0,08	9,69±0,02	0,21
	20	350,32±0,07	0,02	23,7±0,1	0,42	8,68±0,03	0,35
	30	327,18±0,06	0,02	21,57±0,05	0,23	8,49±0,04	0,47
95	5	367,51±0,02	0,005	25,57±0,01	0,04	11,58±0,01	0,09
	10	358,134±0,005	0,001	23,99±0,06	0,25	9,808±0,005	0,05
	15	342,89±0,04	0,01	22,19±0,07	0,31	9,61±0,07	0,73
	20	332,05±0,07	0,02	21,34±0,02	0,09	9,49±0,06	0,63
	30	249,6±0,1	0,04	19,4±0,3	1,55	7,24±0,08	1,10
100	5	245,01±0,02	0,01	19,40±0,07	0,36	8,11±0,02	0,25
	10	212,65±0,01	0,005	17,72±0,04	0,22	6,82±0,08	1,17
	15	208,67±0,01	0,005	15,33±0,01	0,06	6,43±0,05	0,78
	20	202,9±0,2	0,10	13,45±0,06	0,45	6,22±0,01	0,16
	30	192,07±0,05	0,03	12,27±0,04	0,32	5,42±0,06	1,11
105	5	222,64±0,04	0,02	16,145±0,002	0,01	7,02±0,04	0,57
	10	205,77±0,02	0,01	14,76±0,08	0,54	5,01±0,02	0,40
	15	199,11±0,06	0,03	13,74±0,02	0,14	4,720±0,005	0,10
	20	180,94±0,01	0,005	12,98±0,05	0,38	4,35±0,01	0,23
	30	168,5±0,3	0,18	11,27±0,01	0,09	3,68±0,06	1,63

Primenom HPLC analize, u džemovima od borovnica identifikovani su sledeći antocijani: delfinidin-3-galaktozid, delfinidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, delfinidin-3-arabinozid, cijanidin-3-glukozid, petunidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid, peonidin-3-galaktozid, petunidin-3-arabinozid i malvidin-3-galaktozid.

Najzastupljeniji su glikozidi delfinidina, zatim slede glikozidi petunidina i cijanidina, dok su najmanje zastupljeni galaktozidi malvidina i peonidina.

Prema rezultatima u tabelama 5.46. i 5.47., najmanji gubici u sadržaju pojedinačnih antocijana zabeleženi su pripremanjem džemova na 90 °C u trajanju od 5 minuta. Gubici u sadržaju cijanidin-3-galaktozida, peonidin-3-galaktozida, petunidin-3-galaktozida, delfinidin-3-galaktozida i malvidin-3-galaktozida iznose: 7,46%, 3,86%, 14,05%, 28,24% i 15,32% u džemu sa većim sadržajem šećera i 1,00%, 3,14%, 1,75%, 8,09% i 14,06% u džemu sa manjim sadržajem šećera. Gubici u sadržaju cijanidin-3-glukozida i delfinidin-3-glukozida iznose 15,25% i 32,83% u džemu sa većim sadržajem šećera i 1,26% i 5,13% u džemu sa manjim sadržajem šećera. Gubici u sadržaju cijanidin-3-arabinozida, petunidin-3-arabinozida i delfinidin-3-arabinozida iznose 23,50%, 6,54% i 24,46% u džemu sa većim sadržajem šećera i 13,69%, 5,29% i 6,25% u džemu sa manjim sadržajem šećera.

Najveći gubici u sadržaju svih identifikovanih pojedinačnih antocijana zabeleženi su prilikom pripreme džemova na 105 °C 30 minuta. Gubici u sadržaju cijanidin-3-galaktozida, peonidin-3-galaktozida, petunidin-3-galaktozida, delfinidin-3-galaktozida i malvidin-3-galaktozida iznose: 82,10%, 84,98%, 85,95%, 87,00% i 89,11% u džemu sa većim sadržajem šećera i 52,00%, 53,95%, 55,29%, 56,65% i 61,00% u džemu sa manjim sadržajem šećera.

Stabilnost glukozida cijanidina je nešto veća od stabilnosti glukozida delfinidina i u džemu sa većim sadržajem šećera gubici iznose 81,35%, odnosno 82,32%, a u džemu sa manjim sadržajem šećera iznose 50,63%, odnosno 53,33%. Gubici u sadržaju cijanidin-3-arabinozida, petunidin-3-arabinozida i delfinidin-3-arabinozida iznose 88,84%, 89,72% i 90,82% u džemu sa većim sadržajem šećera i 54,46%, 55,29% i 56,50% u džemu sa manjim sadržajem šećera.

Na osnovu dobijenih podataka, najstabilniji su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid, dok su petunidin-3-arabinozid i delfinidin-3-arabinozid najnestabilniji antocijani. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem *Trošt i saradnika* (2008), u kome je stabilnost pojedinačnih antocijana u odnosu na aglikon opadala sledeći redosledom: cijanidin > peonidin > petunidin > malvidin > delfinidin. Prema *Mitiću* (2020), glikozidi delfinidina su više osetljivi na termički tretman od glikozida cijanidina u komercijalno dostupnim sokovima od borovnica. *Hellström i saradnici* (2013) su u svom istraživanju došli do istog zaključka – glikozidi delfinidina mnogo brže podležu degradaciji od glikozida cijanidina u soku od crnih ribizli. Supstituenti na B prstenu antocijanidina utiču na stabilnost molekula

(naročito hidroksilna i metoksilna grupa), pa tako dodatna hidroksilna grupa na B prstenu delfinidina smanjuje njegovu stabilnost (*Fleschhut i sar.*, 2006).

Takođe, primećena je veća stabilnost svih glukozida i galaktozida od arabinozida, što je posledica prisustva stabilnijih heksoznih šećera (glukoza i galaktoza) u odnosu na pentozne šećere (arabinoza) (*Trošt i sar.*, 2008).

Tabela 5.46. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od borovnice sa većim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Delfinidin-3-galaktozid	RSD (%)	Delfinidin-3-glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3-galaktozid	RSD (%)	Delfinidin-3-arabinozid	RSD (%)	Cijanidin-3-glukozid	RSD (%)
		177±7*	3,95	198±4*	2,02	67±1*	1,49	32,7±0,7*	2,14	118±1*	0,85
90	5	127±6	4,72	133±7	5,26	62±2	3,22	24,7±0,9	3,64	100±1	1,00
	190	110±4	3,64	132±4	3,03	61±1	1,64	22,5±0,8	3,55	99±1	1,12
	15	98±7	7,14	130±8	6,15	59±1	1,69	21,9±0,6	2,74	98±4	4,08
	20	95±1	1,05	122±3	2,46	56±1	1,78	20,0±0,8	4,00	96±1	1,04
	30	92±4	4,35	120±1	0,83	49±2	4,08	18,8±0,9	4,79	95±1	1,05
95	5	55±1	1,82	75±3	4,00	27±1	3,70	9,4±0,7	7,45	44±1	2,27
	10	51±3	5,88	64±4	6,25	25±1	4,00	8,9±0,4	4,49	42±1	2,38
	15	50±3	6,00	63±3	4,76	24±0	0	8,7±0,3	3,45	41±1	2,44
	20	47±3	6,38	55±1	1,82	23±1	4,34	7,9±0,4	5,06	39±1	2,56
	30	43±1	2,32	53±2	3,77	21±1	4,76	7,4±0,2	2,70	38±1	2,63
100	5	50±1	2,00	70±1	1,43	24±1	4,17	9,2±0,3	3,26	42±2	4,76
	10	42±1	2,38	62±1	1,61	19±0	0	7,2±0,1	1,39	40±1	2,50
	15	39±3	7,69	55±1	1,82	17±1	5,88	6,9±0,4	5,80	34±1	2,94
	20	33±2	6,06	48±1	2,08	14±1	7,14	5,4±0,4	7,41	32±1	3,12
	30	23±1	4,35	39±1	2,56	12±1	8,33	4,4±0,1	2,72	28±1	3,57
105	5	47±1	2,13	58±1	1,72	23±1	4,35	8,8±0,3	3,41	31±1	3,22
	10	40±3	7,50	43±3	6,98	19±1	5,26	8,3±0,3	3,61	30±1	3,33
	15	31±1	3,22	42±1	2,38	16±1	6,25	7,1±0,1	1,41	26±1	3,85
	20	26±2	7,69	38±3	7,89	14±1	7,14	5,7±0,1	1,75	25±1	4,00
	30	23±1	4,35	35±1	2,85	12±0	0	3,0±0,1	3,33	22±1	4,54

Tabela 5.46. (nastavak)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Petunidin-3-galaktozid	RSD (%)	Cijanidin-3-arabinozid	RSD (%)	Peonidin-3-galaktozid	RSD (%)	Petunidin-3-arabinozid	RSD (%)	Malvidin-3-galaktozid	RSD (%)
		121±4*	3,30	25,1±0,7*	2,79	46,6±0,6*	1,29	107±2*	1,87	24,8±0,6*	2,42
90	5	104±7	6,73	19,2±0,9	4,69	44,8±0,4	0,89	100±2	2,00	21,0±0,4	1,90
	10	100±4	4,00	18,8±0,8	4,25	44,1±0,9	2,04	93±1	1,07	18,7±0,5	2,67
	15	99±6	6,06	17,7±0,6	3,39	43,2±0,6	1,39	82±2	2,44	16,0±0,6	3,75
	20	96±3	3,12	16,0±0,4	2,50	38,5±0,7	1,82	77±1	1,30	14,1±0,4	2,84
	30	82±1	1,22	15,6±0,9	5,77	31,9±0,9	2,82	65±1	1,54	10,3±0,6	5,82
95	5	42±3	7,14	6,4±0,2	3,12	12,8±0,7	5,47	33±1	3,03	6,6±0,2	3,03
	10	41±2	4,88	5,3±0,2	3,77	12,7±0,4	3,15	32±1	3,12	6,2±0,2	3,22
	15	40±3	7,50	4,4±0,3	6,82	12,2±0,3	2,46	31±1	3,22	5,5±0,3	5,45
	20	38±1	2,63	4,0±0,2	5,00	11,8±0,4	3,39	29±1	3,44	5,1±0,2	3,92
	30	34±2	5,88	3,9±0,2	5,13	11,5±0,2	1,74	27±1	3,70	4,6±0,2	4,35
100	5	40±1	2,50	3,8±0,2	5,26	12,0±0,3	2,50	33±1	3,03	6,1±0,2	3,28
	10	33±1	3,03	4,0±0,1	2,50	10,8±0,1	0,92	29±1	3,45	4,7±0,1	2,13
	15	27±1	3,70	3,4±0,2	5,88	9,3±0,4	4,30	25±1	4,00	4,0±0,2	5,00
	20	24±1	4,17	2,7±0,2	7,41	7,4±0,4	5,40	21±1	4,76	3,4±0,2	5,88
	30	19±1	5,26	2,1±0,1	4,76	6,9±0,1	1,45	18±1	5,55	2,8±0,1	3,57
105	5	41±1	2,44	3,9±0,2	5,13	10,6±0,7	6,60	28±1	3,57	5,9±0,2	3,39
	10	26±1	3,85	3,7±0,2	5,40	9,8±0,2	2,04	25±1	4,00	4,6±0,2	4,35
	15	22±1	4,54	3,4±0,2	5,88	8,4±0,5	5,95	22±1	4,54	4,2±0,2	4,76
	20	19±0	0	3,2±0,1	3,12	8,0±0,1	1,25	16±1	6,25	3,7±0,1	2,70
	30	17±1	5,88	2,8±0,1	3,57	7,0±0,1	1,43	11±1	9,09	2,7±0,1	3,70

Tabela 5.47. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od borovnice sa manjim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Delfinidin-3-galaktozid	RSD (%)	Delfinidin-3-glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3-galaktozid	RSD (%)	Delfinidin-3-arabinozid	RSD (%)	Cijanidin-3-glukozid	RSD (%)
		173±7*	4,05	195±4*	2,05	100±1*	1,00	40,0±0,6*	1,50	158±1*	0,63
90	5	159±4	2,52	185±7	3,78	99±2	2,02	37,5±0,9	2,40	156±1	0,64
	10	154±3	1,95	179±4	2,23	98±1	1,02	35,3±0,5	1,42	154±1	0,65
	15	145±7	4,83	174±5	2,87	96±1	1,04	32,4±0,6	1,85	148±4	2,70
	20	141±1	0,71	171±3	1,75	92±1	1,09	30,9±0,7	2,26	144±1	0,69
	30	136±4	2,94	163±2	1,23	88±2	2,27	27,6±0,9	3,26	135±1	0,74
95	5	146±1	0,68	178±3	1,68	97±1	1,03	36,9±0,5	1,35	155±1	0,64
	10	142±4	2,82	169±4	2,37	90±1	1,11	34,1±0,4	1,17	142±1	0,70
	15	130±3	2,31	152±2	1,31	81±1	1,23	33,5±0,5	1,49	126±1	0,79
	20	128±4	3,12	146±3	2,05	79±1	1,26	31,0±0,7	2,26	123±1	0,81
	30	127±2	1,57	139±2	1,44	75±1	1,33	29,6±0,2	0,68	117±1	0,85
100	5	131±1	0,76	121±1	0,83	70±1	1,43	25,3±0,3	1,18	100±2	2,00
	10	120±1	0,83	116±1	0,86	63±1	1,59	23,8±0,6	2,52	95±1	1,05
	15	92±3	3,26	106±1	0,94	58±1	1,72	22,8±0,4	1,75	90±1	1,11
	20	90±2	2,22	100±1	1,00	54±1	1,85	20,7±0,5	2,20	89±1	1,12
	30	86±2	2,32	91±1	1,10	51±1	1,96	18,2±0,1	0,55	88±2	2,27
105	5	100±1	1,00	117±2	1,71	68±1	1,47	23,2±0,7	3,02	92±1	1,09
	10	94±2	2,13	108±3	2,78	53±1	1,89	21,5±0,3	1,39	87±1	1,15
	15	88±1	1,14	98±1	1,02	50±1	2,00	19,2±0,6	3,12	82±0	0
	20	85±2	2,35	96±3	3,12	49±1	2,04	18,1±0,2	1,10	80±1	1,25
	30	75±1	1,33	91±1	1,10	48±1	2,08	17,4±0,1	0,57	78±1	1,28

Tabela 5.47. (nastavak)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Petunidin-3-galaktozid	RSD (%)	Cijanidin-3-arabinozid	RSD (%)	Peonidin-3-galaktozid	RSD (%)	Petunidin-3-arabinozid	RSD (%)	Malvidin-3-galaktozid	RSD (%)
		171±5*	2,92	31,4±0,4*	1,27	79,7±0,9*	1,13	170±5*	2,94	44,1±0,7*	1,59
90	5	168±6	3,57	27,1±0,3	1,11	77,2±0,4	0,52	161±5	3,10	37,9±0,4	1,05
	10	166±4	2,41	25,8±0,7	2,71	74,8±0,9	1,20	155±4	2,58	37,0±0,3	0,81
	15	161±6	3,72	23,9±0,8	3,35	72,3±0,8	1,11	149±3	2,01	35,1±0,6	1,71
	20	157±3	1,91	23,5±0,4	1,70	72,0±0,8	1,11	140±1	0,71	33,4±0,8	2,39
	30	136±4	2,94	22,9±0,9	3,93	67,9±0,9	1,32	123±4	3,25	31,1±0,4	1,29
95	5	162±3	1,85	27,9±0,4	1,43	74,2±0,9	1,21	155±5	3,22	37,3±0,8	2,14
	10	148±2	1,35	24,6±0,7	2,85	69,5±0,6	0,86	149±2	1,34	36,4±0,3	0,82
	15	142±2	1,41	22,2±0,2	0,90	63,2±0,7	1,11	140±3	2,14	34,7±0,3	0,86
	20	138±4	2,90	21,0±0,6	2,86	61,4±0,4	0,65	138±4	2,90	34,1±0,4	1,17
	30	134±2	1,49	20,1±0,2	0,99	58,6±0,7	1,19	121±1	0,83	30,3±0,2	0,66
100	5	104±3	2,88	23,0±0,6	2,61	58,3±0,6	1,03	103±2	1,94	28,8±0,2	0,69
	10	96±1	1,04	21,8±0,1	0,46	47,5±0,9	1,89	93±1	1,07	22,0±0,3	1,36
	15	89±1	1,12	19,3±0,2	1,03	45,8±0,4	0,87	86±3	3,49	21,0±0,3	1,43
	20	87±1	1,15	18,1±0,9	4,97	42,2±0,4	0,95	83±5	6,02	20,4±0,2	0,98
	30	86±3	3,49	17,3±0,1	0,58	40,2±0,1	0,25	80±2	2,50	18,8±0,1	0,53
105	5	94±3	3,19	20,0±0,2	1,00	53,4±0,7	1,31	100±4	4,00	21,5±0,2	0,93
	10	91±2	2,20	16,8±0,2	1,19	43,9±0,7	1,59	93±1	1,07	23,9±0,2	0,84
	15	84±1	1,19	15,6±0,3	1,92	40,0±0,5	1,25	83±2	2,41	20,8±0,6	2,88
	20	81±2	2,47	14,9±0,6	4,03	38,9±0,1	0,26	78±5	6,41	18,6±0,6	3,22
	30	80±2	2,50	14,3±0,3	2,10	36,7±0,1	0,27	76±3	3,95	17,2±0,7	4,07

Primenom HPLC analize, u džemovima od jagoda identifikovani su sledeći pojedinačni antocijani: pelargonidin-3-glukozid, cijanidin-3-glukozid, pelargonidin-3-rutinozid i cijanidin-3-malonilglukozid (tabele 5.48. i 5.49.). Najzastupljeniji je pelargonidin-3-glukozid, a zatim slede cijanidin-3-glukozid, pelargonidin-3-rutinozid i cijanidin-3-malonilglukozid, što je u skladu sa podacima iz literature (*da Silva i sar.*, 2007). U džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera zabeležena je veća stabilnost pojedinačnih antocijana, na svim primenjenim temperaturama kuvanja.

Najmanji gubici u sadržaju pelargonidin-3-glukozida, pelargonidin-3-rutinozida, cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-malonilglukozida zabeleženi su pripremanjem džemova na 90°C u trajanju od 5 minuta i iznose 17,43%, 13,77%, 22,82% i 24,18% u džemu sa većim sadržajem šećera i 12,82%, 10,55%, 14,78%, i 20,30% u džemu sa manjim sadržajem šećera.

Najveći gubici u sadržaju pelargonidin-3-glukozida, pelargonidin-3-rutinozida, cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-malonilglukozida zabeleženi su pripremanjem džemova na 105°C u trajanju od 30 minuta i iznose 62,39%, 54,11%, 72,02% i 74% u džemu sa većim sadržajem šećera i 54,65%, 46,64%, 56,70% i 71,66% u džemu sa manjim sadržajem šećera.

Na osnovu dobijenih rezultata, uočena je veća stabilnost glikozida pelargonidina u odnosu na glikozide cijanidina. Isto je zabeleženo u istraživanju *Mitića* (2020), gde je pokazano da je cijanidin-3-*O*-glukozid osetljiviji na termički tretman od glikozida pelargonidina u komercijalno dostupnim sokovima od jagode. Kao što je već pomenuto, stabilnost antocijanidina zavisi od vrste supstituenata na B prstenu, te je veća stabilnost pelargonidina posledica prisustva dva H atoma u položajima 3 i 5 na B prstenu (*Fleschhut i sar.*, 2006) dok je cijanidin podložniji degradaciji zbog prisustva vicinalne hidroksilne grupe (*Francis*, 1989).

Pelargonidin-3-rutinozid je manje osetljiv na termički tretman od pelargonidin-3-glukozida, što je posledica prisustva disaharida rutinoze, koja se sastoji od ramnoze i glukoze (*Sadilova i sar.*, 2007). U džemu sa većim sadržajem šećera zabeležena je približna stabilnost cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-malonilglukozida (isto je zapaženo u džemu od kupina), dok su u džemu sa manjim sadržajem šećera gubici cijanidin-3-malonilglukozida bili veći.

Tabela 5.48. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od jagode sa većim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Pelargonidin-3-glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3-glukozid	RSD (%)	Pelargonidin-3-rutinozid	RSD (%)	Cijanidin -3-malonilglukozid	RSD (%)
		168±2*	1,19*	18,31±0,05	0,27	8,2±0,3	3,67	7,81±0,05	0,64
90	5	139±1	0,72	14,1±0,2	1,42	7,05±0,02	0,28	5,92±0,03	0,51
	10	125±3	2,40	13,5±0,5	3,71	6,32±0,05	0,79	5,43±0,08	1,47
	15	121±5	4,13	12,5±0,1	0,80	5,95±0,03	0,50	5,1±0,1	1,97
	20	113±2	1,78	11,8±0,3	2,53	5,5±0,1	1,83	4,61±0,05	1,08
	30	96±3	3,13	10,2±0,3	2,94	5,0±0,1	2,02	4,27±0,03	0,70
95	5	128±1	0,78	13,3±0,1	0,75	6,41±0,08	1,25	5,52±0,05	0,91
	10	119±2	1,69	12,3±0,1	0,81	5,9±0,1	1,71	5,2±0,1	1,94
	15	115±1	0,87	11,5±0,2	1,74	5,21±0,05	0,96	4,8±0,3	6,31
	20	105±1	0,95	10,3±0,9	8,74	4,97±0,03	0,60	4,4±0,1	2,29
	30	91±3	3,29	9,0±0,1	1,11	4,52±0,02	4,42	3,88±0,03	0,77
100	5	119±5	4,20	12,4±0,2	1,62	5,57±0,1	1,80	4,82±0,05	1,04
	10	111±2	1,80	11,1±0,3	2,69	5,06±0,08	1,58	4,41±0,08	1,81
	15	104±5	4,82	9,42±0,03	0,32	4,7±0,3	6,35	4,03±0,05	1,24
	20	94±3	3,18	8,2±0,5	6,08	4,5±0,1	2,23	3,65±0,03	0,82
	30	81±3	3,71	7,1±0,1	1,41	4,14±0,05	1,21	3,03±0,08	2,64
105	5	100±1	1,00	10,8±0,1	0,93	5,0±0,1	2,00	4,45±0,03	0,67
	10	89±1	1,12	9,5±0,3	3,15	4,53±0,03	0,66	3,90±0,1	2,56
	15	78±7	8,94	7,7±0,1	1,29	4,11±0,05	1,22	3,24±0,1	3,09
	20	70±1	1,42	6,2±0,3	4,83	4,0±0,3	7,55	2,65±0,05	1,88
	30	63±2	3,16	5,1±0,1	1,95	3,8 ±0,1	2,66	2,03±0,03	1,48

Tabela 5.49. Sadržaj pojedinačnih antocijana tokom pripreme džema od jagode sa manjim sadržajem šećera (mg/kg)

Temp. (°C)	Vreme kuvanja (min)	Pelargonidin-3- glukozid	RSD (%)	Cijanidin-3- glukozid	RSD (%)	Pelargonidin-3- rutinozid	RSD (%)	Cijanidin -3- malonilglukozid	RSD (%)
		219±9*	4,11	25,3±0,5*	1,98	11,8±0,3*	2,54	11,9±0,1*	0,84
90	5	191±5	2,62	21,5±0,3	1,39	10,5±0,5	4,74	9,5±0,5	5,28
	10	167±6	3,59	19,9±0,7	3,51	9,8±0,1	1,02	8,9±0,2	2,24
	15	161±4	2,48	18,9±0,5	2,65	9,5±0,3	3,17	8,4±0,3	3,57
	20	154±12	7,78	18±1	5,56	9,1±0,4	4,39	8,2±0,3	3,66
	30	132±4	3,02	16,4±0,3	1,83	8,1±0,7	8,69	7,5±0,6	8,03
95	5	166±6	3,62	20±1	5,03	10,1±0,2	1,98	8,3±0,5	6,03
	10	156±10	6,42	18,4±0,2	1,09	9,0±0,4	4,47	8,0±0,2	2,51
	15	153±9	5,88	17,7±0,3	1,69	8,7±0,5	5,75	7,5±0,2	2,66
	20	139±8	5,75	16,6±0,5	3,01	7,9±0,3	3,81	7,2±0,1	1,39
	30	123±7	5,70	14,2±0,3	2,11	7,0±0,6	8,55	6,6±0,4	6,06
100	5	161±9	5,59	19,4±0,1	0,52	9,5±0,4	4,22	8,1±0,3	3,71
	10	151±5	3,30	17±1	5,81	9,0±0,5	5,57	7,6±0,5	5,26
	15	150±8	5,32	17,1±0,7	4,10	8,8±0,7	7,95	6,8±0,5	7,30
	20	136±8	5,87	16±1	6,25	8,1±0,3	3,72	6,0±0,2	3,35
	30	120±9	7,51	13,4±0,7	5,21	7,4±0,4	5,38	4,9±0,1	2,05
105	5	125±11	8,83	14,2±0,5	3,52	7,9±0,1	1,26	4,8±0,1	2,09
	10	119±4	3,38	13,1±0,3	2,28	7,2±0,2	2,77	4,6±0,2	4,38
	15	104±8	7,72	12,1±0,5	4,13	6,7±0,2	3,01	3,9±0,1	2,58
	20	101±6	5,91	11,2±0,3	2,67	6,4±0,5	7,80	3,4±0,1	2,92
	30	99±7	7,05	10,9±0,1	0,91	6,3±0,3	4,7	3,4±0,1	2,97

6. Izvod

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je optimizacija radnih parametara instrumenta i validacija ICP-OES metode za određivanje elementnog sastava uzoraka jagoda, kupina, malina i borovnica gajenih na teritoriji Republike Srbije. Određen je sadržaj makro i mikroelemenata u pomenutim uzorcima. Izvršena je ekstrakcija polifenolnih jedinjenja primenom zakišelenog 80% metanola, metanola, 96% etanola, 60% etanola, vode i acetona. Primenom spektrofotometrijskih metoda, određen je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana i antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata. Optimizovani su uslovi (brzina skeniranja i pH vrednost uzoraka) za primenu ciklične voltometrije za određivanje antioksidativnog kapaciteta jagodastog voća. Primenom HPLC metode, identifikovana su i kvantifikovana pojedinačna polifenolna jedinjenja u svim ekstraktima. Pripremljeni su džemovi od uzoraka jagoda, kupina, malina i borovnica sa većim i manjim sadržajem šećera. Spektrofotometrijski je praćen uticaj povećanja temperature i sadržaja šećera na sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana, kao i na antioksidativnu aktivnost džemova. Izračunate su energije aktivacije reakcija degradacije ukupnih antocijana u pripremljenim džemovima. Primenom HPLC metode praćen je uticaj povećanja temperature i sadržaja šećera na stabilnost pojedinačnih antocijana u džemovima. Primenom klaster analize i analize glavnih komponenti, izvršena je diferencijacija i grupisanje uzoraka na osnovu elementnog sastava i polifenolnog profila.

Na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Pri frekvenciji od 27,12 MHz, RF snaga generatora je varirana u intervalu od 750 W do 1350 W, pri konstantnim vrednostima ostalih uslova plazme: brzina pumpe 50 obrtaja u minuti, brzina protoka uzorka 50 obrtaja u minuti, protok gasa za raspršivanje 0,7 L/min, protok gasa za hlađenje 12 L/min, aksijalni protok gasa 0,5 L/min, dvojni (aksijalni/radijalni) pravac posmatranja plazme i vreme između uzimanja uzoraka 30 s. U izabranom intervalu ispitivanja, odnos intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme se povećava sa povećavanjem RF snage generatora. Najveći odnos intenziteta linija Mg (II)/Mg(I) dobijen je pri RF snazi generatora od 1150 W. Pri odabranoj vrednosti RF snage generatora relativna standardna devijacija merenja je bila najniža;

- Pri RF snazi generatora od 1150 W, protok gasa za raspršivanje je variran u intervalu od 0,5 L/min do 1,5 L/min. Za brzine gasa za raspršivanje od 0,5 L/min, pri aksijalnom i radijalnom posmatranju plazme, dobijaju se veći odnosi intenziteta linija Mg(II)/Mg(I) i manje vrednosti za relativne standardne devijacije merenja;
- Promena koncentracije azotne kiseline nema značajnijeg uticaja na intezitet emisione linije Mg(I) pri radijalnom posmatranju plazme. Međutim, pri aksijalnom posmatranju plazme, sa povećanjem koncentracije azotne kiseline iznad 10%, dolazi do smanjenja intenziteta emisione linije Mg(I). Najmanja standardna devijacija (0,29%) zabeležena je pri koncentraciji azotne kiseline od 0,5%, pa su njome dopunjeni normalni sudovi prilikom pripreme uzoraka jagodastog voća za ICP-OES analizu;
- Da bi se ispitao efekat matriksa, primenjena je metoda standardnog dodatka. Uzorak je spajkovan sa poznatom koncentracijom standardnog rastvora (0,4 mg/l do 1,6 mg/l, osim za Al, Ca, Fe, Pb, Mg i Na, za koje je spajk iznosio 0,04 mg/l do 0,16 mg/l);
- Tačnost i preciznost metode su testirani primenom sertifikovanog referentnog materijala (borovnice NIST 3287) za koje je sertifikovan sadržaj 8 metala (Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, P, K, Zn). Tačnost ICP-OES metode je u opsegu od 94,61% za Zn do 103,6% za Mg. Preciznost metode je u opsegu od 2,48% za Mg do 7,60% za Zn;
- Od makroelemenata, u svim uzorcima, najzastupljeniji je K, sa 74,32% u jagodama, 70,20% u borovnicama, 65,93% u kupinama i 73,47% u malinama. Zatim po zastupljenosti sledi Ca, čiji je udeo od 9,49% u malinama do 14,71% u kupinama. Najviše P je prisutno u malinama (9,61%), najmanje u borovnicama (7,62%), dok su kupine i jagode imale skoro ujednačen sadržaj ovog elementa (8,77% i 8,36%). Zastupljenost Mg u uzorcima jagoda, borovnica i malina je vrlo ujednačena (6,13%, 6,72% i 6,85%), dok je u kupinama zastupljen sa 9,72%. Svi analizirani uzorci jagodastog voća se odlikuju veoma niskim sadržajem Na (0,50% u jagodama, 1,14% u borovnicama, 0,87% u kupinama i 0,58% u malinama). Od mikroelemenata, najzastupljeniji je Mn, a zatim slede Fe, Cu, Zn i Si;

- Grupisanje elemenata na osnovu sadržaja izvršeno je primenom klaster analize, po Ward-ovoj metodi. Na dendogramu grupisanja makro i mikroelemenata na osnovu sadržaja u uzorcima jagodastog voća, zapažaju se dva klastera. Prvi klaster sa sastoji od dva potklastera. U prvom potklasteru su grupisani mikroelementi. U drugom potklasteru su grupisani makroelementi Ca, Mg, Na i P. Kao makroelement sa najvećim sadržajem u svim uzorcima, K se izdvojio u posebnom klasteru;
- Grupisanje uzoraka jagoda, borovnica, kupina i malina, izvršeno je na osnovu sadržaja elemenata primenom klaster analize, po Ward-ovoj metodi. Na dendogramu se zapažaju dva klastera. Prvi klaster čine uzorci jagode i jedan uzorak malina (M2). Drugi klaster čine dva potklastera. U prvom potklasteru se nalaze uzorci maline M1, M3 i M4, i uzorak kupine K2. U drugom potklasteru se opet zapažaju dva potklastera, gde su u prvom grupisani svi uzorci borovnice, a u drugom uzorci kupine K1, K3, K4 i K5. Grupisanje uzoraka primenom PCA analize u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim primenom klaster analize;
- Primenom spektrofotometrijskih metoda, utvrđeno je da je najveća koncentracija ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana detektovana u ekstraktima gde je kao rastvarač za ekstrakciju korišćen zakišljeni metanol, dok je najniža koncentracija detektovana u vodenim ekstraktima, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Poređenjem rezultata u odnosu na analizirane uzorke, zapaža se da je najveći sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana detektovan u uzorcima borovnica, potom slede uzorci kupina, malina i na kraju jagoda;
- Najveću antioksidativnu aktivnost ispoljili su oni ekstrakti gde je kao ekstragens korišćen zakišljeni metanol. Ovakvi rezultati su bili očekivani, s obzirom na prethodne rezultate, gde se zakišljeni metanol pokazao najefikasnijim pri ekstrakciji ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana;
- DPPH i ABTS testovi zasnivaju se na sposobnosti antioksidanata da uklanjaju slobodne radikale. Većina analiziranih uzoraka jagodastog voća pokazala je vrlo bliske vrednosti za ABTS aktivnosti. Pored toga, vrednosti dobijene DPPH testom bile su veće od vrednosti dobijenih

- ABTS testom. Uzrok ovome može biti činjenica da DPPH radikal mogu redukovati jedinjenja koja su donori vodonika, kao i slobodni radikali, dok se ABTS radikal redukuje jedinjenjima koja sadrže kiseonik. Aktivnost DPPH i ABTS radikala zavisi od pH vrednosti uzoraka koji se analiziraju. Dok je DPPH radikal osetljiv u kiseloj sredini, ABTS test se može primeniti u širem opsegu pH;
- FRAP i RP temelje na sposobnosti antioksidanata da redukuju jone Fe^{3+} do jona Fe^{2+} . Dobijeni rezultati za FRAP i RP test su pokazali da je antioksidativni kapacitet uzoraka borovnice najveći, a zatim slede uzorci kupine, maline i na kraju jagode;
 - U cilju određivanja optimalnih uslova za analizu ekstrakata jagodastog voća primenom ciklične voltometrije (CV), varirane su pH vrednost ekstrakata i brzina skeniranja. Pripremljene su tri serije uzoraka, čije su pH vrednosti podešene na pH=2, pH=4,5 i pH=7, dok su primenjene brzine skeniranja su iznosile 10 mV/s, 25 mV/s i 100 mV/s;
 - Ukoliko se primenjuje mala brzina skeniranja, onda se praktično ne javlja pik na voltamogramu zbog dovoljnog vremena za relaksaciju dvostrukog električnog sloja na radnoj elektrodi, dok veće brzine skeniranja rezultuju pojavom anodne struje većeg intenziteta;
 - Na osnovu dobijenih voltamograma, primetno je da se izraženi anodni pikovi javljaju pri analizi uzoraka u kiseloj sredini, pri pH=2 i pri pH=4,5, dok pri pH=7 nema izraženih pikova. Intenzitet anodne struje pri pH=4,5 je nešto većeg intenziteta od intenziteta anodne struje pri pH=2, pa je zato za rad pH vrednost svih uzoraka podešena na 4,5, a brzina skeniranja podešena na 100 mV/s;
 - Ciklični voltamogrami analiziranog jagodastog voća zabeleženi su u opsegu potencijala 0–800 mV kako bi se obuhvatile sve grupe antioksidativnih jedinjenja. Prvi anodni pik na vrednostima potencijala između 0,310 V i 0,350 V posledica je oksidacije flavonola (kvercetina i njegovog glukozida) i kafene kiseline. Ciklični voltamogrami kvercetina i kvercetin-3-*O*-glukozida pokazali su prvi reverzibilni oksidacioni pik pri $E_{p_a}=0,320$ V i $E_{p_a}=0,350$ V, što odgovara oksidaciji 3', 4'-dihidroksidnog supstituenta na B-prstenu. Drugi oksidacioni pik na 0,537 V kvercetina verovatno je nastao stvaranjem intermedijarnog radikala

- nastalog tokom procesa oksidacije. Kvercetin i kvercetin-3-*O*- β -glukozid pokazuju skoro povratne korake oksidacije. Redukcioni pik od 3', 4'-dihinona koji nastaje tokom procesa oksidacije kvercetina ili kvercetin-3-*O*-glukozida pojavio se pri $E_{p_c}=0,273$ V, odnosno $E_{p_c}=0,318$ V;
- Anodna oksidacija kafene kiseline pokazuje nepovratne anodne ($E_{p_a}=0,344$ V) i katodne ($E_{p_c}=0,128$ V) talase;
 - Drugi, treći i četvrti anodni pik na potencijalima između 0,426 V i 0,444 V, 0,524 V i 0,540 V, odnosno 0,638 V i 0,756 V, mogu se pripisati antocijanima i hidroksicimetnim kiselinama (ferulnoj i kumarnoj kiselini);
 - Ciklični voltamogram malvidin-3-*O*-glukozida pokazao je dva pika pri 0,428 V i 0,543 V. Prvi pik se pripisuje oksidaciji -OH grupe B-prstena, a drugi pik može biti posledica oksidacije 5,7-dihidroksilne grupe A-prstena;
 - Cijanidin-3-*O*-glukozid pokazuje dva anodna pika pri $E_{p_a}=0,529$ V i $E_{p_a}=0,734$ V. Ova dva pika odgovaraju oksidacijama 3', 4'-OH grupa u B-prstenu;
 - Na osnovu Pirson-ovih koeficijenata korelacije, zaključuje se da visoka pozitivna korelacija postoji između CV antioksidativnog kapaciteta i ukupnih polifenola (UPF) ($r^2=0,8963$), CV antioksidativnog kapaciteta i ukupnih flavonoida (UF) ($r^2=0,9133$), CV antioksidativnog kapaciteta i ukupnih antocijana (UA) ($r^2=0,8463$). Pored toga, pronađene su i visoke pozitivne korelacije između antioksidativnih kapaciteta dobijenih primenom CV sa onima dobijenim primenom FRAP ($r^2=0,9290$), RP ($r^2=0,8617$), DPPH ($r^2=0,8853$) i ABTS ($r^2=0,9382$) ukazujući da polifenolni antioksidanti sa OH grupama na B-prstenu najviše doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu;
 - Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih jedinjenja izvršena je primenom HPLC metode. Od fenolnih kiselina, u uzorcima su identifikovane: kafena, ferulna, p-kumarna, i elaginska kiselina. Od flavonola identifikovani su: kvercetin, kvercetin-pentozid, kvercetin-galaktozid, kemferol, kemferol-glukozid i rutin;

- U jagodama su identifikovani i kvantifikovani sledeći antocijani: pelargonidin-3-*O*-glukozid, pelargonidin-3-*O*-rutinozid, cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-malonilglukozid;
- U malinama su identifikovani i kvantifikovani sledeći antocijani: cijanidin-3-*O*-soforozid, pelargonidin-3-*O*-soforozid, cijanidin-3-*O*-glukozid i cijanidin-3-*O*-rutinozid;
- U kupinama su identifikovani i kvantifikovani sledeći antocijani: cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid i cijanidin-3-*O*-malonilglukozid;
- U borovnicama su identifikovani i kvantifikovani sledeći antocijani: delphinidin-3-*O*-galaktozid, delphinidin-3-*O*-glukozid, delphinidin-3-*O*-arabinozid, cijanidin-3-*O*-galaktozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-arabinozid, petunidin-3-*O*-galaktozid, peonidin-3-*O*-galaktozid i malvidin-3-*O*-galaktozid;
- Primenom klaster analize, na osnovu Euklidskog rastojanja, po Ward-ovoj metodi, uzorci su grupisani u dva klastera. Prvi klaster čine uzorci borovnica B2 i B3. U drugom klasteru se zapažaju tri potklastera. U prvom potklasteru su uzorci jagoda J1, J2 i J3. U drugom potklasteru uzorci malina M1, M2, M3, M4 i jedan uzorak borovnice, B1. Uzorak borovnice B1 se odlikuje nižim sadržajem svih identifikovanih pojedinačnih antocijana, kao i nižim sadržajem ferulne kiseline od uzoraka borovnica B2 i B3. Treći potklaster obuhvata uzorke kupina K1, K2, K3, K4 i K5. Grupisanje uzoraka primenom PCA analize u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim primenom klaster analize;
- Prilikom pripreme džemova od jagoda, kupina, borovnica i malina, utvrđeno je da sa porastom temperature, dužine kuvanja i sadržaja šećera, sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijana se smanjuje, pri čemu se najmanji gubitak istih uočava nakon 5 minuta kuvanja na 90 °C, a najveći gubitak nakon 30 minuta kuvanja na 105 °C;
- U džemovima sa većim sadržajem šećera zapaženo je približno dvostruko smanjenje vremena poluraspada antocijana i skoro dvostruko povećanje konstante brzine reakcije degradacije. Vreme poluraspada antocijana, $t_{1/2}$, u džemovima sa manjim sadržajem šećera kreće se od

- 12,9 minuta do 28,4 minuta, dok je kod džemova sa većim sadržajem šećera u opsegu od 5,9 minuta do 15,9 minuta;
- Energija aktivacije za reakcije degradacije ukupnih monomernih antocijana izračunate su iz logaritamskog oblika Arenijusove jednačine, i iznose 68,9 kJ/mol u džemu od malina sa većim sadržajem šećera i 53,6 kJ/mol u džemu od malina sa manjim sadržajem šećera; 57,4 kJ/mol u džemu od kupina sa većim sadržajem šećera i 48,0 kJ/mol u džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera; 51,0 kJ/mol u džemu od borovnica sa većim sadržajem šećera i 40,0 kJ/mol u džemu od borovnica sa manjim sadržajem šećera; 61,0 kJ/mol u džemu od jagoda sa većim sadržajem šećera i 47,0 kJ/mol u džemu od jagoda sa manjim sadržajem šećera;
 - Cijanidin-rutinozid i cijanidin-soforozid ispoljili su veću stabilnost od cijanidin-3-glukozida, koji je bio najnestabilniji od identifikovanih pojedinačnih antocijana u džemovima od malina sa većim i manjim sadržajem šećera;
 - U džemu od kupina sa manjim sadržajem šećera, najveća stabilnost je zabeležena kod cijanidin-3-rutinozida, a zatim slede cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-malonilglukozid. U džemu od kupina sa većim sadržajem šećera zabeležena je približna stabilnost cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-malonilglukozida, dok je cijanidin-3-glukozid bio najnestabilniji. Zbog veće količine šećera u džemu, uslovi verovatno pogoduju nastanku furfurala i njegovih derivata. Naime, degradacioni proizvodi dobijeni od šećera su furfural i 5-hidroksimetilfurfural, za koje je pokazano da dovode do degradacije antocijana iz kupine. U ovom slučaju, veća stabilnost cijanidin-3-malonilglukozida može biti posledica prisustva malonil-grupe koja, usled sternih smetnji, onemogućava ili usporava reakciju ovih jedinjenja sa antocijanima;
 - U džemovima od borovnica, najstabilniji su cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid, dok su petunidin-3-arabinozid i delfinidin-3-arabinozid najnestabilniji antocijani. Stabilnost pojedinačnih antocijana u odnosu na aglikon opadala sledeći redosledom: cijanidin > peonidin > petunidin > malvidin > delfinidin. Supstituenti na B prstenu antocijanidina utiču na stabilnost molekula (naročito hidroksilna i metoksilna grupa), pa tako dodatna hidroksilna grupa na B prstenu

- delfinidina smanjuje njegovu stabilnost. Takođe, primećena je veća stabilnost svih glukozida i galaktozida od arabinozida, što je posledica prisustva stabilnijih heksoznih šećera (glukoza i galaktoza) u odnosu na pentozne šećere (arabinoza);
- U džemovima od jagoda, uočena je veća stabilnost glikozida pelargonidina u odnosu na glikozide cijanidina. Stabilnost antocijanidina zavisi od vrste supstituenata na B prstenu, te je veća stabilnost pelargonidina posledica prisustva dva H atoma u položajima 3 i 5 na B prstenu, dok je cijanidin podložniji degradaciji zbog prisustva vicinalne hidroksilne grupe;
 - Pelargonidin-3-rutinozid je manje osetljiv na termički tretman od pelargonidin-3-glukozida, što je posledica prisustva disaharida rutinoze, koja se sastoji od ramnoze i glukoze. U džemu sa većim sadržajem šećera zabeležena je približna stabilnost cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-malonilglukozida (isto je zapaženo u džemu od kupina), dok su u džemu sa manjim sadržajem šećera gubici cijanidin-3-malonilglukozida bili veći.

7. Summary

Within this doctoral dissertation, the optimization of operating parameters and validation of the ICP-OES method for determination of the elemental composition of strawberries, blackberries, raspberries and blueberries grown in the Republic of Serbia was performed. The contents of macro and microelements, as well as potentially toxic elements in the mentioned samples were determined. Extraction of polyphenolic compounds was performed by using acidified 80% methanol, methanol, 96% ethanol, 60% ethanol, water and acetone. The contents of total polyphenolics, total flavonoids, total anthocyanins and antioxidant activity of the obtained extracts were determined by spectrophotometric methods. In order to determine the antioxidant capacity of berries, the cyclic voltammetry conditions (scan speed and the pH value of the samples) were optimized. Individual phenolic compounds in all extracts were identified and quantified by HPLC method. Jams were made of strawberries, blackberries, raspberries and blueberries, containing high and low sugar amounts. The influence of elevated temperature and sugar content on the content of total polyphenols, total flavonoids and total anthocyanins, as well as on the antioxidant activity of jams, was monitored by spectrophotometric methods. The activation energies of the degradation reactions of total anthocyanins in the prepared jams were calculated. The effect of elevated temperatures and sugar content on the stability of individual anthocyanins in jams was monitored by the HPLC method. Cluster analysis and principal component analysis were performed in order to differentiate and group the samples according to their elemental composition and polyphenolic profile.

Based on the obtained results, the following conclusions can be drawn:

- To optimize the atomization and ionization processes in an inductively coupled plasma source, the Mg(II) 280.270 nm/ Mg(I) 285.213 nm (Mg(II)/Mg(I)) line intensity ratio was used for both viewing (axial and radial) modes. In particular, the effects of the power and the carrier gas flow rate were studied. The power was varied from 750 kW to 1350 kW in intervals of 100 kW. Nebulizer argon flow rate was increased from 0.5 mL/min to 1.5 mL/min in intervals of 0.5 mL/min. The Mg(II)/Mg(I) line ratio at power of 1150 W and a nebulizer gas flow rate of 0.5 L/min for axially and radially viewed configuration were 10.57 and 12.06, respectively. Using the selected RF power of the generator, the relative standard deviation of the measurements was the lowest;

- The influence of nitric acid concentration on the intensity of the Mg (I) emission line during radial plasma view has no significant effect. However, in axial view, there is a decrease in the intensity of the Mg (I) emission line when nitric acid concentrations above 10% were used. The lowest standard deviation (0.29%) was observed when the concentration of nitric acid was 0.5%. This concentration was chosen to fill up vessels when preparing berry samples for ICP-OES analysis;
- To compensate the matrix effect, the standard addition method was used. The sample was spiked with a known concentration of standard solution (0.4 mg/L to 1.6 mg/L, except for Al, Ca, Fe, Pb, Mg and Na, for which the spike was 0.04 mg/L to 0.6 mg/L) and thus was subjected to the same matrix effects as the analytes present in the sample;
- The validation of the developed method was involved precision, accuracy, linearity of the calibration curve, detection (LD) and quantification limit (LQ). The accuracy and precision of the method were tested using the National Institute of Standards and Technology's Certified Reference Material (CRM) for blueberries (NIST 3287), which certifies the content of 8 metals in blueberries (Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, P, K, Zn). The accuracy of the ICP-OES method ranges from 94.61% for Zn to 103.6% for Mg. The accuracy of the method ranges from 2.48% for Mg to 7.60% for Zn;
- In analyzed samples 20 elements were studied and 18 (Ca, K, Mg, P, Na, Al, B, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Si, Zn) elements were determined quantitatively. The most abundant macroelement in all samples is K, with 74.32% in strawberries, 70.20% in blueberries, 65.93% in blackberries and 73.47% in raspberries. It is followed by Ca, whose share ranges from 9.49% in raspberries to 14.71% in blackberries. The highest content of phosphorus is in raspberries (9.61%), the least in blueberries (7.62%), while blackberries and strawberries have almost equal content of this element (8.77% and 8.36%). The presence of Mg in the samples of strawberries, blueberries and raspberries is very uniform (6.13%, 6.72% and 6.85%), while in blackberries it is represented by 9.72%. All analyzed samples of berries are characterized by a very low Na content (0.50% in strawberries, 1.14% in blueberries, 0.87% in blackberries and 0.58% in raspberries). The most abundant microelement is Mn, followed by Fe, Cu, Zn and Si;

- Using the cluster analysis and the Ward's method, analyzed elements were grouped based on their contents. Two clusters were observed on the dendrogram. The first cluster consists of two subclusters. Microelements are grouped in the first subcluster. In the second subcluster, the macroelements Ca, Mg, Na and P are grouped. As a macroelement with the highest content in all samples, K was isolated in a special cluster;
- Also, using the cluster analysis and the Ward's method, samples of strawberries, blueberries, blackberries, and raspberries were grouped according to the content of elements. Two clusters are observed on the dendrogram. The first cluster consists of strawberry samples and one raspberry sample (M2). The second cluster consists of two subclusters. The first subcluster contains raspberry samples M1, M3 and M4, and blackberry sample K2. In the second subcluster, two subclusters are observed, where all blueberry samples are grouped in the first, and blackberry samples K1, K3, K4 and K5 in the second. The grouping of samples using PCA analysis is in accordance with the results obtained using cluster analysis;
- Using spectrophotometric methods, the highest concentration of total polyphenolic compounds, total flavonoids and total anthocyanins was detected in acidified methanol extracts, while the lowest concentration was detected in aqueous extracts. This is consistent with the literature data. Comparing the results in relation to the analyzed samples, it is noticed that the highest content of total polyphenyl compounds, total flavonoids and total anthocyanins was detected in blueberry samples, followed by blackberries, raspberries and strawberries samples;
- Acidified methanol extracts have shown the highest antioxidant activity. This outcome was expected, given the previous results, where acidified methanol proved to be the most efficient in the extraction of total polyphenyl compounds, total flavonoids and total anthocyanins;
- DPPH and ABTS tests are based on the ability of antioxidants to scavenge free radicals. Most of the analyzed berry samples showed very close values for ABTS activity. In addition, the values obtained by DPPH analysis were higher than the values obtained by ABTS analysis. The reason may be because the DPPH radical can reduce hydrogen-donor compounds as well as free radicals, while the ABTS radical can be reduced by oxygen-containing

compounds. The activity of DPPH and ABTS radicals depends on the pH of the samples that are to be analyzed. The DPPH radical is sensitive in acidic solutions, while the ABTS test can be applied over a wider pH range;

- FRAP and RP are based on the ability of antioxidants to reduce Fe^{3+} ions to Fe^{2+} ions. The results obtained for the FRAP and RP test showed that the antioxidant capacity of blueberry samples is the highest, followed by samples of blackberries, raspberries and strawberries;
- To determine the optimal conditions for the analysis of berry extracts using cyclic voltammetry (CV), different pH value of the extracts and the scanning speed were applied. Three series of samples were prepared. Their pH values were adjusted to pH=2, pH=4.5 and pH=7, while scanning speeds were 10 mV/s, 25 mV/s and 100 mV/s;
- If a low scanning speed is applied, then there is practically no peak on the voltammogram due to sufficient time for relaxation of the double electric layer on the working electrode, while higher scanning speeds result in the appearance of anode current of higher intensity;
- Based on the obtained voltammograms, it is noticeable that pronounced anode peaks occur in the analysis of samples in acidic medium, at pH=2 and at pH=4.5, while at pH=7 there are no pronounced peaks. The anode current intensity at pH 4.5 is slightly higher than the anode current intensity at pH=2, so the pH value of all samples is set to 4.5, and the scanning speed is set to 100 mV/s;
- In order to include all groups of antioxidant compounds, cyclic voltammograms of the analyzed berries were recorded in the potential range of 0–800 mV. The first anode peak at potential values between 0.310 V and 0.350 V is based on the oxidation of flavonol (quercetin and its glucoside) and caffeic acid. Cyclic voltammograms of quercetin and quercetin-3-O- β -glucoside with the first reversible oxidation peak at $E_{pa}=0.320$ V and $E_{pa}=0.350$ V, corresponding to the oxidation of the 3', 4'-dihydroxide substituent on the B-ring. The second oxidation peak at 0.537 V of quercetin was probably due to creation of an intermediate radical during the oxidation process. Quercetin and quercetin-3-O- β -glucoside show almost reversible oxidation steps. The peak reduction of 3', 4'-dichinone that occurs during the

oxidation process of quercetin or quercetin-3-O- β -glucoside occurred at $E_{pc}=0.273$ V and $E_{pc}=0.318$ V, respectively;

- Anodic oxidation of caffeic acid shows irreversible anodic ($E_{pa}=0.344$ V) and cathodic ($E_{pc}=0.128$ V) waves;
- The second, third and fourth anode peaks at potentials between 0.426 V and 0.444 V, 0.524 V and 0.540 V, respectively 0.638 V and 0.756 V, can be attributed to anthocyanins and hydroxycinnamic acids (ferulic and coumaric acid);
- The cyclic voltamogram of malvidin-3-O-glucoside showed two peaks at 0.428 V and 0.543 V. The first peak is attributed to the oxidation of the -OH group of the B-ring, and the second peak may be due to oxidation of the 5,7-dihydroxyl group of the A-ring;
- Cyanidin-3-O-glucoside shows two anode peaks at $E_{pa}=0.529$ V and $E_{pa}=0.734$ V. These two peaks correspond to oxidations of the 3', 4'-OH groups in the B-ring;
- Based on Pearson's correlation coefficients, it is concluded that a high positive correlation exists between CV antioxidant capacity and total polyphenols (UPF) ($r^2=0.8963$), CV antioxidant capacity and total flavonoids (UF) ($r^2=0.9133$), CV antioxidant capacity and total anthocyanins (UA) ($r^2=0.8463$). In addition, high positive correlations were found between the antioxidant capacities obtained by CV with those obtained by FRAP ($r^2=0.9290$), RP ($r^2=0.8617$), DPPH ($r^2=0.8853$) and ABTS ($r^2=0.9382$) indicating that polyphenolic antioxidants with OH groups on the B-ring contribute the most to the total antioxidant capacity;
- Individual polyphenolic compounds were identified and quantified using the HPLC method. Among the phenolic acids, caffeic, ferulic, p-coumaric, and ellagic acid have been identified and quantified in the samples. Among the flavonols, quercetin, quercetin-pentoside, quercetin-galactoside, kaempferol, kaempferol-glucoside and rutin have been identified and quantified;
- The following anthocyanins were identified and quantified in strawberries: pelargonidine-3-O-glucoside, pelargonidine-3-O-rutinoside, cyanidin-3-O-glucoside, and cyanidin-3-O-malonylglucoside;

- The following anthocyanins were identified and quantified in raspberries: cyanidin-3-*O*-sophoroside, pelargonidin-3-*O*-sophoroside, cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-rutinoside;
- The following anthocyanins were identified and quantified in blackberries: cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-rutinoside, and cyanidin-3-*O*-malonylglucoside;
- The following anthocyanins were identified and quantified in blueberries: delphinidin-3-*O*-galactoside, delphinidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-arabinoside, cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, petunidin-3-*O*-arabinoside, petunidin-3-*O*-galactoside, peonidin-3-*O*-galactoside and malvidin-3-*O*-galactoside;
- Using cluster analysis, based on Euclidean distance, according to Ward's method, the samples were grouped into two clusters. The first cluster consists blueberry samples B2 and B3. The second cluster includes three subclusters. The first subcluster includes strawberry samples. The second subcluster includes raspberry samples and one blueberry sample, B1. Sample of blueberry B1 is characterized by a lower content of all identified individual anthocyanins, as well as a lower content of ferulic acid than samples B2 and B3 of blueberries. The third subcluster consists of samples of blackberry samples. The grouping of samples using PCA analysis is in aligned with the results obtained using cluster analysis;
- During the preparation of strawberry, blackberry, blueberry, and raspberry jams, it was found that with increasing temperature, cooking length and sugar content, the content of total polyphenolic compounds, total flavonoids and total anthocyanins decreases, with the least loss after 5 minutes of cooking at 90 °C, and with the greatest loss after 30 minutes of cooking at 105 °C;
- In jams with a higher amount of sugar, an approximately twofold decrease in the half-life of anthocyanins and an almost twofold increase in the constant rate of the degradation reaction were observed. The half-life of anthocyanins, $t_{1/2}$, in jams with a lower sugar content ranges from 12.9 minutes to 28.4 minutes, while in jams with a higher sugar content it ranges from 5.9 minutes to 15.9 minutes;
- The activation energy for the degradation reactions of total monomeric anthocyanins was calculated from the Arrhenius plot, and is 68.9 kJ/mol in

raspberry jam with higher sugar content and 53.6 kJ/mol in raspberry jam with lower sugar content; 57.4 kJ/mol in blackberry jam with a higher sugar content and 48.0 kJ/mol in blackberry jam with a lower sugar content; 51.0 kJ/mol in blueberry jam with a higher sugar content and 40.0 kJ/mol in blueberry jam with a lower sugar content; 61.0 kJ/mol in strawberry jam with a higher sugar content and 47.0 kJ/mol in strawberry jam with a lower sugar content;

- Pelargonidin-sophoroside was the most stable individual anthocyanin in raspberry jams. Cyanidin-rutinoside and cyanidin-sophoroside showed greater stability than cyanidin-3-glucoside, which was the most unstable of the individual anthocyanins identified in raspberry jams with higher and lower sugar content;
- In blackberry jam with a lower sugar content, the greatest stability was observed with cyanidin-3-rutinosides, followed by cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-malonylglucoside. Approximate stability of cyanidin-3-rutinosides and cyanidin-3-malonylglucosides was observed in blackberry jam with higher sugar content, while cyanidin-3-glucoside was the most unstable. Due to the higher amount of sugar in the jam, the conditions probably affect the formation of furfural and its derivatives. Namely, degradation products obtained from sugar are furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which have led to degradation of blackberry anthocyanins. In this case, the greater stability of cyanidin-3-malonylglucosides may be caused by the presence of a malonyl group which, due to steric disturbances, prevents or slows down the reaction of these compounds with anthocyanins;
- In blueberry jams, cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-glucoside were the most stable, while petunidin-3-arabinoside and delphinidine-3-arabinoside were the most unstable anthocyanins. The stability of individual anthocyanins in relation to the aglycone decreased in the following order: cyanidin > peonidin > petunidin > malvidin > delphinidine. Substituents on the B ring of anthocyanidins affect the stability of molecules (especially hydroxyl and methoxyl groups), so that the additional hydroxyl group on the B ring of delphinidine reduces its stability. Also, greater stability of all glucosides and galactosides than arabinosides was observed, due to the

presence of more stable hexose sugars (glucose and galactose) compared to pentose sugars (arabinose);

- In strawberry jams, greater stability of pelargonidin glycosides compared to cyanidin glycosides was observed. The stability of anthocyanidins depends on the type of substituents on the B ring, and the greater stability of pelargonidin is due to the presence of two H atoms in positions 3 and 5 on the B ring, while cyanidin is more susceptible to degradation due to the vicinal hydroxyl groups;
- Pelargonidin-3-rutinoside was less sensitive to thermal treatment than pelargonidin-3-glucoside, due to the presence of the disaccharide rutinosis, which consists of rhamnose and glucose. Approximate stability of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-malonylglucoside was observed in the sugar jam (the same was observed in blackberry jam), while the losses of cyanidin-3-malonylglucoside were higher in the sugar-low jam.

8. Prilog

Tabela 1. Sadržaj kafene, *p*-kumarne, ferulne i elaginske kiseline u uzorcima jagoda, u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kafena kiselina		<i>p</i> -Kumarna kiselina		Ferulna kiselina		Elaginska kiselina	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg /kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg /kg)	RSD (%)
J1	Metanol	0,708±0,007	0,99	2,40±0,02	0,83	1,05±0,02	1,90	110±3	2,73
	96% Etanol	0,644±0,005	0,78	1,49±0,03	2,01	1,246±0,007	0,56	105±2	1,90
	60% Etanol	0,50±0,02	4,00	1,59±0,05	3,14	1,198±0,005	0,42	80±2	2,50
	Voda	0,380±0,005	1,31	2,67±0,01	0,37	1,51±0,03	1,99	94±1	1,06
	Aceton	0,364±0,001	0,27	2,42±0,02	0,83	0,987±0,007	0,71	76±2	2,63
J2	Metanol	0,831±0,005	0,60	1,19±0,01	0,84	1,13±0,03	2,65	62±1	1,61
	96% Etanol	0,693±0,003	0,43	1,26±0,02	1,59	0,837±0,007	0,84	63±2	3,17
	60% Etanol	0,656±0,005	0,76	1,50±0,03	2,00	1,13±0,03	2,65	55±1	1,82
	Voda	0,671±0,002	0,30	1,44±0,02	1,39	0,830±0,007	0,84	53±2	3,77
	Aceton	0,395±0,001	0,25	1,18±0,03	2,54	0,769±0,008	1,04	52±1	1,92
J3	Metanol	0,724±0,005	0,69	1,78±0,04	2,25	1,21±0,01	0,83	68±3	4,41
	96% Etanol	1,02±0,01	0,98	1,48±0,03	2,03	1,04±0,02	1,92	66±1	1,52
	60% Etanol	0,674±0,004	0,59	0,79±0,01	1,26	1,25±0,01	0,80	51±2	3,92
	Voda	0,53±0,01	1,89	1,34±0,02	1,49	0,783±0,005	0,64	46±1	2,17
	Aceton	0,72±0,05	6,94	1,52±0,04	2,63	0,993±0,007	0,70	59±3	5,08

Tabela 2. Sadržaj kafene, *p*-kumarne, ferulne i elaginske kiseline u uzorcima kupina, u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kafena kiselina		<i>p</i> -Kumarna kiselina		Ferulna kiselina		Elaginska kiselina	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg /kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
K1	Metanol	n.d.	-	4,09±0,05	1,22	1,21±0,05	4,13	64±1	1,56
	96% Etanol	n.d.	-	3,38±0,07	2,07	1,19±0,07	5,88	72±2	2,78
	60% Etanol	n.d.	-	3,35±0,03	0,90	0,67±0,01	1,49	68±1	1,47
	Voda	n.d.	-	2,75±0,02	0,73	1,13±0,03	2,65	75±3	4,00
	Aceton	n.d.	-	2,32±0,01	0,43	0,80±0,05	6,25	72±2	2,78
K2	Metanol	n.d.	-	2,23±0,05	2,24	1,23±0,03	2,44	79±	2,53
	96% Etanol	n.d.	-	2,32±0,09	3,88	1,30±0,07	5,38	67±1	1,49
	60% Etanol	n.d.	-	2,90±0,05	1,72	1,28±0,02	1,56	79±2	2,53
	Voda	n.d.	-	1,81±0,06	3,31	1,13±0,02	1,77	81±3	3,70
	Aceton	n.d.	-	2,38±0,08	3,36	0,79±0,01	1,27	74±1	1,35
K3	Metanol	n.d.	-	2,08±0,04	1,92	1,46±0,05	3,42	69±2	2,90
	96% Etanol	n.d.	-	2,68±0,05	1,87	1,33±0,07	5,26	58±1	1,72
	60% Etanol	n.d.	-	2,28±0,07	3,07	1,29±0,03	2,33	73±2	2,74
	Voda	n.d.	-	1,61±0,02	1,24	1,28±0,05	3,91	68±1	1,47
	Aceton	n.d.	-	1,34±0,01	0,75	0,82±0,03	3,66	67±1	1,49

K4	Metanol	n.d.	-	2,08±0,03	1,44	1,86±0,08	4,30	87±2	2,30
	96% Etanol	n.d.	-	2,17±0,06	2,76	1,31±0,05	3,82	77±1	1,30
	60% Etanol	n.d.	-	2,19±0,07	3,20	1,50±0,06	4,00	67±2	2,99
	Voda	n.d.	-	1,94±0,05	2,58	1,29±0,04	3,10	80±3	3,75
	Aceton	n.d.	-	1,70±0,01	0,59	1,13±0,05	4,42	69±2	2,90
K5	Metanol	0,557±0,003	0,54	2,98±0,02	0,67	1,30±0,03	2,31	215±7	3,26
	96% Etanol	0,981±0,005	0,51	2,38±0,05	2,10	1,28±0,01	0,78	177±5	2,82
	60% Etanol	0,626±0,003	0,48	2,05±0,03	1,46	2,14±0,04	1,87	187±3	1,60
	Voda	0,377±0,001	0,26	2,17±0,05	2,30	1,50±0,03	2,00	170±5	2,94
	Aceton	0,546±0,004	0,73	1,95±0,07	3,59	1,28±0,02	1,56	143±4	2,80

Tabela 3. Sadržaj kafene, *p*-kumarne, ferulne i elaginske kiseline u uzorcima borovnica, u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kafena kiselina		<i>p</i> -Kumarna kiselina		Ferulna kiselina		Elaginska kiselina	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
B1	Metanol	8,07±0,05	0,62	n.d.	-	3,13±0,01	0,32	n.d.	-
	96% Etanol	8,35±0,04	0,48	n.d.	-	4,20±0,04	0,95	n.d.	-
	60% Etanol	7,37±0,05	0,68	n.d.	-	3,64±0,06	1,65	n.d.	-
	Voda	5,09±0,07	1,38	n.d.	-	3,00±0,03	1,00	n.d.	-
	Aceton	5,15±0,05	0,97	n.d.	-	4,52±0,05	1,11	n.d.	-
B2	Metanol	8,22±0,02	0,24	n.d.	-	15,6±0,1	0,64	n.d.	-
	96% Etanol	7,98±0,01	0,13	n.d.	-	19,3±0,1	0,52	n.d.	-
	60% Etanol	8,68±0,03	0,35	n.d.	-	20,3±0,3	1,48	n.d.	-
	Voda	6,39±0,06	0,94	n.d.	-	19,9±0,1	0,50	n.d.	-
	Aceton	7,13±0,07	0,98	n.d.	-	17,63±0,1	0,57	n.d.	-
B3	Metanol	11,43±0,06	0,52	n.d.	-	25,9±0,3	1,16	n.d.	-
	96% Etanol	9,01±0,05	0,55	n.d.	-	24,5±0,1	0,41	n.d.	-
	60% Etanol	9,06±0,09	0,99	n.d.	-	22,2±0,5	2,25	n.d.	-
	Voda	6,04±0,04	0,66	n.d.	-	22,43±0,4	1,78	n.d.	-
	Aceton	9,01±0,07	0,78	n.d.	-	24,5±0,1	0,41	n.d.	-

Tabela 4. Sadržaj kafene, *p*-kumarne, ferulne i elaginske kiseline u uzorcima malina, u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kafena kiselina		<i>p</i> -Kumarna kiselina		Ferulna kiselina		Elaginska kiselina	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg /kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
M1	Metanol	n.d.	-	2,35±0,01	0,43	1,18±0,01	0,85	85±1	1,18
	96% Etanol	n.d.	-	2,59±0,03	1,16	1,21±0,02	1,65	79±21	2,53
	60% Etanol	n.d.	-	1,98±0,05	2,53	1,33±0,01	0,75	61±1	1,64
	Voda	n.d.	-	1,46±0,02	1,37	1,29±0,03	2,33	86±32	3,49
	Aceton	n.d.	-	1,21±0,05	4,13	1,43±0,02	1,40	63±4	6,35
M2	Metanol	n.d.	-	3,63±0,1	2,75	1,29±0,03	2,33	78±2	2,56
	96% Etanol	n.d.	-	3,66±0,07	1,91	1,35±0,01	0,74	72±1	1,39
	60% Etanol	n.d.	-	1,99±0,03	1,51	1,27±0,05	3,94	88±5	5,68
	Voda	n.d.	-	2,71±0,04	1,48	1,28±0,04	3,13	88±1	1,14
	Aceton	n.d.	-	2,34±0,03	1,28	1,10±0,02	1,82	68±1	1,47
M3	Metanol	n.d.	-	3,26±0,02	0,61	1,45±0,03	2,07	91±31	1,10
	96% Etanol	n.d.	-	4,53±0,04	0,88	1,29±0,04	3,10	82±2	2,44
	60% Etanol	n.d.	-	3,93±0,01	0,25	1,39±0,06	4,32	83±1	1,20
	Voda	n.d.	-	2,24±0,03	1,34	1,25±0,07	5,60	86±3	3,49
	Aceton	n.d.	-	3,88±0,06	1,55	1,09±0,05	4,59	92±2	2,17

	Metanol	n.d.	-	2,15±0,03	1,40	1,41±0,01	0,71	76±2	2,63
	96% Etanol	n.d.	-	4,59±0,04	0,87	1,26±0,03	2,38	77±1	1,30
M4	60% Etanol	n.d.	-	2,38±0,02	0,84	1,33±0,02	1,50	88±2	2,27
	Voda	n.d.	-	1,48±0,01	0,68	1,34±0,08	5,97	62±1	1,61
	Aceton	n.d.	-	3,83±0,03	0,78	1,16±0,06	5,17	63±1	1,59

Tabela 5. Sadržaj flavonola u uzorcima jagoda u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kvercetin		Kvercetin-glukozid		Kvercetin-galaktozid		Kemferol		Kemferol-glukozid		Rutin	
		$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD
		(mg/kg)	(%)	(mg/kg)		(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
J1	Metanol	14,5±0,1	0,69	2,08±0,01	0,48	23,8±0,2	0,84	2,53±0,01	0,40	1,95±0,03	1,54	n.d.	-
	96% Etanol	18,8±0,1	0,53	1,12±0,01	0,89	27,6±0,2	0,72	2,25±0,01	0,44	2,85±0,05	1,75	n.d.	-
	60% Etanol	17,2±0,2	1,17	1,62±0,03	1,85	26,2±0,1	0,38	1,18±0,04	3,38	1,48±0,01	0,68	n.d.	-
	Voda	14,7±0,2	1,36	2,79±0,03	1,08	30,0±0,5	1,67	1,55±0,01	0,65	2,59±0,01	0,39	n.d.	-
	Aceton	15,7±0,1	0,64	2,18±0,05	2,29	14,8±0,7	4,74	2,11±0,02	0,95	1,97±0,03	1,52	n.d.	-
J2	Metanol	11,7±0,2	1,72	2,51±0,01	0,40	25,4±0,5	1,97	1,30±0,02	1,54	2,15±0,01	0,47	n.d.	-
	96% Etanol	13,0±0,3	2,30	1,85±0,01	0,54	22,3±0,3	1,35	1,16±0,03	2,59	2,49±0,05	2,01	n.d.	-
	60% Etanol	10,6±0,1	0,94	1,95±0,03	1,54	22,6±0,3	1,33	1,03±0,01	0,97	2,12±0,05	2,36	n.d.	-
	Voda	13,0±0,3	2,30	1,11±0,01	0,90	19,5±0,2	1,03	0,94±0,01	1,06	1,74±0,01	0,57	n.d.	-
	Aceton	11,4±0,2	1,75	1,48±0,01	0,68	21,6±0,2	0,93	0,78±0,04	5,13	2,04±0,03	1,47	n.d.	-
J3	Metanol	10,6±0,1	0,95	2,28±0,04	1,75	24,0±0,7	2,92	1,56±0,01	0,64	2,03±0,05	2,47	n.d.	-
	96% Etanol	11,5±0,1	0,87	1,38±0,01	0,73	23,4±0,6	2,57	1,03±0,02	1,95	1,94±0,01	0,51	n.d.	-
	60% Etanol	10,3±0,2	1,94	1,66±0,02	1,20	26,5±0,4	1,51	1,60±0,02	1,25	1,56±0,01	0,64	n.d.	-
	Voda	8,7±0,2	2,29	1,17±0,02	1,71	20,4±0,1	0,49	0,76±0,01	1,32	1,74±0,03	1,72	n.d.	-
	Aceton	11,9±0,1	0,84	1,27±0,03	2,35	20,4±0,2	0,98	1,23±0,01	0,81	1,58±0,01	0,63	n.d.	-

Tabela 6. Sadržaj flavonola u uzorcima kupina u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kvercetin		Kvercetin-glukozid		Kvercetin-galaktozid		Kemferol		Kemferol-glukozid		Rutin	
		$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD
		(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
K1	Metanol	9,34±0,04	0,43	1,39±0,02	1,44	23,5±0,1	0,43	1,50±0,02	1,33	1,71±0,03	1,75	1,93±0,03	1,55
	96% Etanol	7,71±0,01	0,13	1,33±0,01	0,75	20,6±0,2	0,97	1,28±0,03	2,34	1,59±0,01	0,63	1,68±0,01	0,59
	60% Etanol	8,58±0,05	0,58	1,28±0,03	2,34	21,0±0,2	0,95	1,42±0,04	2,82	1,65±0,02	1,21	1,17±0,02	1,71
	Voda	6,67±0,01	0,15	0,80±0,01	1,24	17,5±0,3	1,72	0,96±0,01	1,04	1,18±0,03	2,55	1,32±0,03	2,27
	Aceton	7,55±0,03	0,40	0,92±0,01	1,09	18,3±0,2	1,09	1,06±0,02	1,88	1,23±0,01	0,82	1,17±0,02	1,72
K2	Metanol	8,55±0,02	0,23	1,87±0,02	1,07	25,2±0,4	1,59	1,46±0,01	0,68	1,59±0,03	1,89	5,38±0,02	0,37
	96% Etanol	7,63±0,05	0,65	1,53±0,02	1,31	21,8±0,3	1,37	1,16±0,04	3,45	1,34±0,02	1,50	4,50±0,01	0,22
	60% Etanol	7,01±0,03	0,43	1,31±0,03	2,30	23,2±0,1	0,43	1,31±0,02	1,53	1,17±0,01	0,85	4,82±0,01	0,21
	Voda	5,34±0,02	0,37	1,02±0,01	0,98	17,4±0,2	1,15	0,95±0,01	1,05	0,86±0,02	2,32	3,33±0,05	1,50
	Aceton	6,24±0,01	0,16	1,41±0,01	0,71	18,4±0,1	0,54	1,07±0,03	2,80	1,25±0,01	0,80	3,71±0,03	0,81
K3	Metanol	8,17±0,03	0,37	1,54±0,03	1,95	23,5±0,2	0,85	1,35±0,04	2,96	1,80±0,02	1,11	3,47±0,05	1,44
	96% Etanol	7,31±0,01	0,14	1,20±0,01	0,83	19,7±0,2	1,02	1,09±0,01	0,92	1,55±0,02	1,29	3,08±0,01	0,32
	60% Etanol	6,78±0,02	0,29	1,29±0,03	2,33	17,1±0,3	1,76	1,24±0,02	1,61	1,69±0,03	1,78	3,34±0,01	0,30
	Voda	5,59±0,01	0,18	0,91±0,01	1,10	15,1±0,5	3,32	0,83±0,01	1,20	1,04±0,03	2,89	2,65±0,03	1,13
	Aceton	6,35±0,02	0,32	1,08±0,02	1,86	18,8±0,4	2,13	1,00±0,02	2,00	1,18±0,01	0,85	3,08±0,01	0,33

K4	Metanol	7,32±0,05	0,68	1,65±0,03	1,81	26,8±0,3	1,12	1,43±0,02	1,39	2,42±0,04	1,65	2,24±0,03	1,34
	96% Etanol	6,40±0,04	0,62	1,35±0,01	0,74	21,8±0,1	0,46	1,11±0,01	0,90	1,79±0,03	1,68	1,32±0,01	0,76
	60% Etanol	6,13±0,03	0,49	1,56±0,03	1,92	24,8±0,2	0,81	1,28±0,03	2,35	2,19±0,01	0,46	1,71±0,01	0,59
	Voda	6,04±0,02	0,33	1,05±0,02	1,91	18,2±0,4	2,19	0,88±0,02	2,27	1,32±0,03	2,27	1,23±0,03	2,44
	Aceton	6,21±0,01	0,16	1,14±0,01	0,88	18,4±0,3	1,63	0,94±0,01	1,06	1,49±0,02	1,34	1,19±0,01	0,84
K5	Metanol	8,57±0,04	0,47	14,6±0,2	1,37	37,0±0,3	0,81	2,38±0,05	2,10	2,01±0,01	0,50	14,49±0,03	0,21
	96% Etanol	8,43±0,02	0,24	12,2±0,1	0,82	34,3±0,2	0,58	1,83±0,01	0,55	1,64±0,02	1,22	11,12±0,01	0,09
	60% Etanol	7,58±0,03	0,40	13,0±0,2	1,54	29,5±0,2	0,68	2,07±0,02	0,97	1,44±0,01	0,70	12,53±0,01	0,08
	Voda	5,28±0,02	0,38	10,4±0,2	1,92	26,8±0,4	1,49	1,46±0,03	2,06	1,09±0,02	1,83	8,65±0,03	0,35
	Aceton	5,75±0,02	0,35	10,5±0,3	2,85	27,9±0,3	1,08	1,48±0,02	1,35	1,15±0,02	1,74	9,53±0,01	0,10

Tabela 7. Sadržaj flavonola u uzorcima borovnica u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kvercetin		Kvercetin-glukozid		Kvercetin-galaktozid		Kemferol		Kemferol-glukozid		Rutin	
		$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD	$c_{sr} \pm SD$	RSD
		(mg/kg)	(%)	(mg/kg)		(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
B1	Metanol	14,8±0,3	2,02	2,27±0,01	0,44	28,8±0,1	0,35	1,08±0,01	0,92	2,10±0,01	0,48	8,5±0,1	1,17
	96% Etanol	10,5±0,2	1,90	2,12±0,07	3,30	22,6±0,2	0,89	0,89±0,01	1,13	1,53±0,03	1,96	6,2±0,1	1,61
	60% Etanol	12,0±0,1	0,83	2,17±0,04	1,84	27,4±0,1	0,36	0,87±0,01	1,15	1,82±0,04	2,20	7,5±0,2	2,68
	Voda	15,3±0,1	0,65	2,13±0,01	0,47	26,6±0,3	1,13	1,14±0,01	0,88	2,01±0,05	2,49	5,1±0,1	1,96
	Aceton	11,4±0,3	2,63	1,98±0,03	1,51	23,2±0,3	1,29	0,62±0,02	3,23	1,77±0,01	0,57	4,60±0,05	1,09
B2	Metanol	16,0±0,1	0,63	2,31±0,04	1,73	33,3±0,1	0,30	1,76±0,04	2,27	2,63±0,04	1,52	6,35±0,07	1,10
	96% Etanol	10,7±0,2	1,87	1,53±0,05	3,28	25,5±0,2	0,78	1,41±0,05	3,56	2,07±0,01	0,48	4,91±0,04	0,81
	60% Etanol	14,0±0,2	1,43	2,08±0,07	3,37	20,6±0,1	0,49	1,14±0,01	0,88	2,01±0,03	1,49	5,7±0,1	1,75
	Voda	16,3±0,3	1,84	1,81±0,04	2,21	24,8±0,3	1,21	0,96±0,02	2,08	2,66±0,04	1,50	4,88±0,03	0,61
	Aceton	11,0±0,1	0,91	1,78±0,01	0,56	21,6±0,3	1,39	0,74±0,01	1,34	1,74±0,05	2,88	4,66±0,04	0,86
B3	Metanol	13,8±0,1	0,72	1,93±0,03	1,55	30,1±0,1	0,33	1,62±0,03	1,86	2,36±0,01	0,42	24,6±0,1	0,41
	96% Etanol	14,1±0,2	1,42	1,86±0,04	2,15	24,7±0,2	0,81	1,32±0,04	3,02	2,03±0,04	1,97	22,0±0,2	0,91
	60% Etanol	13,0±0,1	0,77	1,64±0,05	3,05	22,9±0,1	0,44	1,42±0,01	0,70	1,69±0,01	0,59	19,8±0,1	0,51
	Voda	13,7±0,2	1,46	1,35±0,01	0,74	20,4±0,3	1,47	0,79±0,01	1,27	2,29±0,03	1,31	21,1±0,3	1,42
	Aceton	11,6±0,3	2,58	1,42±0,04	2,81	23,6±0,3	1,27	0,72±0,01	1,39	1,71±0,01	0,58	20,6±,3	1,46

Tabela 8. Sadržaj flavonola u uzorcima malina u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Kvercetin		Kvercetin-glukozid		Kvercetin-galaktozid		Kemferol		Kemferol-glukozid		Rutin	
		c _{sr} ±SD (mg/kg)	RSD (%)	c _{sr} ±SD (mg/kg)	RSD (%)	c _{sr} ±SD (mg/kg)	RSD (%)	c _{sr} ±SD (mg/kg)	RSD (%)	c _{sr} ±SD (mg/kg)	RSD (%)	c _{sr} ±SD (mg/kg)	RSD (%)
M1	Metanol	12,7±0,2	1,58	1,24±0,03	2,42	23,1±0,1	0,43	1,93±0,03	1,56	2,20±0,02	0,91	5,01±0,01	0,20
	96% Etanol	12,3±0,2	1,62	1,22±0,01	0,82	21,5±0,2	0,93	1,56±0,01	0,64	2,12±0,01	0,47	4,06±0,01	0,25
	60% Etanol	6,8±0,2	2,96	1,16±0,02	1,72	25,8±0,2	0,78	1,43±0,01	0,70	1,57±0,02	1,27	3,46±0,03	0,87
	Voda	11,6±0,3	2,58	1,47±0,03	2,04	22,8±0,3	1,32	1,96±0,03	1,53	2,62±0,03	1,15	3,97±0,03	0,76
	Aceton	8,0±0,5	6,27	1,17±0,02	1,71	21,4±0,5	2,33	1,76±0,02	1,14	1,75±0,03	1,72	4,85±0,05	1,03
M2	Metanol	11,3±0,3	2,66	1,72±0,02	1,16	23,9±0,4	1,67	2,08±0,02	0,96	2,38±0,02	0,84	4,73±0,01	0,21
	96% Etanol	11,8±0,3	2,54	1,58±0,01	0,63	23,1±0,3	1,30	1,96±0,01	0,51	2,36±0,01	0,42	3,98±0,01	0,25
	60% Etanol	5,7±0,1	1,75	1,34±0,01	0,75	24,4±0,1	0,41	1,53±0,01	0,65	1,85±0,01	0,54	4,42±0,03	0,68
	Voda	10,5±0,2	1,91	1,27±0,05	3,95	20,4±0,2	0,98	1,93±0,05	2,59	2,32±0,05	2,16	4,23±0,01	0,24
	Aceton	3,5±0,1	2,90	1,27±0,03	2,37	21,9±0,1	0,46	1,63±0,03	1,84	2,13±0,03	1,41	3,29±0,01	0,30
M3	Metanol	9,9±0,3	3,02	1,81±0,05	2,76	24,2±0,2	0,83	1,81±0,01	0,55	2,15±0,05	2,33	5,50±0,04	0,73
	96% Etanol	10,4±0,1	0,96	1,25±0,01	0,80	24,1±0,2	0,83	1,93±0,05	2,59	2,25±0,05	2,23	5,23±0,01	0,19
	60% Etanol	5,7±0,2	3,51	1,31±0,01	0,76	24,3±0,3	1,23	1,61±0,01	0,62	1,81±0,01	0,55	6,11±0,02	0,33
	Voda	9,4±0,2	2,12	1,30±0,03	2,31	21,6±0,5	2,32	1,72±0,01	0,58	2,20±0,03	1,37	3,68±0,02	0,54
	Aceton	3,3±0,1	3,03	1,25±0,01	0,80	23,0±0,4	1,74	1,80±0,01	0,55	1,86±0,01	0,54	5,15±0,03	0,58
M4	Metanol	8,7±0,5	5,73	1,03±0,03	2,91	27,2±0,3	1,10	1,64±0,03	1,83	2,01±0,03	1,49	3,94±0,05	1,27

96% Etanol	8,6±0,4	4,63	1,15±0,01	0,87	23,8±0,1	0,42	1,66±0,03	1,81	1,85±0,02	1,08	3,87±0,01	0,26
60% Etanol	5,0±0,1	2,01	2,46±0,01	0,41	29,8±0,2	0,67	1,66±0,01	0,60	1,64±0,01	0,61	4,16±0,01	0,24
Voda	8,8±0,1	1,13	1,31±0,03	2,29	25,2±0,4	1,59	2,01±0,03	1,50	2,26±0,03	1,33	3,88±0,03	0,77
Aceton	3,8±0,2	5,29	1,32±0,01	0,76	25,9±0,3	1,16	1,79±0,02	1,12	1,94±0,01	0,52	3,91±0,01	0,26

Tabela 9. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima jagoda u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Pelargonidin-3- <i>O</i> -glukozid		Pelargonidin-3- <i>O</i> -rutinozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -malonilglukozid	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
J1	Metanol	72±1	1,38	3,21±0,03	0,94	2,17±0,03	1,38	9,6±0,1	1,04
	96% Etanol	69±1	1,45	2,77±0,05	1,81	2,07±0,05	2,41	7,8±0,1	1,28
	60% Etanol	68±2	2,95	3,4±0,1	2,96	1,95±0,01	0,51	10,7±0,2	1,86
	Voda	44±1	2,29	1,16±0,05	4,30	0,98±0,01	1,02	4,70±0,1	2,13
	Aceton	58±2	3,43	1,98±0,02	1,01	1,67±0,02	1,19	6,2±0,1	1,61
J2	Metanol	83±3	3,62	5,8±0,1	1,73	8,24±0,05	0,61	10,3±0,2	1,95
	96% Etanol	72±3	4,16	5,4±0,2	3,68	9,6±0,1	1,04	11,03±0,05	0,45
	60% Etanol	72±2	2,78	5,0±0,1	1,99	2,78±0,05	1,80	8,87±0,03	0,34
	Voda	61±2	3,29	4,3±0,1	2,34	7,0±0,1	1,42	9,6±0,1	1,04
	Aceton	64±1	1,56	2,38±0,07	2,94	3,92±0,07	1,79	7,46±0,05	0,67
J3	Metanol	118±3	2,55	5,74±0,05	0,87	11,2±0,2	1,78	12,1±0,2	1,66
	96% Etanol	116±4	3,44	5,35±0,03	0,56	8,2±0,2	2,43	11,4±0,2	1,76
	60% Etanol	104±3	2,88	5,20±0,03	0,58	11,2±0,1	0,90	11,7±0,3	2,57
	Voda	72±2	2,76	3,62±0,03	0,83	6,06±0,05	0,83	7,28±0,03	0,41
	Aceton	64±1	1,56	4,92±0,02	0,41	4,2±0,1	2,40	9,3±0,1	1,08

Tabela 9. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima kupina u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -malonilglukozid	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
K1	Metanol	317±5	1,58	19,2±0,2	1,04	9,17±0,03	0,33
	96% Etanol	322±3	0,93	17,2±0,1	0,58	7,68±0,05	0,65
	60% Etanol	313±4	1,28	20,6±0,2	0,97	8,25±0,07	0,85
	Voda	300±7	2,34	13,0±0,1	0,77	5,97±0,05	0,84
	Aceton	283±4	1,41	10,8±0,1	0,93	6,11±0,02	0,33
K2	Metanol	321±7	2,18	13,9±0,3	2,16	11,5±0,1	0,87
	96% Etanol	316±2	0,63	12,2±0,1	0,82	10,0±0,1	1,00
	60% Etanol	316±6	1,90	14,0±0,2	1,43	10,7±0,2	1,88
	Voda	295±3	1,02	9,8±0,1	1,02	7,3±0,1	1,38
	Aceton	308±9	2,92	11,7±0,4	3,42	8,3±0,2	2,40
K3	Metanol	199±4	2,01	12,0±0,1	0,83	6,0±0,2	3,31
	96% Etanol	194±6	3,09	9,9±0,1	1,01	6,96±0,07	1,01
	60% Etanol	180±7	3,89	8,1±0,1	1,23	8,6±0,2	2,32
	Voda	167±3	1,80	6,7±0,2	2,97	5,85±0,06	1,03
	Aceton	175±7	4,00	7,9±0,3	3,79	7,64±0,04	0,52

K4	Metanol	219±8	3,65	15,5±0,3	1,94	22,8±0,4	1,75
	96% Etanol	225±2	0,89	15,8±0,2	1,26	21,2±0,2	0,94
	60% Etanol	258±4	1,55	12,7±0,4	3,15	17,4±0,3	1,72
	Voda	175±1	0,57	11,2±0,1	0,89	22,2±0,5	2,25
	Aceton	171±2	1,17	9,7±0,1	1,03	15±0,3	2,00
K5	Metanol	417±1	0,24	13,1±0,2	1,52	11,1±0,2	1,80
	96% Etanol	389±1	0,26	9,2±0,2	2,16	10,4±0,1	0,96
	60% Etanol	358±3	0,84	13,4±0,3	2,24	9,1±0,1	1,10
	Voda	347±2	0,58	12,6±0,2	1,59	8,2±0,2	2,42
	Aceton	316±4	1,26	10,8±0,1	0,93	7,7±0,1	1,30

Tabela 10. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima borovnica u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Delfinidin-3- <i>O</i> -galaktozid		Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid		Delfinidin-3- <i>O</i> -arabinozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -galaktozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
B1	Metanol	60,7±0,5	0,82	22,2±0,1	0,45	n.d.	-	27,8±0,3	1,08	25,0±0,1	0,40
	96% Etanol	66,0±0,3	0,45	18,1±0,3	1,66	n.d.	-	24,0±0,2	0,83	19,5±0,1	0,51
	60% Etanol	47,0±0,2	0,43	15,0±0,2	1,33	n.d.	-	25,0±0,2	0,80	20,4±0,2	0,98
	Voda	51,8±0,1	0,19	17,3±0,1	0,58	n.d.	-	16,8±0,1	0,60	17,8±0,3	1,68
	Aceton	47,8±0,1	0,21	20,3±0,4	1,97	n.d.	-	20,5±0,3	1,46	19,0±0,2	1,05
B2	Metanol	121±2	1,66	120±1	1,66	159,5	1,25	140±2	1,43	33,8±0,3	0,89
	96% Etanol	107±1	0,94	103±1	0,97	131,9	0,76	122±1	0,82	28,1±0,1	0,36
	60% Etanol	110±1	0,91	77±1	1,30	137,3	0,73	103±2	1,94	29,6±0,3	1,01
	Voda	105±2	1,90	76±1	1,31	122,9	1,63	97±1	1,03	30,6±0,5	1,63
	Aceton	100±1	1,00	72±2	2,79	132	2,27	106±1	0,95	36,3±0,7	1,93
B3	Metanol	141±3	2,13	169±3	1,78	131,1	0,76	86±1	1,16	159±2	1,26
	96% Etanol	118±1	0,85	151±5	3,32	100,1	1,00	78±1	1,27	139±1	0,72
	60% Etanol	151±3	1,99	149±3	2,01	147,9	2,03	81±2	2,47	141±2	1,41
	Voda	109,7±0,8	0,73	106±2	1,88	125,4	1,59	50±1	1,99	121±3	2,48
	Aceton	89±1	1,12	147±5	3,40	130	0,77	57±1	1,76	134±1	0,75

Tabela 10. Nastavak

Uzorak	Rastvarač	Cijanidin-3- <i>O</i> -arabinozid		Petunidin-3- <i>O</i> -arabinozid		Petunidin-3- <i>O</i> -galaktozid		Peonidin-3- <i>O</i> -galaktozid		Malvidin-3- <i>O</i> -galaktozid	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
B1	Metanol	19,7±0,1	0,51	12,2±0,1	0,82	15,7±0,1	0,64	32,5±0,1	0,31	33,4±0,3	0,90
	96% Etanol	17,1±0,1	0,59	17,5±0,1	0,57	18,3±0,3	1,64	32,8±0,4	1,22	29,1±0,1	0,34
	60% Etanol	15,8±0,1	0,63	15,1±0,3	1,98	18,7±0,1	0,53	25,9±0,5	1,93	28,0±0,1	0,36
	Voda	12,8±0,2	1,56	8,3±0,1	1,20	8,1±0,1	1,24	20,2±0,2	0,99	28,1±0,3	1,07
	Aceton	16,3±0,3	1,84	15,6±0,5	3,21	10,7±0,2	1,86	36,0±0,3	0,83	31,2±0,6	1,92
B2	Metanol	34,4±0,2	0,58	99±2	2,02	83±2	2,41	53,4±0,1	0,19	23,7±0,7	2,95
	96% Etanol	32,0±0,2	0,63	89±1	1,13	64±1	1,55	51±1	1,96	21,8±0,3	1,38
	60% Etanol	42,2±0,5	1,19	90±2	2,22	60±1	1,65	55,4±0,1	0,18	21,9±0,1	0,46
	Voda	16,6±0,2	1,20	66±1	1,51	48±1	2,09	22,2±0,5	2,26	14,0±0,3	2,15
	Aceton	19,8±0,1	0,50	74±1	1,36	53±1	1,88	31,5±0,6	1,91	16,7±0,2	1,20
B3	Metanol	32,2±0,7	2,17	129±3	2,33	162±2	1,23	65±1	1,54	44,7±0,3	0,67
	96% Etanol	26,1±0,5	1,91	103±1	0,97	143±3	2,10	54±1	1,85	40,7±0,1	0,25
	60% Etanol	32,3±0,3	0,93	125±2	1,60	131±2	1,53	46±1	2,17	36,2±0,3	0,83
	Voda	27,4±0,5	1,83	118±3	2,54	110±2	1,82	49,0±0,1	0,20	27,6±0,1	0,36
	Aceton	38,5±0,5	1,30	141±1	0,71	118±3	2,55	53±1	1,89	32,1±0,1	0,31

Tabela 11. Sadržaj pojedinačnih antocijana u uzorcima malina u metanolnim, 96% etanolnim, 60% etanolnim, vodenim i acetonskim ekstraktima

Uzorak	Rastvarač	Cijanidin-3- <i>O</i> -soforozid		Pelargonidin-3- <i>O</i> -soforozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid		Cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid	
		$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)	$c_{sr} \pm SD$ (mg/kg)	RSD (%)
M1	Metanol	92±2	2,18	8,14±0,03	0,37	23,1±0,2	0,87	28,4±0,2	0,70
	96% Etanol	68±3	4,40	7,07±0,05	0,71	19,3±0,3	1,55	23,9±0,3	1,26
	60% Etanol	80±1	1,25	6,58±0,03	0,46	19,7±0,1	0,51	17,6±0,3	1,70
	Voda	64±1	1,56	5,92±0,04	0,68	21,3±0,1	0,47	19,1±0,1	0,52
	Aceton	70±1	1,43	6,13±0,04	0,65	9,1±0,1	1,10	23±0,3	1,30
M2	Metanol	71±4	5,67	7,3±0,1	1,37	43,2±0,5	1,16	54±1	1,86
	96% Etanol	50±	1,99	6,46±0,05	0,77	34,8±0,3	0,86	49,8±0,4	0,80
	60% Etanol	70±1	1,43	5,42±0,03	0,55	39,8±0,3	0,75	40,7±0,7	1,72
	Voda	56±1	1,78	4,49±0,04	0,89	40,5±0,7	1,73	31,4±0,5	1,59
	Aceton	54±1	1,86	4,90±0,04	0,82	42,1±0,2	0,48	26,5±0,1	0,38
M3	Metanol	201±1	1,50	8,5±0,1	1,18	50,0±0,2	0,40	27,1±0,3	1,11
	96% Etanol	167±3	1,20	7,8±0,2	2,56	43,6±0,3	0,69	22,3±0,3	1,35
	60% Etanol	135±2	2,22	6,8±0,1	1,47	39,1±0,5	1,28	25±0,1	0,40
	Voda	129±3	1,55	5,8±0,1	1,73	30,9±0,2	0,65	19,6±0,2	1,02
	Aceton	145±2	1,38	7,0±0,1	1,43	34,4±0,3	0,87	21,0±0,5	2,38
M4	Metanol	83±1	1,21	7,02±0,08	1,14	25,0±0,1	0,40	n.d.	-

96% Etanol	76±1	1,32	5,72±0,05	0,87	26,0±0,1	0,39	n.d.	-
60% Etanol	65±1	1,53	5,2±0,1	1,92	24,4±0,8	3,28	n.d.	-
Voda	55±2	3,63	4,35±0,07	1,61	20,8±0,4	1,92	n.d.	-
Aceton	52±1	1,91	6,1±0,1	1,65	22,1±0,3	1,35	n.d.	-

9. Literatura

- Adams, J. B., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, **24**(7): 747-762.
- Aguirre, M.J., Chen, Y.Y., Isaacs, M., Matsuhiro, B., Mendoza, L., Torres, S., *Food Chemistry* **121**(1): 44-48.
- Aikawa, J. K., *Magnesium: Its Biological Significance*, FL CRC Press, Boca Raton, USA, 1981.
- Ali, S. A., El-Regal, N. S., Saeed, S. M., *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 2015, **8**(8): 5-16.
- Alseroury, F. A., Almeelbi, T., Khan, A., Barakata, M. A., Al-Zahrani, J. H., Alali, W., *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2018, **11**(4): 373-378.
- Ancos, B., Gonzales, E., Cano, P., *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 1999, **208**(1): 33-38.
- Anderson, J. J. B., *Phosphorous: physiology in Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd Ed., Academic Press, London, UK, 2003.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., *Journal of Proteome Research*, 2006, **5**, 196-201.
- Anttonen, M. J., Karjalainen, R. O., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, **18**(8): 759-769.
- Anttonen, M. J., Hoppula, K. I., Nestby, R., Verheul, M. J., Karjalainen, R. O., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(7): 2614-2620.
- Anketa o strukturi poljoprivrednih gazdinstava – Voćarstvo, Republički zavod za statistiku, Beograd, Republika Srbija, 2018.
- AOAC International, *Method Validation Program (OMA/PVM Department), including Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*, AOAC International, Rockville, Maryland, USA, 2000.
- Aras N.K., Taman, D. Y. A., *Trace Element Analysis of Food and Diet*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2006.
- Araujo, P., *Journal of Chromatography B*, **877**(23): 2224-2234.
- Arnao, M., *Trends in Food Science and Technology*, 2000, **11**(11): 419-421.
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H. P., Bast, A., *Food Chemistry and Toxicology*, 2004, **42**(1): 45-49.
- Aydin, I., *Microchemical Journal*, 2008, **90**(1): 82-87.
- Ariga, T., Ido, K., Zhu, Y., Hokura, A., Inagaki, K., *Chemical Letters*, 2017, **46**(12): 1751-1753.

- Azad, A. K. M., Ali, M. A., Akter, S. M., Rahman, M. J., Maruf, A., *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2014, **2**(2): 30-35.
- Bae, H-S., Kim, H. J., Kang, J. H., Kudo, R., Hosoya, T., Kumazawa, S., Jun, M., Kim, O-Y., Ahn, M-R., *Natural Product Communications*, 2015, **10**(6): 963-968.
- Bagdatlioglu, N., Nergiz, C., Ergonul, P. G., *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2010, **5**(3): 421-428.
- Baker, A. J. M., *Journal of Plant Nutrition*, 1981, **3**: 643-654.
- Baker, R., Berry, N., Hui, Y. H., Barrett, D., *Fruit Preserves and Jams, in: Processing Fruit, Science and Technology*, 2nd Ed., CRC Press, USA, 2005.
- Baker, S. B., Worthley, L. I., *Critical Care of Resuscitation*, 2002, **4**(4): 301-306.
- Banjarnahor, S., Artanti, N., *Medical Journal of Indonesia*, 2014, **23**(4): 239-244.
- Barnard, T. W., Crockett, M. I., Ivaldi, J. C., Lundberg, P. L., Yates, D. A., Levine, P. A., Sauer, D. J., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**(9): 1231-1239.
- Barnes, K. W., *Atomic Spectroscopy*, 1997, **18**(3): 84-100.
- Barnes, J., Nguyen, H., Shen, S., Schug, K., *Journal of Chromatography A*, 2009, **1216**(23): 4728-4735.
- Battsengel, E., Murayama, T., Fukushi, K., Nishikizawa, S., Chonokhuu, S., Ochir, A., Tsetsgee, S., Davaasuren, D., *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, **17**(13): 4668.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Hudek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D., *Overview of polyphenols and their properties* In: *Polyphenols: Properties, Recovery and Application*, 1st Ed., Elsevier Woodhead Publishing, UK, 2018.
- Bell, D. R., Gochenaur, K., *Journal of Applied Physiology*, 2006, **100**(4): 1164-1170.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J., *Analytical Biochemistry*, 1996, **239**(1): 70-76.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J., *Methods in Enzymology*, 1999, **299**: 15-27.
- Benzie, I. F. F., Devaki, M., *The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications* In: *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity*, 1st Ed., John Wiley and Sons, New York, USA, 2017.
- Blackhall, M., Berry, R., Davies, N., Walls, J., *Food Chemistry*, 2018, **245**: 280-285.
- Bobinaite, R., Viškėlis, P., Venskutonis, P., *Food Chemistry*, 2012, **132**(3): 1495-1501.
- Brenner, I. B., Zander, A. T., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2000, **55**(8): 1195-1240.

- Broadley, M., White, P., Hammond, J., Zelko, I., Lux, A., 2007, *New Phytologist*, **173**(4): 677-702.
- Brownmiller, C., Howard, L. R., Prior, R. L., *Journal of Food Science*, 2008, **73**(5), H72-H79.
- Bubols, G., Viana, D. R., Medina-Remon, A., von Poser, G., Lamuela-Raventos, R. M., Eifler-Lima, V. L., Garcia, S. C., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, **13**(3): 318-334.
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., Rice-Evans, C. A., *Biochemical Journal*, 1998, **330**(Pt3): 1173-1178.
- Cao, G., Prior, L., *Clinical Chemistry*, 1998, **44**(6): 1309-1315.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L., *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, **22**(5): 749-760.
- Campos, A. M., Lissi, E. A., *International Journal of Chemical Kinetics*, 1997, **29**(3): 219-224.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C.A., *Food Chemistry*, 2009, **113**(4): 859-871.
- Clifford, M. N., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, **79**(3): 362-72.
- Clifford, M. N., Scalbert, A., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, **80**(7): 1118-1125.
- Coates, E. M., Popa, G., Gill, C. I., McCann, M. J., Mc Dougall, G. J., Stewart, D., Rowland, I., *Journal of Carcinogenesis*, 2007, **6**(1): 4-15.
- Counet, C., Callemien, D., Collin, S., *Food Chemistry*, 2006, **98**: 649-657.
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P., Dartigues, J. F., *The European Journal of Epidemiology*, 2000, **16**(4): 357-363.
- Cohen, J. I., *New England Journal of Medicine*, 2000, **343**(7): 481-492.
- Chan, P. C., Xia, Q., Fu, P. P., *Journal of Environmental Science and Health, Part C, Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 2007, **25**(3): 211-244.
- Chauhan, R., Awasthi, S., Srivastava, S., Dwivedi, S., Pilon-Smits, E., Dhankher, O., Tripathi, R., *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2019, **49**(21): 1937-1958.
- Chaves, J. O., Souza, M., Silva, L., Lachos-Perez, D., Tores-Mayanga, P., Machado, A. P., Forster-Carneiro, T., Vazquez-Espinoza, M., Gonzales-de-Peredo, A., Barbero, G., Rostagno, M. A., *Frontiers in Chemistry*, 2020, **8**: 864.
- Chen, L. J., Games, D. E., Jones, J., *Journal of Chromatography A*, 2003, **988**(1): 95-105.
- Chellan, P., Sadler, P. J., *Philosophical Transactions A*, 2015, **373**: 20140182.

- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**(2): 192-208.
- Chérif, M., Asselin, A., Bélanger, R., *Phytopathology*, 1994, **84**, 236-242.
- Chérif, M., Benhamou, N., Menzies, J. G., Bélanger, R., *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1992, **41**(6), 411-425.
- Cutrim, C. S., Cortez, M. A. S., *International Journal of Dairy Technology*, 2018, **71**(3): 564-578.
- Czarnek, K., Terpilowska, S., Siwicki, A., *Central European Journal of Immunology*, 2015, **40**(2): 236-242.
- Dai, J., Mumper, R. J., *Molecules* 2010, **15**(10): 7313-7352.
- Debicki-Pospisil, J., Lovric, T., Trinajstić, N., Sabljic, A., *Journal of Food Science*, 1983, **48**(2): 411-416.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez-Aparicio, A., Paredes-Lopez, O., *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 2000, **40**(3): 173-289.
- Dennuad, J., Howes, A., Poussel, E., Mermet, J. M., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2001, **56**(1): 101-112.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J., *Biochemistry Journal*, 1997, **324**(1):1-18.
- Deshmukh, R., Ma, J., Belanger, R., *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**, 1858.
- De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2007, **8**(3): 347-352.
- Drózdź, P., Šežienė, V., Pyrzynska, K., *Biological Trace Element Research*, 2018, **181**(1): 173-177.
- Dubuisson, C., Poussel, E., Mermet, J. M., Todoli, J. L., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, **13**(1): 63-67.
- Duthie, G. G., Gardner, P. T., Kyle, J. A. M., *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003, **62**(3): 599-603.
- Dyrby, M., Westergaard, N., Stapelfeldt, H., *Food Chemistry*, 2001, **72**(4): 431-437.
- Đurić, M., Mašković, P., Murtić, S., Valjković, B., Čurčić, S., Paunović, G., Bošković Rakočević, B., *Hemijaska Industrija*, 2014, **68**(2): 241-245.
- EC, Commission of the European Communities, Commission Regulation (EC) No. 1881/2006, Regulation of setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of European Union L364-5/L364-24, 2006.
- El-Shafey, N. M., AbdElgawad, H., *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, **34**(6): 2165-2177.

- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B.D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., Dempsey, J. L., *Journal of Chemical Education*, 2018, **95** (2): 197-206.
- Eurachem/CITAC Guide, *Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement*, 2015, <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**(14): 8139-8144.
- FAOSTAT, 2019, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fang-Chiang, H-J., Wrolstad, R. E., *Food Chemistry and Toxicology*, 2005, **70**(3): C198-C202.
- Fawe, A., Abou-Zaid, M., Menzies, J. G., Bélanger, R. R., *Phytopathology*, 1998, **88**, 396-401.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1721**(1-3): 174-184.
- Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., da Cruz, M. T. G., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M. P. M., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004, **12**(13): 3581-3589.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S.E., *European Journal of Nutrition*, 2006, **45**(1): 7-18.
- Flores, G., Ruiz del Castillo, M. L., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, **39**(1): 55-61.
- Flutto, L., *Pectin, Properties and Determination*, in: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd Ed., Danisco, New Century, KS, USA, 2003.
- Fossen, T., Cabrita, L., Andersen, O., *Food Chemistry*, 1998, **63**(4): 435-440.
- Folin, O., Ciocalteau, V., *Journal of Biological Chemistry*, 1927, **73**(2): 627-648.
- Folin, O., Denis, W., *Journal of Biological Chemistry*, 1912, **12**: 239-243.
- Fuhrman, B., Buch, S., Vaya, J., *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997, **66**(2): 267-275.
- Francis, F. J., *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 1989, **28**(4): 273-309.
- Fridovich, I., *Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxygen Toxicity in Free Radicals in Biology*, Academic Press, New York, USA, 1976.
- Gadkari P. V., Balaraman, M., *Food Bioproducts Processing*, 2015, **93**: 122-138.
- Galleta, G. H., Ballington, J. R., *Blueberries, Cranberries and Lingonberries*, in: *Fruit Breeding, Vol. 2, Vine and Small Fruits*, John Wiley and Sons, Inc., USA, 1996.

- Gallestey, J. B., *Cluster analysis*, in: *Encyclopedia Britannica*, 2020, <https://www.britannica.com/topic/cluster-analysis>. Accessed 31 August 2021
- Gamela, R., Costa, V., Pereira-Filho, E., *Food Analytical Methods*, 2020, **13**(1): 69-77.
- Gancel, A., Feneuil, A., Acosta, O., Perez, A. M., Vaillant, F., *Food Research International*, 2011, **44**(7): 2243-2251.
- Garazd, M. M., Garazd, Y. L., Khilya, V. P., *Chemistry of Natural Compounds*, 2003, **39**(1): 54-121.
- Garcia-Viguera C., Zafrilla P., *Changes in anthocyanins during food processing: influence on color*, In: *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants*, American Chemical Society, Washington, USA, 2001.
- Garcia-Viguera C., Zafrilla P., Artes F., Romero F., Abellán P., Tomás-Barberán F.A., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, **78**(4): 565-573.
- Genchi, G., Sinicropi, M., Lauria, G., Carocci, A., Catalano, A., *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, **17**(11): 3782.
- Gill, S. S., Tuteja, N., *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, **48**(12): 909-930.
- Giusti M.M., Wrolstad R.E., *Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy*, In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1st Ed., John Wiley & Sons, New York, USA, 2003, F1.2.1.-F1.2.13.
- Grant, C. A., Flaten, D. N., Tomasiewicz, D. J., Sheppard, S. C., *Canadian Journal of Plant Science*, 2001, **81**(1): 211-224.
- Grembecka, M., Szefer, P., *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, **185**(9): 9139-9160.
- Gonzalez, A. G., Herrador, M. A., *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, **26**(3): 227-238.
- Goretti Penido, M., Alon, U.S., *Pediatric Nephrology*, 2012, **27**(11): 2039-2048.
- Gordon, M. H., *The mechanism of antioxidant action in vivo*, In: *Food Antioxidants*, Elsevier, London, UK, 1990.
- Guedes M. N. S., Abreu, C. M. P., Maro, L. A. C., Pio, R., Abreu, J. R., Oliveira, J. O., *Acta Scientiarum – Agronomy*, 2013, **35**(2): 191-196.
- Guo, W., Nazim, H., Liang, Z., Yang, D., *The Crop Journal*, 2016, **4**(2): 83-91.
- Guzman, J. D., *Molecules*, 2014, **19**(12): 19292-19349.
- Gupta, S., Kismali, G., Aggarwal, B., *BioFactors*, 2013, **39**(1): 2-13.
- Grassino, A. N., Brnčić, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., Brnčić, S. R., *Food Chemistry*, 2016, **198**: 93-100.
- Gülçin, I., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2010, **11**(1): 210-218.

- Hakala, M., Lapveteläinen, A., Huopalahti, R., Kallio, H., Tahvonen, R., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2003, **16**(1): 67-80.
- Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R., *Food Research International*, 2000, **33**(6): 517-524.
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, M. I., Mykkanen, H. M., Törrönen, A. R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**(6): 2274-2279.
- Halliwell, B., *Annual Review of Nutrition*, 1996, **16**: 33-50.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, Oxford University Press, UK, 2007.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, O., *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, **16**(6): 845-850.
- Hartwig, A., *Mutation Research*, 2001, **475**(1-2): 113-121.
- Harbourne, N., Jacquier, J.C., Morgan, D.J., Lyng, J.G., *Food Chemistry*, 2008, **111**(1): 204-208.
- Hegedüs, A., Balogh E., Engel, R., *HortScience*, 2008, **43**(6): 1711-1715.
- Heim, K., Tagliaferro, A., Bobilya, D., *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, **13**(10): 572-584.
- Heinonen, M., *Molecular Nutrition and Food Research*, 2007, **51**(6): 684-691.
- Hellström, J., Mattila, P., Karjalainen, R., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, **31**: 12-19.
- Horinouchi, S., *Journal of Antibiotics*, 2008, **61**(12): 709-728.
- Hoeing, M., *Talanta*, 2001, **54**, 1021-1038.
- Horwitz, W., *Analytical Chemistry*, 1982, **54**(1): 67A-76A.
- Hotta, H., Ueda, M., Nagano, S., Tsvjino, Y., Koyama, J., *Analytical Biochemistry*, 2002, **303**(1): 66-72.
- Huang, J. W., Cunningham, S. D., *New Phytologist*, 1996, **134**: 73-84.
- Hui, C., Bin, Y., Xiaoping, Y., Long, Y., Chunye, C., Mantian, M., Wenhua, L., *Nutrition and Cancer*, 2010, **62**(8): 1128-1136.
- Ido, K., Matsushita, R., Fuji, S-I, Miyashita, S-I, Umemura. T., Hokura, A., Inagaki, K., *Analytical Sciences*, 2020, **36**(6): 717-722.
- Iglesias, M. T., Lozano, J. E., *Journal of Food Engineering*, 2004, **62**(3): 215-223.
- Ilyasov, I., Beloborodov, V., Selivanova, I., Terekhov, R., *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(3): 1131.
- Ilboudo, O., Tapsoba, I., Bonzi-Coulibay, Y., Gerbaux, P., *European Journal of Mass Spectrometry*, 2012, **18**(5): 465-473.

- International Atomic Energy Agency (IAEA), *Development and use of reference materials and quality control materials*, Vienna, Austria, 2003, https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_1350_web.pdf
- Ivanović, J., Tadić, V., Dimitrijević, S., Stamenić, M., Petrović, S., Zizović, I., *Industrial Crops and Products*, 2014, **53**: 274-281.
- Islam, E. U., Yang, X. E., He, Z. L., Mahmood, Q., *Journal of Zhejiang University, Science B*, 2007, **8**(1): 1-13.
- Ismail, N. S. M., Ramli, N., Hani, N. M., Meon, Z., *Sains Malaysiana*, 2012, **41**(1): 41-45.
- International Organization for Standardization, Guide 8402: Quality Vocabulary, ISO, Geneva, 1994.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, M., Medvidović-Kosanović, M., *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht*, 2007, **103**(8): 1-10.
- Johnson, S., Arjmandi, B., *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2013, **13**(8): 1142-1148.
- Jourdes, M., Pouységu, L., Deffieux, D., Teissedre, P. L., Quideau S., *Hydrolyzable Tannins: Gallotannins and Ellagitannins, In: Natural Products*, Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, 2013.
- Kabata-Pendias, A., *Trace Elements in Soils and Plants*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2010.
- Kähkönen, M., Hopla, A., Heinonen, M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(8): 4076-4082.
- Kampa, M., Nifli P., Notas, G., Castanas, E., *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **159**: 79-113.
- Kang, J., Thakali, K.M., Jensen, G.S., Wu, X., *Plant Foods for Human Nutrition*, 2014, **70**(1): 56-62.
- Karak, P., *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2019, **10**(4): 1567-1574.
- Karlsons, A., Osvalde, A., Čekstere, G., Pormale, J., *Agronomy Research*, 2018, **16**(2): 454-463.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F., Hosseini, S. S., *LWT-Food Science and Technology*, 2019, **105**(9): 182-189.
- Katakam, L. N. R., Aboul-Enein, H. Y., *Current Pharmaceutical Analysis*, 2020, **16**(4): 392-403.

- Kasprzak, M., Erxleben, A., Ochocki, J., *RSC Advances*, 2015, **5**: 45853-45877.
- Kaštelan-Macan, M., *Kemijska analiza u sustavu kvaliteta*, Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska, 2003.
- Khamsucharit, P., Laohaphatanalert, K., Gavinlertvatana, P., Sriroth, K., Sangseethong, K., *Food Science and Biotechnology*, 2018, **27**(3): 623-629.
- Khan, M. N., Sarwar, A., Bhutto, S., Wahab, M. F., *International Journal of Food Properties*, 2010, **13**(4): 789-799.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., Lim, S. M., *Food and Nutrition Research*, 2017, **61**(1): 1361779.
- Kim, J., Kwon, Y., Chun, W., Kim, T., Sun, J., Yu, C., Kim, M., *Food Chemistry*, 2010, **120**: 539-543.
- Kim, E. H., Kim, S. L., Kim, S. H., Chung, I. M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**(41): 10196-202.
- Kim, Y. J., Seo, S. G., Choi, K., Kim, J. E., Kang, H., Chung, M. Y., Lee, H. J., *Journal of Food Science*, 2014, **79**(5): H1011-H1017.
- Kirca, A., Cemeroglu, B., *Food Chemistry*, 2003, **81**(4): 583-587.
- Keserović, Z., Magazin, N., Milić, B., Dorić, M., *Voćarstvo i vinogradarstvo (deo Voćarstvo)*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Republika Srbija, 2016.
- Korkina, L., Afanas'Ev, I., *Advances in pharmacology*, 1996, **38**: 151-163.
- Ko, M. J., Cheigh, C. I., Cho, S. W., Chung, M. S., *Journal of Food Engineering*, 2011, **102**(4), 327-333.
- Kuligowski, M., Pawłowska, K., Jasiska-Kuligowska, I., Nowak, J., *Cyta Journal of Food*, 2017, **15**(1): 27-33.
- Kumar, A., Chauhan, G. S., *Carbohydrate Polymers*, 2010, **82**(2): 454-459.
- Kumar, S., Pandey, A., *The Scientific World Journal*, 2013, 162750.
- Larrea-Marín, M. T., Pomares-Alfonso, M. S., Gómez-Juaristi, M., Sánchez-Muniz, F. J., Ródenas de la Rocha, S., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, **23**(8): 814-820.
- Li, X., Xiong, C., Sun, K., Fang, F., Zhang, Q., *Journal of the Korean Physical Society*, 2021, **78**(9): 737-742.
- Li, D., Zhang, Y., Liu, Y., Sun, R., Xia, M., *Journal of Nutrition*, 2015, **145**(4): 742-748.
- Li, F-K., Gong, A-J., Qiu, L-N., Zhang, W-W., Li, J-R., Liu, Y., Li, J-D., Gao, G., Yuan, X-T., *Microchemical Journal*, 2019, **147**: 93-101.
- Liang, N., Kitts, D. D., *Nutrients*, 2016, **8**(1): 16.

- Liew, S. Q., Chin, L. N., Yusof, Y. A., *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2014, **2**: 231-236.
- Lippert, F., *Macroelements: Ca, Na, K, P, Cl, In: The Impact of Nutrition and Diet on Oral Health*, Karger Publishers, Basel, Switzerland, 2020.
- Liu, Z., Jia, J., Chen, F., Yang, F., Zu, Y., Yang, L., *Molecules*, 2014, **19**(12): 19471–19490.
- L'Abbe, M. R., *Calcium: physiology, in Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd Ed., Academic Press, London, UK, 2003.
- Leclere, L., Van Cutsem, P., Michiels, C., *Frontiers in Pharmacology*, 2013, **4**: 128.
- Lesschaeve, I., Noble, A. C., *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, **81**(1): 330S-335S.
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M., *Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108**(22): 4916-4922.
- Lopes da Silva, F., Escribano-Bailón, M. T., Pésos Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J., Santos-Buelga, C., *LWT-Food Science and Technology*, 2007, **40**(2): 374-382.
- Low, F., Zhang, L., *Talanta*, 2012, **101**: 346-352.
- Lynch, R., Duckworth, R., *Microelements: Part I: Zn, Sn, Cu, Fe, I, In: The Impact of Nutrition and Diet on Oral Health*, Karger Publishers, Basel, Switzerland, 2020.
- Macheix, J., Fleurie, A., Billot, J., *Fruit phenolics*, 1st Ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 1990.
- Maleki, A., Zarasvand, M. A., *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2008, **39**(2): 335-340.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, **79**(5): 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C., *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, **81**(1), 230S–242S.
- Mannio, J., Järvinen, O., Tuominen, R., Verta, M., *Science of the Total Environment*, 1995, **160**: 433-439.
- Mansour, S. A., *Heavy Metal Contamination as a Global Problem and the Need for Prevention/Reduction Measurements in Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions*, 1st Ed., Wiley Blackwell, New Jearsy, USA, 2014.
- March, R., Brodbelt, J., *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, **43**(12): 1581-1617.
- Marković, Z., *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics*, 2016, **10**(1): 135-150.

- Marichy, M., Mermet, M., Mermet, J. M., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1990, **45**(11): 1195-1201.
- Marschner, H., *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd Ed., Academic Press, London, UK, 1995.
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., Silva, P., *Molecules*, 2020, **25**(17): 3809.
- Mattila, P., Hellström, J., Törrönen, R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(19): 7193-7199.
- Mazza, G., Brouillard, R., *Food Chemistry*, 1987, **25**(3): 207-225.
- Mazur, S. P., Nesa, A., Wold, A.-B., Remberg, S.F., Martinsenc, B. K., Aaby, K., *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 2014, **64**(5): 442-453.
- McLaughlin, S. B., Wimmer, R., *New Phytologist*, 1999, **142**: 373-417.
- Mermet, J. M., *Analytica Chimica Acta*, 1991, **250**(C): 85-94.
- Mermet, J. M., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, **13**(5): 419-422.
- Metivier, R. P., Francis, F. J., Clydesdale, F. M., *Journal of Food Science*, 1980, **45**(4): 1099-1100.
- Meschter, E.E., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953, **1**(8): 574-579.
- Michell, A. R., *Sodium: physiology; in Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd Ed., Academic Press, London, UK, 2003.
- Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., *Food Chemistry*, 2012, **135**(4): 2138-2146.
- Milivojević, J., *Posebno voćarstvo 3 – Jagodaste voćke*, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Beograd, Republika Srbija, 2018.
- Milivojević, J., Nikolić, M., Zbornik radova sa 5. Savetovanja „Inovacije u voćarstvu“, Beograd, 2015, 5-18.
- Milošević, T., Milošević, N., Glišić, I., Mladenović, J., *Plant Soil Environment*, 2012, **58**(7): 322-327.
- Miller, N. J., Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th Ed., Pearson Education Limited, London, UK, 2005.
- Mitić, M., *Chemia Naissensis*, 2020, **3**(2): 46-63.
- Mitić, M. N., Souquet, J. M., Obradović, M. V., Mitić, S. S., *Food Science and Biotechnology*, 2012, **21**(6): 1619-1626.
- Mitić, S., *Elektroanalitička hemija*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Republika Srbija, 2008.

- Mishima, K., Kawamura, H., Kawakami, R., Shota, I.T., Inoue, Y., Hirota, T., Harada, T., Sharmin, T., Misumi, M., Suetsugu, T., Mishima, K., *Solvent Extraction Research and Development*, 2015, **22**(2): 177-86.
- Mratinić, E., *Jagoda*, Partenon, Beograd, Republika Srbija, 2018.
- Mrmošanin, J., Pavlović, A., Krstić, J., Mitić, S., Tošić, S., Stojković, M., Micić, R., Đorđević, M., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, **67**: 163-171.
- Mohammed-Ziegler, I., Billes, F., *Journal of Molecular Structure*, 2002, **618**(3): 259-265.
- Morón Ú. M., Castilla-Cortázar, I., *Protection against oxidative stress and IGF-I deficiency conditions In: Antioxidant Enzyme*, Intech Open, 2012.
- Moura, S. C. S. R., Rocha Tavares, P. E., Germer, S. P. M., Nisida, A. L. A. C., Alves, A. B., Kanaan, A. S., *Food and Bioprocess Technology*, 2012, **5**(6): 2488-2496.
- Može, Š., Polak, T., Gašperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Poklar Urlih, N., Abram, V., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**(13): 6998-7004.
- Mullen, W., McGinn, J., Lean, M. E. J., MacLean, M. R., Gardner, P., Duthie, G. G., Zokota, T., Croyier, A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**(18): 5191-5196.
- Mullen, W., Archeveque, M. A., Edwards, C. A., Matsumoto, H., Crozier, A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**(23): 11157-11164.
- Muller, A., Pozebon, D., Dressler, V.L., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2020, **35**(10): 2113-2131.
- Nakamura, H., Nakamura, K., Yodai, J., *Annual Review of Immunology*, 1997, **15**: 351-369.
- Naozuka, J., Vieira, E. C., Nascimento, A., N., Oliveira, P., V., *Food Chemistry*, 2011, **124**: 1667-1672.
- Navarro, M. P., Vaquero, M. P., *Potassium: physiology, in Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd Ed., Academic Press, London, UK, 2003.
- Nikolić, M., Pavlović, A., Mitić, S., Tošić, S., Mitić, M., Kaličanin, B., Manojlović, D., Stanković, D., *European Journal of Horticultural Science*, 2019, **84**(3): 152-160.
- Nikolić, M., Pavlović, A., Mitić, S., Tošić, S., Pecev Marinković, E., Đorđević, M., Micić, R., *Analytical Methods*, 2016, **8**: 4844-4852.
- Numata, Y., Tanaka, H., *Food Chemistry*, 2011, **126**(2): 751-755.
- Nyman, A., Kumpulainen, J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(9): 4183-4187.
- NT Technical Report, *Internal quality control, Handbook for chemical laboratories*, Nordic Innovation Centre, TR569, 2011.

- Okatan, V., *Folia Horticulturae*, 2020, **32**(1): 79-85.
- Olano-Martin, E., Gibson, G.R., Rastell, R. A., *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **93**(3): 505-511.
- Oliveira Souza, M., Ribeiro, M. A., Carneiro, M. T. W. D., Athayde, G. P. B., de Castro, E. V. R., da Silva, F. L. F., Matos, W. O., de Queiroz Ferreira, R., *Fuel*, 2015; **154**: 181-187.
- Ohkami, H., Tazawa, K., Yamashita, I., Shimizu, T., Murai, K., Kobashi, K., Fujimaki, M., *Japanese Journal of Cancer Research*, 1995, **86**(6): 523-529.
- Oyaizu, M., *The Japanese Journal of Nutrition*, 1986, **103**(2): 413-419.
- Pagán, J., Ibarz, A., *Journal of Food Engineering*, 1999, **39**(2): 193-201.
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Pérez, M., Hernández-Pérez, T., *Plant Foods for Human Nutrition*, 2010, **65**(3): 299-308.
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., Yu, L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(3): 566-573.
- Pavlović A. V., Dabić D. Č., Momirović, N. M., Dojčinović, B. P., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., Natić, M. M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(17): 4188-4194.
- Papuc, C., Goran, G., Predescu, C., Nicorescu, V., Stefan, G., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017, **16**(6): 1243-1268.
- Pienta, K. J., Naik, H., Akhtar, A., Yamazaki, K., Replogle, T. S., Lehr, J., Donat, T. L., Tait, L., Hogan, V., Raz, A., *Journal of the National Cancer Institute*, 1995, **87**(5): 348-353.
- Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Stipčević, T., Martinez, S., *Food Chemistry*, 2010, **121**(3): 820-825.
- Pineau, A., Fauconneau, B., Sappino, A-P., Deloncle, R., Guillard, O., *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2014, **28**(2): 147-150.
- Plessi, M., Bertelli, D., Albasini, A., *Food Chemistry*, 2007, **100**(1): 419-427.
- Poirier, L., Nelson, J., Gilleland, G., Wall, S., Berhane, L., Lopez-Linares, F., *Energy & Fuels*, 2017, **31**(8): 7809-7815.
- Pohl, H., Wheeler, J., Murray, E., *Metal Ions in Life Sciences*, 2013, **13**: 29-47.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(10): 4290-4302.
- Prochazková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., *Fitoterapia*, 2011, **82**(4): 513-523.

- Pravilnik o kvalitetu voćnih džemova, želea, marmelade, pekmeza i zaslađenog kesten pirea, Službeni glasnik RS, 101/2015.
- Rababah T.M., Al-Mahasneh M.A., Kilani I., Yang W., Alhamad M.N., Ereifej K., Al-u' datt M., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, **91**(6): 1096-1102.
- Radwan, M. A., Salama, A. K., *Food and Chemical Toxicology*, 2006, **44**(8): 1273-1278.
- Rao, A. V., Snyder, D. M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**(7): 3871-3883.
- Rajković, M. B., Mitrović, M., Antić-Mladenović, S., *Zaštita Materijala*, 2019, **60**(4): 342-359.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, **26**(9-10): 1231-1237.
- Reilly, C., *The Nutritional Trace Metals*, Wiley, Chichester, UK, 2004.
- de Reuse, H., Vinella, D., Cavazza, C., *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, **3**: 94.
- Reyes-Carmona, J., Yousef, G., Martínez-Peniche, R., Lila, M. A., *Journal of Food Science*, 2005, **70**(7): S497-S503.
- Rechner, A. R., Kroner, C., *Thrombosis Research*, 2005, **116**(4): 327-334.
- Rice-Evans, C., *Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes In: Oxidative Stress, Lipoproteins and Cardiovascular Dysfunction*, Portland Press, London, UK, 1995.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, **20**(7): 933-956.
- Rodrigues Sá, R., Cruz Caldas, J., Andrade Santana, D., Lopes, M. V., Lopes dos Santos, W., Andrade Korn, M., Freitas Santos, A., *Food Chemistry*, 2019, **273**: 15-23.
- Roginsky, V., Lissi, E., *Food Chemistry*, 2005, **92**(2): 235-254.
- Rommel A., Heatherbell D.A., Wrolstad R.E., *Journal of Food Science*, 1990, **55**(4): 1011-1017.
- Roy, M. C., Alam, M., Saeid, A., Das, B. C., Mia, B., Rahman, A., Eun, J.B., Ahmed, M., *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, **42**(1): e13411.
- Roy, S., Khanna, S., Alessio, H.M., Vider, J., Bagchi, D., Bagchi, M., Sen, C., *Free Radical Research*, 2002, **36**(9): 1023-1032.
- Roewer, N., Broscheit, J., *Use of delphinidin against Staphylococcus aureus*, U.S. Patent Application No. 14/389,492; 2013a.

- Roewer., N., Broscheit, J., *Delphinidin complex as an antiphlogistic or immunosuppressive active ingredient*, U.S. Patent Application No. 14/443,166; 2013b.
- Rubin, R., Strayer, D.S., *Rubins pathology, Clinicopathologic Foundations of Medicine*, 5th Ed., Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2008.
- Rupashinge, H. P., Kathirvel, P., Huber, G., *Molecules*, 2011, **16**(12): 9783-9791.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., Carle, R., *Journal of Food Science*, 2006, **71**(8):, C504-C512.
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*, in *Antioxidants*, Intech Open, 2019.
- Santos, W. P., Castro, J. T., Bezerra, M. A., Fernandes, A. P., Ferreira, S. L. C., Korn, M. G., *Microchemical Journal*, 2009, **91**(2): 153-158.
- Santovac, D., Markićević, L.J. , *Kako obezbediti kvalitet rezultata ispitivanja*, Akreditaciono telo Srbije, Beograd, Republika Srbija, 2012, <http://www.ats.rs/>
- Şanlı, S., Lunte, C., *Analytical Methods*, 2014, **6**: 3858-3864.
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V., *Journal of Food Science*, 2010, **75**(4): C328-C335.
- da Silva, E., Farias, L. O., Cadore, S., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, **68**: 65-72.
- Singh, K., Khanna, A. K., Chander, R., *Indian Journal of Experimental Biology*, 1999, **37**(10): 1025-1026.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Ravento, R. M., *Methods in Enzymology*, 1999, **299C**(1): 152-178.
- Scheffler, G. L., Pozebon, D., Beauchemin, D., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, **34**(5): 891-898.
- Schmidt, U. S., Koch, L., Rentschler, C., Kurz, T., Endreß, H.-U., Schuchmann, H. P., *Food Biophysics*, 2015, **10**(2): 217-227.
- Schmidt, S. B., Husted, S., *Plants*, 2019, **8**(10): 381.
- Seares, A. L., de Olivera Souza, M., Lionel-Mateus, V., De Ameida, C. M., *Microchemical Journal*, 2021, **163**: 105917.
- Seeram N. P., *Berries*, In: *Nutritional oncology*, 2nd Ed. Academic Press, London, UK, 2006.
- Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**(4): 1415-1422.

- Sharpless, K. E., Thomas, J. B., Christopher, S. J., Greenberg, R. R., Sander, L. C., Schantz, M. M., Welch, M. J., Wisw, S. A., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, **389**(1): 171-178.
- Shireen, F., Nawaz, M. A., Chen, C., Zhang, Q., Zheng, Z., Sohail, H., Sun, J., Cao, H., Huang, Y., Bie, Z., *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(7): 1856.
- Shinoda, Y., Komura, H., Homma, S., Murata, M., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, **69**(11): 2129-2137.
- Skjelkvåle, B. L., Andersen, T., Fjeld, E., Mannio, J., Wilander, A., Johansson, K., Jensen, J. P., Moiseenko, T., *Ambio*, 2001, **30**(1): 2-10.
- Skrede G., Wrolstad R. E., Durst R.W., *Journal of Food Science*, 2000, **65**(2): 357-364.
- Souza, S. O., Costa, S. S., Brum, B. C., Santos, S. H., Garcia, C A., Araujo, R. G., *Food Chemistry*, 2019, **273**: 57-63.
- Spasić, S., Jelić-Ivanović, Z., Spasojević-Kalimanovska, V., *Opšta biohemija*, Beograd, Republika Srbija, 2002.
- Stahl-Pehe A., Hesecker H., *Ernährungs Umschau*, 2014, **61**: M318-M321.
- Stepan, M., Musli, P., Poussel, E., Mermet, J. M., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2001, **56**(4), 443-453.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(3): 607-616.
- Sudhakar, D. V., Maini, S. B., *Journal of Food Processing and Preservation*, 2000, **24**(3): 209-227.
- Subhashini, R., Rao U. S., Sumathi, P., Gunalan, G., *Indian Journal of Science and Technology*, 2010, **3**(2): 188-192.
- Suwito, H., Mustofa, J., Kristanti, A. N., Puspaningsih, N. N. T., *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2014, **6**(5):1076-1088.
- Szajdek, A., Borowska, J. E., *Plant Foods for Human Nutrition*, 2008, **63**(4): 147-156.
- Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Tasić, S., Menković, N., Stević, T., Đorđević, B., *Plant Foods for Human Nutrition*, 2009, **64**(3): 212-217.
- Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., Enck, P., *European Journal of Nutrition*, 2017, **56**(7): 2215-2244.
- Taylor, T., LCGC North America, 2014, 32(4):
<https://www.chromatographyonline.com/view/core-shell-particles-hplc-present-and-future>
- Tiwari, A. K., Saha, S. N., Yadav, V. P., Upadhyay, U. K., Katiyar, D., Mishra, T., *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 2017, **13**(1): 39-47.

- Tiwari, B. K., *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **71**: 100-109.
- Thompson, M., The amazing Horwitz function, AMC Technical Brief No. 17, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2004.
- Todoli, J. L., Gras, L., Hernandis, V., Mora, J., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, **17**(2): 142-169.
- Todorović M., Đurđević P., Antonijević V., *Optičke metode instrumentalne analize*, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Republika Srbija, 1997.
- Tošić, S. B., Mitić, S. S., Velimirović, D. S., Stojanović, G. S., Pavlović, A. N., Pecevar-Marinković, E. T., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, **95**(11): 2271-2278.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa H., *Nature*, 2000, **405**(6787): 647-655.
- Tsao, R., *Nutrients*, 2010, **2**(12): 1231-1246.
- Tunali, M., Tunali, M. M., Yenigun, O., *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 2021, **23**: 149-157.
- Turturică, M., Oancea, A. M., Râpeanu, G., Bahrim, G., *The Annals of the University Dunarea De Jos of Galati, Fascicle VI - Food Technology*, 2015, **39**(1): 9-24.
- Trabelsi, S. K., Tahar, N. B., Abdelhedi, R., *Electrochimica Acta*, 2004, **49**(9): 1647-1654.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., Dangles, O., *Chemical Reviews*, 2016, **116**(9): 4937-4982.
- Trošt, K., Golc-Wondra, A., Prošek, M., Milivojević, L., *Journal of Food Science*, 2008, **73**(8): S405-S411.
- Torskangerpoll, K., Andersen, O. M., *Food Chemistry*, 2005, **89**(3): 427-440.
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., Osawa, T., *Biochemical Pharmacology*, 1996, **52**(7): 1033-1039.
- U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Guidelines or the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program, USA, 2015.
- U.S. National Academies, Institute of Medicine, *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*, The National Academies Press, Washington, USA, 2011.
- U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28, Fruits and Fruit Juice, 2015, <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index>.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 (Slightly revised), 2016, <http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/mafcl>

- U.S. National Academies, Institute of Medicine, *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*, The National Academies Press, Washington, USA, 2001.
- Vanini, G., Souza, M., Carneiro, M. T. W. D., Filgueiras, P., Bruns, R., Romao, W., *Microchemical Journal*, 2015, **120**: 58-63.
- Vanitha, T., Khan, M., *Role of Pectin in Food Processing and Food Packaging, In Pectins - Extraction, Purification, Characterization and Applications*, IntechOpen, London, UK, 2019. 10.5772/intechopen.83677.
- Vatai, T., Škerget, M., Knez, Z., *Journal of Food Engineering*, 2009, **90**(2): 246–254.
- Vattem, D. A., Shetty, K., *Journal of Food Biochemistry*, 2005, **29**(3): 234-266.
- Veljković, J., Pavlović, A., Mitić, S., Tošić, S., Stojanović, G., Kaličanin, B., Stanković, D., Stojković, M., Mitić, M., Brčanović, J., *Journal of Food Nutrition and Research*, 2013, **52**(1): 12-24.
- Verbeyst, L., Van Crombruggen, K., Van der Plancken, I., Hendrickx, M., Van Loey, A., *Journal of Food Engineering*, 2011, **105**(3): 513-521.
- Villa, J. E. L., Pereira, C. D., Cadore, S., *Microchemical Journal*, 2015, **121**: 199-204.
- Vinčić M., *Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost odabranih ekstraktata tropova bobičastog voća*, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Republika Srbija, 2017.
- Volden, J., Grethe, I., Borge, A., Gunnar, B., Magnor, B., Thygesen, I., Wicklund, T., *Food Chemistry*, 2008, **109**(3): 595-605.
- Vogt, D., Vogt, T., Wolf, B., Neuroth, M., Otto, M., *Fuel*, 2017, **196**: 185-194.
- Vulić, J., Velićanski, A., Četojević-Simin, D., Tumbas Šaponjac, V., Đilas, S., Cvetković, D., Markov, S., *Acta Periodica Technologica*, 2014, **45**: 99-116.
- Wang, S. Y., Jiao, H. J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(11): 5677-5684.
- Wang, W.D., Xu, S.Y., *Journal of Food Engineering*, 2007, **82**(3): 271-275.
- Wani, A. L., Ara, A., Usmani, J. A., *Interdisciplinary Toxicology*, 2015, **8**(2): 55-64.
- White, P., Broadley, M., *Annals of Botany*, 2003, **92**(4): 487-511.
- Wollenweber, E., Dietz, V. H., *Phytochemistry*, 1981, **20**(5): 869-932.
- Wood, R., *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, **18**(9-10): 624-632.
- WHO, *Boron*, Environmental Health Criteria series 204, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.

- WHO, *Aluminium*, in *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*, WHO Food Series, No. 24, Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
- WHO, *Trace Elements in Human Nutrition and Health*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1996.
- Xue, Y., Lim, S., Bråkenhielm, E., Cao, Y., *Nature Protocols*, 2010, **5**(5): 912-920.
- Yang, J.-S., Mu, T.-H., Ma, M.-M., *Food Chemistry*, 2018, **244**: 197-205.
- Yao, L. H., Jiang, J. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S. S., *Plant Foods for Human Nutrition*, 2004, **59**(3): 113-122.
- Younus, H., *International Journal of Health Sciences*, 2018, **12**(3): 88-93.
- Yruela, I., *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005, **17**(1): 145-156.
- Yu, L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, **49**(7): 3452-3456.
- Zaidel, D. N. A., Hamidon, N. H., Mat Zahir, N., *Acta Horticulturae*, 2017, **1152**, 211-218.
- Zaidel, D. N. A., Zainudin, N. N., Jusoh, Y. M. M., Muhamad, I. I., *Journal of Engineering Science and Technology*, 2015, **3**(1): 22-29.
- Zhao, Y., *Berry fruit value-added products for health promotion*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD, 2007.
- Zhao, Q., Chen, X.-Y., Martin, C., *Science Bulletin*, 2016, **61**(18): 1391-1398.
- Zhang, N. L., Zhu, Y. H., Huang, R. M., Fu, M. Q., Su, Z. W., Cai, J. Z., Hu, Y. J., Qiu, S. X., *Zeitschrift für Naturforschung B*, 2012, **67**(12): 1314-1318.
- Zhang, H., Wang, Z.-Y., Yang, X., Zhao, H.-T., Zhang, Y.-C., Dong, A.-J., Jing, W. J., *Food Chemistry*, 2014, **147**(C): 189-194.
- Zhang, L., Zhou, J., Liu, H., Khan, M.A., Huang, K., Gu, Z., *European Food Research and Technology*, 2012, **235**: 637-645.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., *Food Chemistry*, 1999, **64**(4): 555-559.
- Zlatković, B., *Tehnologija prerade i čuvanje voća*, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Beograd, Republika Srbija, 2003.

10. Biografija sa bibliografijom

Milena Nikolić (rođ. Ivanović) je rođena 16.02.1989. u Leskovcu, gde je završila osnovnu školu kao nosilac Vukove diplome, i srednju Medicinsku školu sa odličnim uspehom. Školske 2008/09. godine upisala je osnovne akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koje je završila prosečnom ocenom 9,32 i stekla zvanje hemičar. Školske 2011/12. godine upisala je master akademske studije na Departmanu za hemiju. Master tezu pod nazivom „Određivanje farmaceutskih preparata u površinskim vodama metodom HPLC/MS“, odbranila je 06.09.2013. godine ocenom 10 i završila master studije sa prosečnom ocenom 9,85. Ukupna prosečna ocena koju je ostvarila tokom svih nivoa studija je 9,52. Školske 2013/14. godine upisuje doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. Položila je sve ispite na doktorskim studijama predviđene planom i programom, sa prosečnom ocenom 9,88. Prijavila je temu doktorske disertacije pod nazivom „Optimizacija i validacija ICP-OES metode i ciklične voltametrije za određivanje elementnog sastava i antioksidativne aktivnosti odabranih sorti jagodastog voća” (NSV 8/17-01-009/17-005; 30.10.2017.) Milena Nikolić je dobitnica stipendije Ministarstva prosvete, koja se dodeljuje srednjoškolicima, tokom školske 2005/06., 2006/07. i 2007/08. godine i stipendije Ministarstva prosvete koja se dodeljuje studentima osnovnih i master studija tokom školske 2009/10., 2010/11., 2011/12. i 2012/13. godine. Dobitnica je stipendije grada Leskovca za podsticanje razvoja talentovanih učenika i studenata u školskoj 2012/13. godini. Od aprila 2014. godine je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i angažovana je kao stipendista-doktorand na projektu III41018 pod nazivom „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije”. Od aprila 2018. godine, angažovana je kao istraživač-saradnik na projektu OI 172047 pod nazivom “Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“. Dobitnica je specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh u toku studija.

Odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, održanog 27.05.2015., izabrana je u zvanje istraživač-pripravnik. Odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, održanog 19.02.2018., izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. Angažovana je u izvođenju vežbi na Departmanu za hemiju, na predmetima: Hemija životne sredine (OAS Hemija) za šk. 2014/2015. godinu, Osnovi kontrole kvaliteta u hemijskoj laboratoriji (OAS Hemija) za šk. 2016/17. i 2017/18. godinu, Instrumentalna analitička hemija (OAS Hemija) za šk. 2017/18. godinu, Struktura atoma i

molekula (OAS Hemija) za 2018/19. godinu, Fizička hemija 1 (OAS Hemija) za 2021/22. godinu.

Recenzirala je radove za međunarodne časopise Food&Function (3) i Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus (1). Učestvovala je u realizaciji TEMPUS projekta „Modernisation of Post-Graduate Studies in Chemistry and Chemistry related Programmes“ i boravila u periodu 22.04.-18.05.2013. na Univerzitetu u Brnu, Češka (Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Czech Republic). Bila je angažovana kao istraživač na studentskom projektu „Non-target screening of organic pollutants in water samples“. Učestvovala je na manifestacijama: „Noć istraživača“ 2014. i 2015. godine u Nišu, u okviru projekta „Science in Motion for Fridas Night Commotion 2014-15“ (SCIMFONICOM 2014-15, EU projekat H2020-MSCA-MGHT-633376) i „Noć istraživača“ 2017. godine u Nišu i „Naučni kamion“ u Leskovcu, u okviru projekta „The Road to Friday of Science-ReFocuS“ (H2020-MSCA-NIGHT-2016-ReFocuS -722341). Učestvovala je na Festivalima nauke: „Nauk nije bauk 5“ (Niš, 2013), „Nauk nije bauk 6“ (Niš, 2014), „Bez muke do nauke 2“ (Žitorađa, 2014), „Nauk nije bauk 7“ (Niš, 2015), „Naučni panadžur“ (Leskovac, 2017). Bila je predstavnik Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta na Info-danima, u organizaciji Uprave za obrazovanje, Univerziteta u Nišu i Elektronskog fakulteta (31.03.-01.04.2014.). Pohađala je školu masene spektrometrije „8th Mass Spectrometry School-The Mass Spectrometry in Environmental Pollutants Detection“, u organizaciji Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu i Univerziteta „Pjer i Marija Kiri“ u Parizu.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

Nikolić M., Pavlović A., Mitić S., Tošić S., Marinković-Pecev E., Đorđević M., Micić R., Optimization and validation of an inductively coupled atomic emission spectrometry method for macro- and trace element determination in berry fruit samples, *Analytical Methods*, 2016, **8**: 4844-4852, [DOI.org/10.1039/C6AY00707D](https://doi.org/10.1039/C6AY00707D)

Nikolić Milena, Pavlović Aleksandra, Mitić Snežana, Mitić Milan, Tošić Snežana, Mrmošanin Jelena, Pecev-Marinković Emilija, Effect of thermal processing on anthocyanin degradation in two bilberry jam formulations, *Revista de Chimie*, 2020, **71**(3): 34-44, [DOI.org/10.37358/RC.20.3.7971](https://doi.org/10.37358/RC.20.3.7971)

Nikolić Milena, Pavlović Aleksandra, Mitić Snežana, Tošić Snežana, Mitić Milan, Kaličanin Biljana, Manojlović Dragan, Stanković Dalibor, Use of cyclic voltammetry to determine the antioxidant capacity of berry fruits: correlation with spectrophotometric assays, *European Journal of Horticultural Science*, 2019, **84**(3): 152-160, DOI:[10.17660/eJHS.2019/84.3.5](https://doi.org/10.17660/eJHS.2019/84.3.5)

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

Jelena Mrmošanin, Aleksandra Pavlović, Snežana Mitić and Snežana Tošić, Emilija Pecev-Marinković, Jovana Krstić, **Milena Nikolić**, The Evaluation of ICP OES for the Determination of Potentially Toxic Elements in Lipsticks: Health Risk Assessment, *Acta Chimica Slovenica*, 2019, 66, 802-813, DOI: <http://dx.doi.org/10.17344/acsi.2018.4800>

Antonijević M., Arsović M., Časlavský J., Cvetković V., Dabić P., Franko M., Ilić G., **Ivanović M.**, Ivanović N., Kosovac M., Medić D., Najdanović S., Nikolić M., Novaković J., Radovanović T., Ranić Đ., Šajatović B., Špijunović G., Stankov I., Tošović J., Trebše P., Vasiljević O., Schwarzbauer J., Actual contamination of the Danube and Sava Rivers at Belgrade, *Journal of Serbian Chemical Society*, 2014, 79(9), 1169–1184.

Rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51)

Milena Nikolić, Aleksandra Pavlović, Milan Mitić, Snežana Mitić, Tošić S., Emilija Pecev-Marinković, Jelena Mrmošanin, Thermal degradation kinetics of total polyphenols, flavonoids, anthocyanins and individual anthocyanins in two types of wild blackberry jams, *Advanced Technologies*, 2018, 7 (1), 20-27, doi:10.5937/savteh1801020N

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33)

M. Nikolić, A. Pavlović, S. Mitić, S. Tošić, E. Pecev-Marinković, A. Miletić, J. Mrmošanin, Thermal degradation kinetics of total anthocyanins in two types of raspberry jams, 14th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Proceedings, Volume II, 1031, September 24-28, 2018, Belgrade, Serbia

M. Nikolić, A. Pavlović, M. Mitić, S. Mitić, S. Tošić, E. Pecev-Marinković, A. Miletić, Effect of temperature on stability of individual anthocyanins in sugar-low strawberry jam,

14th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Proceedings, Volume II, 1035, September 24-28, 2018, Belgrade, Serbia

A Miletić, **M. Nikolić**, E. Pecev-Marinković, Z. Grahovac, A. Pavlović, S. Mitić, S. Tošić, I. Rašić Mišić, Development of kinetic-spectrophotometric method for herbicide 4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid determination, 14th International Conference of Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Proceedings, Volume II, 1053, September 24-28, 2018, Belgrade, Serbia

Saopštenje sa skupa međunarodnog značaja štampano u izvodu (M34)

V. Cvetković, G. Ilić, **M. Ivanović**, N. Ivanović, O. Vasiljević, J. Časlavský, Application of HPLC/MS and tandem mass spectrometry for the identification and quantification of organic pollutants in river water, 6th Symposium Chemistry and Environmental Protection – EnviroChem 2013, Book of Abstracts 390-391, Vršac, 2013.

I. Kostić, T. Anđelković, D. Anđelković, T. Cvetković, D. Pavlović, **M. Ivanović**, D. Milojković, Interaction between oxidative stress inducers: cobalt(II) and salicylic acid, 7th Symposium Chemistry and Environmental Protection – EnviroChem 2015, Book of Abstracts, p. 260-261, Palić, 2015.

D. Milojković, D. Anđelković, G. Kocić, I. Kostić, **M. Ivanović**, T. Anđelković, Effect of temperature on the migration of di-(2-ethylhexyl)phthalate from polyvinyl chloride dialysis bags to model solutions, 7th Symposium Chemistry and Environmental Protection – EnviroChem 2015, Book of Abstracts, p. 214-215, Palić, 2015.

M. Ivanović, T. Anđelković, D. Anđelković, T. Cvetković, D. Milojković, I. Kostić, Optimisation of chloramphenicol extraction from water, 7th Symposium Chemistry and Environmental Protection – EnviroChem 2015, Book of Abstracts, p. 239-240, Palić, 2015.

Milena Nikolić, Aleksandra Pavlović, Snežana Mitić, Snežana Tošić, Ivana Rašić Mišić, Evaluation of an inductively coupled plasma atomic emission spectrometry method for macro and trace element determination in blackberry samples, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, p. 44, Ohrid, 11-14. September, 2016.

Milena Nikolić, Aleksandra Pavlović, Milan Mitić, Emilija Pecev-Marinković, Ružica Micić, Quantitation of anthocyanins in strawberries, 24th Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of Abstracts, p. 96, Ohrid, 11-14. September, 2016.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini (M63)

Milena Ivanović, Aleksandra Pavlović, Milan Mitić, Emilija Pecev-Marinković, Jovana Krstić, Jelena Mrmošanin, Determination of total and individual anthocyanins in raspberries grown in South Serbia, XXI Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, Vol. 21. (23), 263-267, Čačak, 11-12. mart, 2016.

Milena Ivanović, Snežana Tošić, Snežana Mitić, Marija Petrović, Jelena Aksić, Mineral profile of some dried fruits, XXI Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, Vol. 21. (23), 277-282, Čačak, 11-12. mart, 2016.

Aleksandra N. Pavlović, **Milena D. Nikolić**, Jelena M. Mrmošanin, Snežana S. Mitić, Snežana B. Tošić, Emilija T. Pecev-Marinković, Examination of antioxidant activity of different blackberry extracts by spectrophometric assays, 56. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Proceedings, p. 8, Niš, 7-8 jun, 2019.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64)

Aleksandra N. Pavlović, **Milena D. Nikolić**, Milan N. Mitić, Snežana S. Mitić, Dragan D. Manojlović, Dalibor M. Stanković, Correlation of berry phenolic composition versus cyclic voltammetry response (Ispitivanje polifenolnog sastava bobičastog voća voća primenom ciklične voltametrije), 54. Savetovanje Srpskog hemijskog društva i 5. Konferencija mladih hemičara Srbije, Zbornik radova, p. 61, Beograd, 29-30, septembar, 2017.

Milena Nikolić, Aleksandra Pavlović, Milan Mitić, Jovana Krstić, Jelena Mrmošanin, Determination of total phenolic, flavonoid and anthocyanin contents in different strawberry extracts, XII Symposium „Novel Technologies and Economic Development”, Book of Abstracts, p. 47, Leskovac, 20-21.oktobar, 2017.

Jelena Mrmošanin, **Milena Nikolić**, Aleksandra Pavlović, Snežana Mitić, Snežana Tošić, Determination of trace metal contents in cocoa powders samples using ICP-OES, XII Symposium „Novel Technologies and Economic Development”, Book of Abstracts, p. 61, Leskovac, 20-21.oktobar, 2017.

Emilija T. Pecev-Marinković, Ana S. Miletić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, Ivana D. Rašić Mišić, Danijela A. Kostić, **Milena D. Nikolić**, Development of new kinetic-spectrophotometric method for para-nitrophenol determination in system H₂O₂ - Cu(II), 13th Symposium "Novel Technologies and Economic Development", Zbornik radova 1, 98, Leskovac, 18-19.oktobar, 2019.

Emilija T. Pecev-Marinković, Ana S. Miletić Ilić, Ivana D. Rašić Mišić, Aleksandra N. Pavlović, Snežana B. Tošić, **Milena D. Nikolić**, Analytical application of the novel kinetic spectrophotometric method for herbicide 4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid determination in baby teas, 14th Symposium "Novel Technologies and Economic Development, Zbornik radova 1, Leskovac, 22-23.oktobar., 2021.

11. Propratna dokumentacija



Универзитет у Нишу
Природно-математички факултет

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

Оптимизација и валидација ICP-OES методе и цикличне волтаметрије за одређивање елементног састава и антиоксидативне активности одабраних сорти јагодастог воћа

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су моје име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 16.03.2022.

Потпис аутора дисертације:

Милена Д. Николић



Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Оптимизација и валидација ICP-OES методе и цикличне волтаметрије за
одређивање елементног састава и антиоксидативне активности одабраних сорти
јагодастог воћа**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 16.03.2022.

Потпис аутора дисертације:

Милена Д. Николић



Универзитет у Нишу

Природно-математички факултет

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Оптимизација и валидација ICP-OES методе и цикличне волтаметрије за одређивање елементног састава и антиоксидативне активности одабраних сорти јагодастог воћа

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 16.03.2022.

Потпис аутора дисертације:

Милена Д. Николић