

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

**Mara Kandić**

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL DRENJINE (*Cornus  
mas L.*) SA PODRUČJA CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2022. godine**

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

**Mara Kandić**

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL DRENJINE (*Cornus  
mas L.*) SA PODRUČJA CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2022. godine**

## PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Mara Kandić

Datum i mjesto rođenja: 26.10.1998. godine; Šavnik

Naziv završenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Hemijska tehnologija, 2020. godine

## INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Antioksidativni potencijal drenjine (*Cornus mas L.*) sa područja Crne Gore

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

## UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 31.01.2022. godine

Datum prihvatanja teme: 24.05.2022. godine

Mentor: Prof. dr Nada Blagojević, redovni profesor

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, predsjednik

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, član

Komisija za odbranu radu:

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, predsjednik

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 28.10.2022. godine

Veliku zahvalnost dugujem profesorki dr Nadi Blagojević na zadatoj temi, nemjerljivoj posvećenosti i korisnim savjetima tokom izrade i pisanja rada.

Eksperimentalni dio ovog master rada je rađen u laboratorijama za Analitičku hemiju i Instrumentalne metode, Metalurško-tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Podgorici. Zbog kompleksnosti istraživanja u ovom master radu dio istraživanja je urađen u Centru za ekotoksikološka ispitivanja u Podgorici a dio u Institutu za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu. Zato želim da se zahvalim i kolegama iz Centra za ekotoksikološka ispitivanja i kolegama iz Instituta „Dr Josif Pančić“, a posebno naučnom savjetniku dr Vanji Tadić na ukazanoj profesionalnoj pomoći.

Zahvaljujem se članovima Komisije, prof. dr Vesni Vukašinović Pešić i prof. dr Biljani Damjanović Vratnica, na izdvojenom vremenu i savjetima koji su doprinijeli kvalitetu ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Snežani Vukanović koja mi je nesebično pomogla svojim savjetima i pri izradi eksperimentalnog dijela i pri pisanju rada i Gordani Bošković koja ne samo da mi je pomogla oko izrade eksperimentalnog dijela rada nego je učinila da moj boravak u laboratoriji bude prijatniji.

Hvala svima koji su mi na bilo koji način pomogli tokom izrade rada.

Zahvaljujem i svojoj porodici na bezgraničnoj podršci tokom studiranja i izrade master rada.

## IZVOD

Ljekovite biljke su vrlo značajne jer sadrže komponente kojima se pripisuje antioksidativna aktivnost. Takođe, ljekovito bilje sadrži i mineralne komponente koje su jako važne za normalno funkcionisanje ljudskog organizma. Drenjina (*Cornus mas* L.) član porodice Cornaceae, koristi se u narodnoj medicine radi liječenja raznih bolesti kao što su dijabetes, probavne tegobe, anemija, bolesti jetre i bubrega. Plodovi drene su vrijedan izvor fenolnih jedinjenja (iridoida, flavonoida, tanina i antocijana). U ovom radu dat je pregled određivanja antioksidativne aktivnosti drenjina sa dva geografski različita područja Crne Gore, zatim poređenje dobijenih rezultata i utvrđivanje stepena korelacije ispitivanih jedinjenja sa antioksidativnim testovima. Antioksidativna aktivnost drenjine određivana je primjenom spektrofotometrijskih metoda, korišćenjem DPPH i FRAP metoda. U ovom istraživanju, ispitujući sok i trop drenjine sadržaj fenola, kretao se od 159,57 do 244,93 mg GAE/100 g, flavonoida od 71,74 do 165,5 mg QE/100 g, tanina od 0,33 do 0,81 %. Sadržaj antocijana ispitan je primjenom spektrofotometrijskih i hromatografskih metoda. U prvom slučaju sadržaj antocijana se kretao od 0,057 do 0,310 %, dok su HPLC analizom u ispitivanim uzorcima drenjine identifikovana četiri antocijana i to delfinidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, pelargonin-3-glukozid i njegov derivat. Sadržaj ovih antocijana se razlikovao u zavisnosti od ispitivanog uzorka. Takođe, određen je i mineralni sastav ploda, tropa i soka drenjina primjenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS) i optčki emisione spektroskopije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Najzastupljeniji esencijalni mikroelement u ispitivanim uzorcima drenjine dobijen primjenom AAS metode je Fe, čija se koncentracija kretala od 23,44 mg/kg do 37,69 mg/kg. Drugi po zastupljenosti esencijalni mikroelement bio je Zn, čija se koncentracija kretala od 3,14 mg/kg do 6,25 mg/kg, zatim slijedi Cu sa koncentracijama od 1,50 mg/kg do 1,80 mg/kg. Koncentracija Mn u ispitivanim drenjinama se kretala od 0,58 mg/kg do 0,78 mg/kg. Primjenom ICP-OES metode dobijeno je da je najzastupljeniji esencijalni makroelement u svim ispitivanim uzorcima drenjine K. Koncentracija ovoga makroelementa se kretala od 2427,8 mg/kg do 3276,2 mg/kg. Drugi po zastupljenosti esencijalni makroelement u ispitivanim uzorcima drenjine je Ca. Koncentracija Ca kretala se od 361,5 mg/kg do 475,7 mg/kg. Zatim slijede Mg i Na sa koncentracijama od 95,41 mg/kg do 146,5 mg/kg, odnosno 8,347 mg/kg do 16,59 mg/kg. Primjenom AAS i ICP-OES metoda, u svim ispitivanim uzorcima drenjine (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>) koncentracije Pb, Cd i Ni nijesu bile

detektovane. U ispitivanim uzorcima drenjine utvrđen je izuzetno visok stepen korelacije između sadržaja ukupnih flavonoida i antioksidativne vrijednosti mjerene FRAP metodom ( $R^2 = 0,9216$ ), kao i između sadržaja ukupnih antocijana i antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH metodom ( $R^2 = 0,7946$ ). Osim visokog stepena korelacije za ukupne antocijane dobijeni su dobri korelacioni odnosi i između pojedinačno identifikovanih antocijana i DPPH vrijednosti. Naime, najveći doprinos antioksidativnoj aktivnosti ima cijanidin-3-galaktozid ( $R^2=0,9164$ ), zatim cijanidin-3-glukozid ( $R^2=0,9007$ ) i pelargonin-3-glukozid ( $R^2=0,8896$ ). Takođe, ovo istraživanje je pokazalo da pojedini makroelementi (Ca) imaju visok stepen korelacije sa vrijednostima DPPH testa,  $R^2=0,7862$ .

*Ključne riječi:* Cornaceae, dren (*Cornus mas* L.), drenjina, antioksidativna aktivnost, polifenolna jedinjenja, spektrofotometrijske metode, ICP-OES, FRAP metoda, DPPH metoda, mineralne komponente

## ABSTRACT

Medicinal plants are very important because they contain components attributed to antioxidant activity. Also, medicinal plants contain mineral components that are very important for the growth and development of the human body. Dogwood (*Cornus mas* L.), a member of the Cornaceae family, is used in traditional medicine for the treatment numerous of diseases such as diabetes, digestive problems, anemia, liver and kidney diseases. Dogwood fruits are an important source of phenolic compounds (iridoids, flavonoids, tannins and anthocyanins). In this paper, an overview of the determination of the antioxidant activity of dogwood from two geographically different areas of Montenegro is given, followed by a comparison of the obtained results and determination of the degree of correlation of the tested compounds with antioxidant tests. Antioxidant activity was determined spectrophotometrically, using DPPH and FRAP methods. In this research, examining the juice and pomace of dogwood, the phenolic content ranged from 159.57 to 244.93 mg GAE/100 g, flavonoids from 71.74 to 165.5 mg QE/100 g, tannins from 0.33 to 0.81 %. The anthocyanin content was tested using spectrophotometric and chromatographic methods. In the first case, the anthocyanin content ranged from 0.057 to 0.310 %, while HPLC analysis identified four anthocyanins in the examined dogwood samples, namely delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, pelargonin-3-glucoside and its derivative. The content of these anthocyanins differed depending on the examined sample. Also, the mineral content of the fruit, pomace and juice of dogwood was determined using atomic absorption spectroscopy (AAS) and optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma (ICP-OES). The most abundant essential trace element in the studied dogwood samples obtained using the AAS method is Fe, whose concentration ranged from 23.44 mg/kg to 37.69 mg/kg. The second most abundant essential microelement was Zn, whose concentration ranged from 3.14 mg/kg to 6.25 mg/kg, followed by Cu with concentrations from 1.50 mg/kg to 1.80 mg/kg. The concentration of Mn in the examined dogwoods ranged from 0.58 mg/kg to 0.78 mg/kg. Using the ICP-OES method, it was found that the most abundant essential macroelement in all our tested dogwood samples was K. The concentration of this macroelement ranged from 2427.8 mg/kg to 3276.2 mg/kg. The second most abundant essential macroelement in the studied dogwood samples is Ca. Ca concentration ranged from 361.5 mg/kg to 475.7 mg/kg. Then follow Mg and Na with concentrations from 95.41 mg/kg to 146.5 mg/kg, respectively 8.347 mg/kg to 16.59 mg/kg. Using

the AAS and ICP-OES methods, in all examined dogwood samples (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>) concentrations of Pb, Cd and Ni were not detected. In the studied dogwood samples, an extremely high degree of correlation was found between the content of total flavonoids and antioxidant value measured by the FRAP method ( $R^2 = 0.9216$ ), as well as between the content of total anthocyanins and antioxidant activity determined by the DPPH method ( $R^2 = 0.7946$ ). In addition to the high degree of correlation for total anthocyanins, good correlations were also obtained between individually identified anthocyanins and DPPH values. Namely, the greatest contribution to antioxidant activity is cyanidin-3-galactoside ( $R^2=0.9164$ ), followed by cyanidin-3-glucoside ( $R^2=0.9007$ ) and pelargonin-3-glucoside ( $R^2=0.8896$ ). Also, our research showed that certain macroelements (Ca) have a high degree of correlation with the value of DPPH test,  $R^2 = 0.7862$ .

*Key words:* Cornaceae, dogwood (*Cornus mas* L.), dogwood, antioxidant activity, polyphenolic compounds, spectrophotometric methods, ICP-OES, FRAP method, DPPH method, mineral components



## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	11
2.	TEORIJSKI DIO.....	13
2.1	DREN.....	13
2.2	OKSIDATIVNI STRES.....	15
2.3	ANTIOKSIDANSI .....	16
2.3.1	Fenolna jedinjenja.....	18
2.3.2	Flavonoidi .....	21
2.3.3	Antocijani.....	22
2.3.4	Tanini .....	24
2.4	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DREJINE.....	25
2.5	MAKROELEMENTI I MIKROELEMENTI .....	30
2.6	METODE ANALIZE.....	32
2.6.1	UV/VIS spektroskopija.....	32
2.6.1.1	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test.....	34
2.6.1.2	FRAP test.....	36
2.6.2	Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS).....	37
2.6.3	Tečna hromatografija visokih preformansi (HPLC) .....	38
2.6.4	Atomska emisiona spektroskopija sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES) .....	39
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	41
3.1	UZORKOVANJE DREJINE .....	41
3.2	PRIPREMA UZORAKA DREJINE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA MAKROELEMENTATA I MIKROELEMENTATA .....	42
3.2.1	Određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS).....	42
3.2.2	Određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata optički emisionom spektroskopijom sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES).....	42
3.2.3	Određivanje nutritivne vrijednosti drenjine .....	42
3.3	HEMIJSKA ANALIZA SOKA I TROPA DREJINE.....	43
3.3.1	Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	43
3.3.2	Određivanje sadržaja flavonoida.....	44
3.3.3	Određivanje sadržaja tanina .....	44
3.3.4	Određivanje sadržaja antocijana .....	44
3.3.5	HPLC metoda.....	45
3.3.6	Određivanje antioksidativnih svojstava soka i tropa drenjine.....	45
3.3.6.1	Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test.....	45
3.3.6.2	Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test .....	46
3.4	STATISTIČKA ANALIZA.....	46
4.	REZULTATI I DISKUSIJA .....	47
4.1	SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U SOKU I TROPU DREJINE .....	47
4.2	SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U SOKU I TROPU DREJINE.....	49
4.3	SADRŽAJ UKUPNIH ANTOCIJANA U SOKU I TROPU DREJINE.....	51
4.3.1	Identifikacija antocijana HPLC metodom u soku i tropu drenjine.....	52

4.4	SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U SOKU I TROPU DRENJINE.....	56
4.5	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SOKA I TROPA DRENJINE .....	57
4.6	MAKROELEMENTI I MIKROELEMENTI U ISPITIVANIM UZORCIMA DRENJINE.....	60
4.6.1	Nutritivna vrijednost drenjine .....	67
4.7	KORELACIJA SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, MAKROELEMENATA I MIKROELEMENATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA DRENJINE .....	69
5.	ZAKLJUČAK.....	73
6.	LITERATURA .....	75

## 1. UVOD

Biljke su značajan izvor hemijskih jedinjenja koja imaju važnu ulogu u liječenju metaboličkih poremećaja. Zbog toga se često vrše ispitivanja antioksidativne aktivnosti i hemijskog sastava prirodnih biljnih vrsta. Antioksidansi su materije koje usporavaju ili smanjuju oštećenja ćelija prouzrokovanih slobodnim radikalima, koji nastaju oksidacijom i lančanim reakcijama. Antioksidansi mogu biti prirodni ili vještački (Ahmad i sar., 2014, Anuj i sar., 2016). Bitni činioci koji utiču na sadržaj antioksidanasa u organizmu i na njegovu sposobnost da se odbrani od uticaja slobodnih radikala su genetika, pol, godine života, navike u ishrani (Ayoub i sar., 2017).

Smatra se da su određene biljne vrste bogate antioksidansima, kao na primjer: drenjine, jagode, maline, crveni kupus, cvekla, spanać i slično. Antioksidansi koje tijelo samo proizvodi poznati su kao endogeni antioksidansi, dok se antioksidansi koji se unose u organizam nazivaju egzogenim (Anuj i sar., 2016). Ako tijelo ne može da ukloni slobodne radikale, može doći do nastanka oksidativnog stresa, što može oštetiti ćelije i dovesti do tjelesne disfunkcije. Oksidativni stres povezan je sa bolestima srca, artritisom, moždanim udarom, respiratornim bolestima, imunološkim nedostatkom, karcinomom, Parkinsonovom bolešću i drugim upalnim stanjima (Pham-Huy i sar., 2008). Jedinjenja koja se "bore" protiv negativnog uticaja slobodnih radikala nazivaju se antioksidansi, nalaze se u značajnoj količini u čajevima, voću, povrću i vinu i pokazuju blagotvorno dejstvo na ljudsko zdravlje (Flieger i sar., 2021, Anuj i sar., 2016, Anbudhasan i sar., 2014). Zbog toga se sve veća pažnja posvećuje identifikaciji i kvantifikaciji antioksidanasa u biološkim uzorcima (Munteanu i Apetrei, 2022).

Metode i instrumenti za mjerenje antioksidativne aktivnosti postigli su napredak u posljednjih nekoliko decenija. Aktivnost antioksidansa ne smije se ispitivati na osnovu samo jedne metode, već je potrebno nekoliko metoda da bi se odredila antioksidativna aktivnost uzorka (Munteanu i Apetrei, 2021). Metode koje se koriste za mjerenja antioksidativne aktivnosti su podijeljene u tri grupe: spektrometrijske, elektrohemijske i hromatografske metode (Antolović i sar., 2002). Procjena antioksidativnog kapaciteta i danas predstavlja izazov jer još uvijek ne postoji univerzalni test za mjerenje ukupne antioksidativne aktivnosti, ali postoji mnogo in vitro hemijskih testova koji se zasnivaju na određivanju sposobnosti antioksidasa da uklone slobodne radikale (Flieger i sar., 2021).

Cilj ovog rada bio je utvrđivanje antioksidativnog potencijala drenjina uzgajanih na sjevernom i u centralnom dijelu Crne Gore, primjenom UV-Vis spektrometrijskih metoda i HPLC analiza. Različita nadmorska visina i reljef uslovljavaju različitu i makro i mikro klimu što može uticati i na osobine drenjine. Sadržaj antioksidanasa određivan je u soku i tropu drenjine i na taj način omogućeno je da se sagledaju razlike u rezultatima ispitivanih uzoraka sa različitih lokaliteta. Za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti korišćeni su različiti testovi: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), koji se zasniva na mjerenju sposobnosti uzorka da redukuje gvožđe i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) koji se zasniva na redukciji rastvora DPPH radikala redukcionim sredstvom.

Osim biološki aktivnih supstanci određen je i mineralni sastav ploda, tropa i soka primjenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS) i optički emisione spektroskopije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES).

## 2. TEORIJSKI DIO

Ishrana ima bitnu ulogu u sprečavanju razvoja mnogih bolesti, pa samim tim poslednjih godina zdrava ishrana i upotreba ljekovitog bilja postaju sve značajniji. Biljne vrste, kao što su, voće i povrće, bogati su izvori vitamina, vlakana, minerala i imaju veliki značaj kao antioksidansi za pravilan rast i razvoj tijela (Nisa i sar., 2020). Rod *Cornus* je član porodice Cornaceae, koja obuhvata više vrsta, uglavnom drveća i žbunja (Czerwinska i Melzig, 2018). *Cornus mas* L. pripada vrsti drenova koji uspijevaju u Turskoj, Rumuniji, Bugarskoj, Italiji, južnoj Evropi i jugozapadnoj Aziji (Dinda i sar., 2016). Ova biljka se uzgaja skoro 400 godina, a u narodnoj medicini se koristi od davnina, posebno u Aziji. Postoje zapisi u kojima se navodi da se listovi drene mogu koristiti za liječenje stomačnih bolesti, kao i to da su Indijanci koristili ekstrakte drenjine za liječenje malarije (Kazimeirski i Regula, 2019).

### 2.1 DREN

Dren (latinski: *Cornus mas*) raste u južnoj Evropi i jugozapadnoj Aziji. *Cornus* je rod sa oko 30–60 vrsta drvenastog rastinja iz familije Cornaceae (Rop i sar., 2010).

Većina drenova su listopadna stabla ili grmovi srednjeg ili velikog rasta koji mogu dostići visinu od 3 do 9 m. Zbog ranog perioda cvjetanja i spore promjene boje listova u jesen smatra se ukrasnom biljkom. Uspijeva na različitim nadmorskim visinama, čak do 1400 m nadmorske visine. Ova biljka sporo raste i može živjeti do 300 godina. Otporna je na sušu i mraz. Plod drene je ovalnog oblika prosječne dužine od 1,5 do 2 cm i težine od 1,6 do 2,6 g. Postoje i druge sorte čija težina može dostići i 9 g. Varijacije u pogledu oblika i boje plodova drene (*Cornus*) prikazane su na slici 1. Nezrela drenjina je jako kisela, a plod je zreo tek kad dobije tamnocrvenu boju i tada sadrži najveću količinu šećera (Kazimeirski i Regula, 2019).

U Crnoj Gori dren može uspjeti na različitim područjima, na jugu u blizini morske obale i krajnjem sjeveru zemlje, do preko 1000 m nadmorske visine. Plod se može koristiti svjež, osušen ili se može koristiti za pripremu džema, marmelade, soka, sirupa, likera i rakije (Jaćimović i sar., 2020).



Slika 1. Različnost oblika i boje plodova drena (*Cornus mas* L.) – (Foto: Brindza, 2004)

Dren je sporo rastuća vrsta, zahtijeva svjetlost, uspijeva na otvorenim područjima ili u polusjenovitoj vegetaciji, poput šumskih živih ograda. Optimalni uslovi za rast ove biljke su vlažna, alkalna zemljišta bogata nutrijentima, mada uspijeva i u toplim i suvim predjelima. *Cornus mas* L. raste na svim vrstama tla, s pH vrijednošću u rasponu od blago kiselog do vrlo alkalnog. Dren dobro podnosi vjetar i mraz, a može preživjeti i do  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok je osjetljiv na morsku vodu zbog velikog sadržaja soli. Dren je dugog vijeka, može preživjeti do 300 godina (Krivoruchko, 2014).

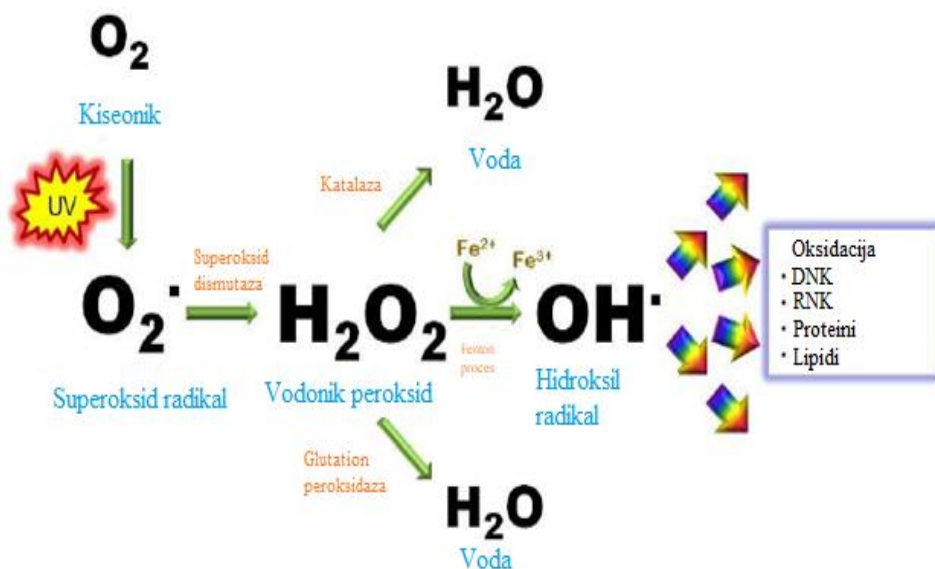
Plod *Cornus mas* L. se od davnina koristi u tradicionalnoj kuhinji i narodnoj medicini u raznim zemljama Evrope i Azije. U narodnoj medicini drenjina se koristi za suzbijanje mnogih bolesti kao što su dijabetes, dijareja, reumatski bolovi, infekcija mokraćnih puteva, bolesti bubrega i jetre. Ispitivanjem različitih dijelova ove biljke identificirano je 101 jedinjenje, među kojima dominiraju fenolna jedinjenja, vitamin C, iridoidi, flavonoidi i antocijani (Dinda i sar., 2016).

Plod drena se uglavnom koristi za ublažavanje gastrointestinalnih problema. Koristi se za kožne bolesti, tuberkulozu i menstrualne probleme. U Evropi se ekstrakti voća koriste u kozmetičke svrhe (Seeram i sar., 2002). Plod drena je efikasan i u borbi protiv kancera što posebno privlači pažnju s obzirom na negativne posledice hemioterapije (Yousefi i sar., 2015).

Takođe, zabilježeno je da drenjina ima antibakterijsko, antihistaminsko, antialergijsko, antimikrobno i antimalarijsko djelovanje (Shi i sar., 2001, Dinda i sar., 2016, Yilmaz i sar., 2009, Jayaprakasam i sar., 2006, Alavian i sar., 2014).

## **2.2 OKSIDATIVNI STRES**

Jedinke (atomi, molekuli ili joni) sa nesporenim elektronima u spoljnoj ljusci nazivaju se slobodni radikali. Slobodni radikali nastaju prekidanjem hemijske veze u molekulu tako da svakom fragmentu pripadne jedan elektron (Cheeseman i Slater, 1993). Zbog toga su biološki slobodni radikali nestabilni molekuli koji stupaju u reakciju sa organskim supstratima, kao što su lipidi, proteini i DNK (Young i Woodside, 2001). Organizam ima sopstvene mehanizme odbrane i uništavanja slobodnih radikala pomoću antioksidanasa. Tijelo samo proizvodi enzimske antioksidanse (glutation peroksidazu, katalazu i superoksid dismutazu) koji metabolizuju kiseonične toksične intermedijere i zahtijevaju prisustvo kofaktora (Cu, Mn, Zn, Fe, Se) zbog katalitičke aktivnosti. Nedovoljan unos ovih elemenata ishranom može ugroziti efikasnost antioksidativnih odbrambenih mehanizama (Anuj i sar., 2016, Bisht, 2018). Usled prevelikog nakupljanja slobodnih radikala u tijelu dolazi do nastanka oksidativnog stresa koji je povezan sa razvojem degenerativnih i hroničnih bolesti. Oksidativni stres predstavlja neravnotežno stanje koje je prouzrokovano prisustvom slobodnih radikala (Keshari i sar., 2015, Jamshidi-Kia i sar., 2020). Na slici 2 je prikazano kako pod uticajem UV zračenja nastaju slobodni radikali. Sa slike 2 se uočava da UV zračenje stvara kiseonične slobodne radikale. UV fotoni stupaju u interakciju s molekularnim kiseonikom kako bi podstakli stvaranje derivata slobodnih radikala kao što su superoksid, vodonik peroksid i visoko reaktivni hidroksilni radikal. Slobodni radikali napadaju makromolekule kao što su proteini, lipidi, RNK i DNK i mijenjaju njihovu strukturu i na taj način onemogućavaju pravilno funkcionisanje. U zaštitne enzime, koji detoksifikuju i smanjuju nivoe oksidativnih vrsta u ćeliji, ubrajaju se superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza (D'Orazio i Jarrett, 2013, Santo i sar., 2016, Alavian i sar., 2014).



Slika 2. Nastajanje slobodnih radikala pod uticajem UV zračenja (D’Orazio i sar., 2013).

Različitim istraživanjima je utvrđeno da su slobodni radikali i oksidativno oštećenje DNK odgovorni za razvoj kancera (Santo i sar., 2016, Valko i sar., 2004). Slobodni radikali ometaju normalan rast ćelija što dovodi do genetske mutacije i promjene normalne transkripcije gena. Oksidativno oštećenje proizvodi mnoštvo modifikacija u strukturi DNK, uključujući lezije baza i šećera, kao i prekid lanca (Valko i sar., 2004). Kod pušača i ljudi sa hroničnim upalama, kod ljudi koji su izloženi azbestu, češća su oksidativna oštećenja DNK koja mogu dovesti do pojave kancera pluća i drugih tumora (Droge, 2002, Pham-Huy i sar., 2008).

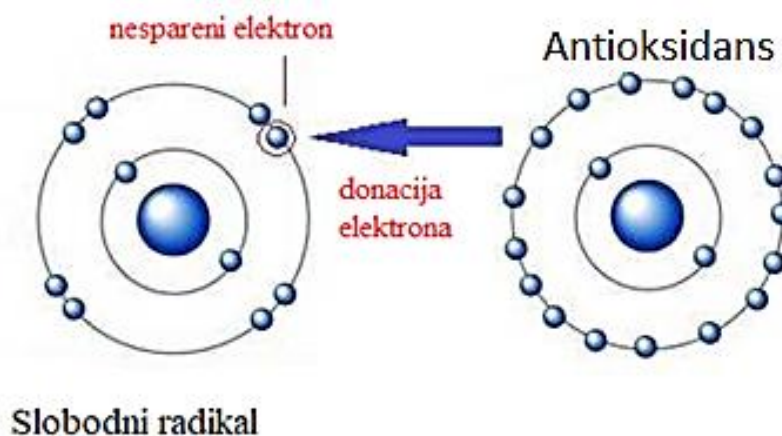
### 2.3 ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi se obično dijele na endogene (koje tijelo samo proizvodi) i egzogene (koji se unose putem hrane). U endogene antioksidanse se ubrajaju glutacion, ubikinon, albumin, metalotioneini i mokraćna kiselina, a u egzogene flavonoidi, fenolne kiseline, karotenoidi, kumarini, lignani, organska jedinjenja sumpora i vitamin, tj. jedinjenja koja potiču iz prirodnih izvora kao što su biljke (Ahmad i sar., 2014). Kada endogeni antioksidansi ne mogu zaštititi organizam od slobodnih radikala i ROS-a (reaktivnih kiseonikovih jedinjenja), neophodan je unos egzogenih antioksidanasa. Izvori antioksidanasa su čajevi, voće, vino i povrće (Flieger i sar., 2021, Ahmad i sar., 2014). Biljna vrsta bogata antioksidansima koja posebno privlači pažnju je drenjina (Sulekha Mandal i sar., 2009, Szczepaniak i sar., 2019, De Biaggi i sar., 2018, Alavian i sar., 2014).



Supstance prisutne u drenjinama a kojima se pripisuju antioksidativna svojstva su: fenolna jedinjenja, vitamin C, iridoidi, flavonoidi, antocijani i tanini. Prirodni polifenoli nastaju sekundarnim metabolizmom biljke i neophodni su u procesu adaptacije biljne vrste. Oni su odgovorni za zaštitu od UV zračenja ili zaštitu od štetoina. Jedna od najznačajnijih grupa polifenola su flavonoidi poput flavonola, flavona, izoflavona i antocijana (Vermerris i Nicholson, 2008).

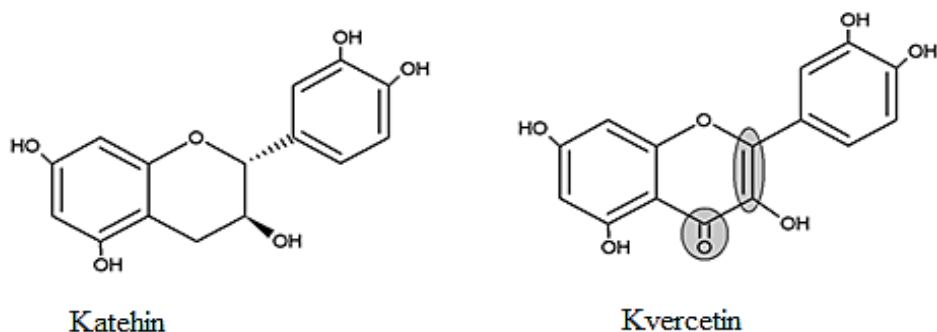
Neinfektivne bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes i rak povezane su sa oksidativnim stresom koji izazivaju slobodni radikali (Song i sar., 2019). Slobodni radikali nastaju u oksidacionim reakcijama, pri čemu predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje zato što imaju višak elektrona i stupaju u reakcije sa biološkim molekulima, što dovodi do oštećenja ćelija i do disfunkcije organizma (Nguyen i sar., 2009). Organizam ima sopstvene mehanizme odbrane i uništavanja slobodnih radikala pomoću antioksidanasa (Anuj i sar., 2016). Nakon brojnih istraživanja naučnici su otkrili da se životni vijek ljudi produžava konzumiranjem materija koje imaju antioksidativno svojstvo, kao i da sprečavaju nekoliko smrtonosnih bolesti (Atta i sar., 2017, Dinda i sar., 2016). Antioksidansi biljnog porijekla koriste se kao dodatak ishrani i kao konzervansi za hranu, takođe konzumiraju se radi prevencije nekih bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti (Atta i sar., 2017). Antioksidansi mogu djelovati tako što će se sami oksidovati da bi zaštitili važne ćelijske komponente od oksidacije ili tako što će konvertovati prooksidanse u manje reaktivna jedinjenja, a mogu i da razlažu ili uklanjaju proizvode oksidacije. Na slici 3 je prikazano kako antioksidans neutrališe slobodne radikale (Verma i Singh, 2019).



Slika 3. Neutralizacija slobodnog radikala pomoću antioksidansa (Verma i sar., 2019)

### 2.3.1 Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja spadaju u sekundarne metabolite biljaka, dijele se na fenolne kiseline i polifenole. Sadrže aromatski prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Oni su vezani sa mono- i polisaharidima, za jednu ili više fenolnih grupa ili se mogu pojaviti kao estri (Harborne i sar., 1999). Antioksidativno svojstvo polifenolnih jedinjenja zavisi od hidroksilacije aromatičnih prstenova (Prabhu i sar., 2021). Međutim, pored strukture, broja i položaja hidroksilnih grupa na sposobnost fenola da uklanjaju slobodne radikale utiče i priroda supstitucije aromata. Na primjer, fenoli kvercetin i katehin imaju isti broj hidroksilnih grupa, međutim kvercetin sadrži dvostuku vezu i keto grupu, što dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti. Struktura ovih fenolnih jedinjenja je prikazana na slici 4 (Rice-Evans i sar., 1996).

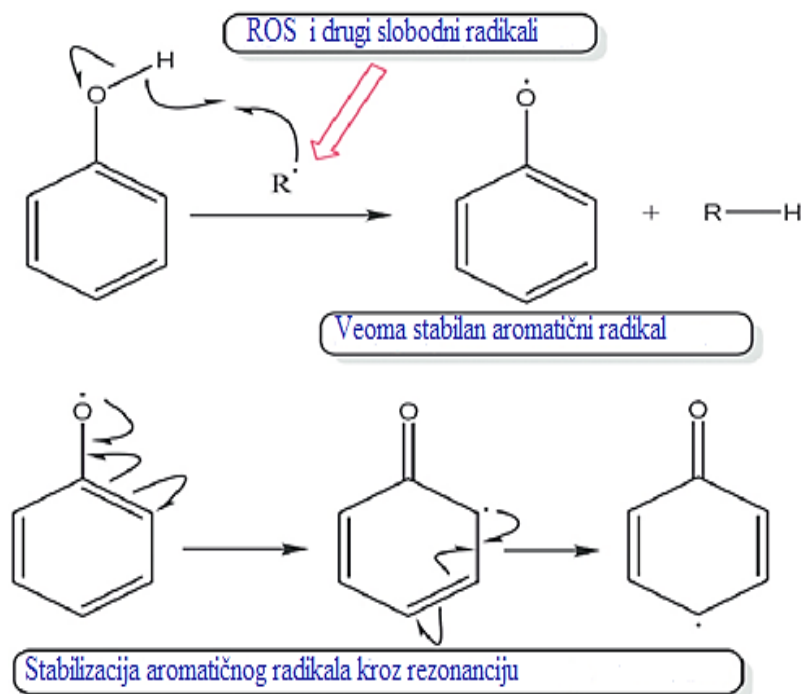


Slika 4. Hemijska struktura ketehina i kvercetina (Rice-Evans i sar., 1996)

Fenolna jedinjenja mogu donirati atom vodonika sa hidroksilne grupe slobodnom radikalu, pri čemu nastaje delokalizovani, tj. nespareni elektron preko fenolnog prstena, a zatim slijedi stabilizacija aromatskog radikala kroz rezonanciju, kao što je prikazano na slici 5 (Zafar i sar., 2016).

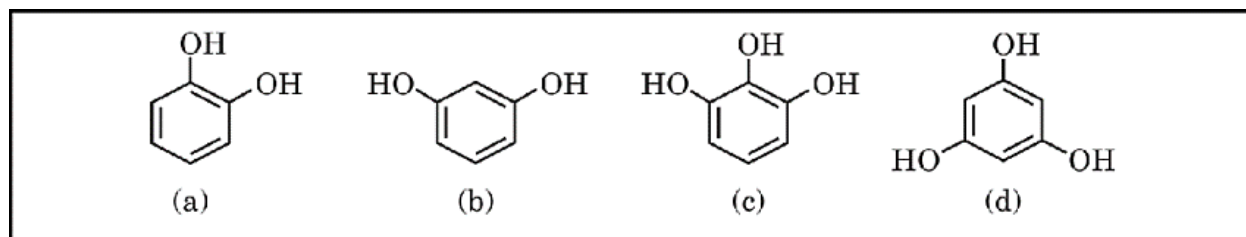
Veliki broj polifenola ima antioksidativno djelovanje in vitro. Utiču na osjetljivost receptora, aktivnost pojedinih enzima i regulaciju gena (Virgili i Marino, 2008).

Polifenoli su makromolekuli. Mnogi veći molekuli polifenola su nastali biosintezom od manjih polifenola do tanina koji se ne mogu hidrolizovati. Većina polifenola sadrži ponavljajuće fenolne ostatke pirokatehola, rezorcinola, pirogalola i floroglucinola povezane esterima ili stabilnijim C-C vezama.



Slika 5. Mehanizam uklanjanja slobodnih radikala (Zafar i sar., 2016).

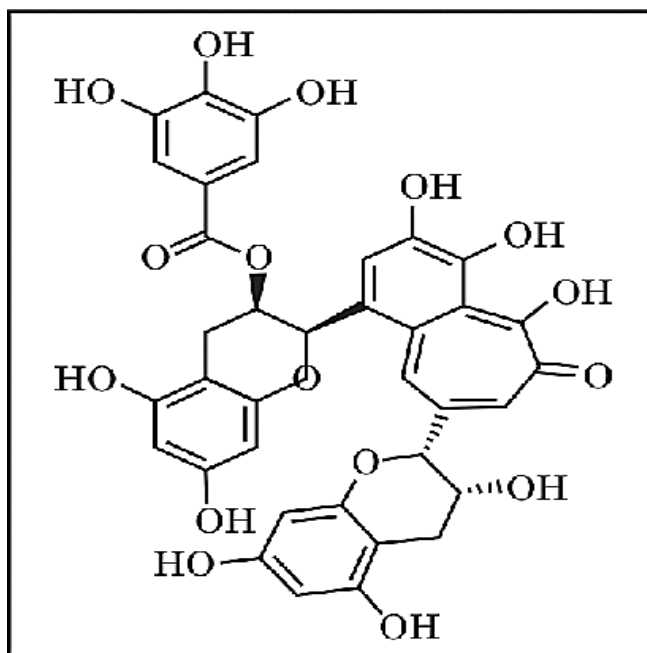
Katehol i rezorcinol su tipovi polifenola koji imaju dvije hidroksilne grupe, a pirogalol i floroglucinol tipovi imaju tri hidroksilne grupe. Iako je miješanje ovih tipova unutar polifenola takođe moguće, podstrukture fenolnih jedinjenja proizlaze iz različitih puteva biosinteze, posebno fenilpropanoidnih i poliketidnih molekula usmjerenih na biljku i povezanih sa sekundarnim metabolitima. Na slici 6 su prikazane hemijske strukture fenolnih jedinjenja (Hussein i sar., 2017).



Slika 6. Hemijska struktura: (a) Katehola (b) Rezorcinola (c) Pirogalola (d) Floroglucinola (Hussein i sar., 2017).

Hemijska struktura polifenola uvijek osim hidroksilne grupe sadrži i heteroatome. Estarske i etarske veze su uobičajene, kao i razni derivati karboksilne kiseline. U jedinjenjima tanina koja hidrolizuju estarske veze su uobičajene. Ova jedinjenja mogu imati veoma složenu hemijsku

strukturu. Na primjer, hemijska struktura teoflavin-3-galata je data na slici 7. To je polifenol biljnog porijekla koji nastaje esterifikacijom dva ekvivalenta galne kiseline u jezgru teaflavina (Hussein i sar., 2017).

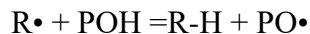


Slika 7. Hemijska struktura teoflavin-3-galata, (Hussein i sar., 2017)

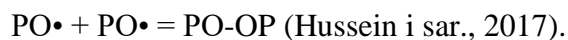
Biljne vrste predstavljaju izvore biološki aktivnih supstanci među kojima su antioksidansi. Antioksidativna aktivnost se uglavnom pripisuje fenolnim jedinjenjima (Olfa i sar., 2015). Unos polifenola može se postići konzumacijom hrane biljnog porijekla (Hussein i sar., 2017). Polifenoli su prirodna jedinjenja koja se uglavnom nalaze u voću, povrću, žitaricama i pićima. U voće bogato polifenolima ubrajaju se jabuke, nar, jagode, kupine, aronija, brusnice, borovnice, maline, trešnje, dinja, grožđe, šljive i kruške. Povrće poput peršuna, celera, kupusa i crnog luka bogato je polifenolima. Zeleni čaj, bijeli čaj, crni čaj, čokolada, kao i maslinovo ulje, pčelinji polen, arganovo ulje, mnoge žitarice i crno vino, takođe, su izvori polifenola. Ono što je bitno je da komponente hrane moraju biti biodostupne u nekom obliku da bi imale biološke efekte. (Williamson i Manach, 2005, Pandey i Rizvi, 2009).

Polifenoli su veoma važni antioksidansi koji imaju sposobnost da uklone slobodne radikale i da pojačaju regulaciju određenih reakcija. Na primjer, kod sistema koji su oštećeni peroksil

radikalima ( $R\bullet$ ), "deaktivacija" oksidativnih vrsta polifenolnim antioksidansima (POH) zasniva se na doniranju vodonika, koji prekida lančane reakcije:



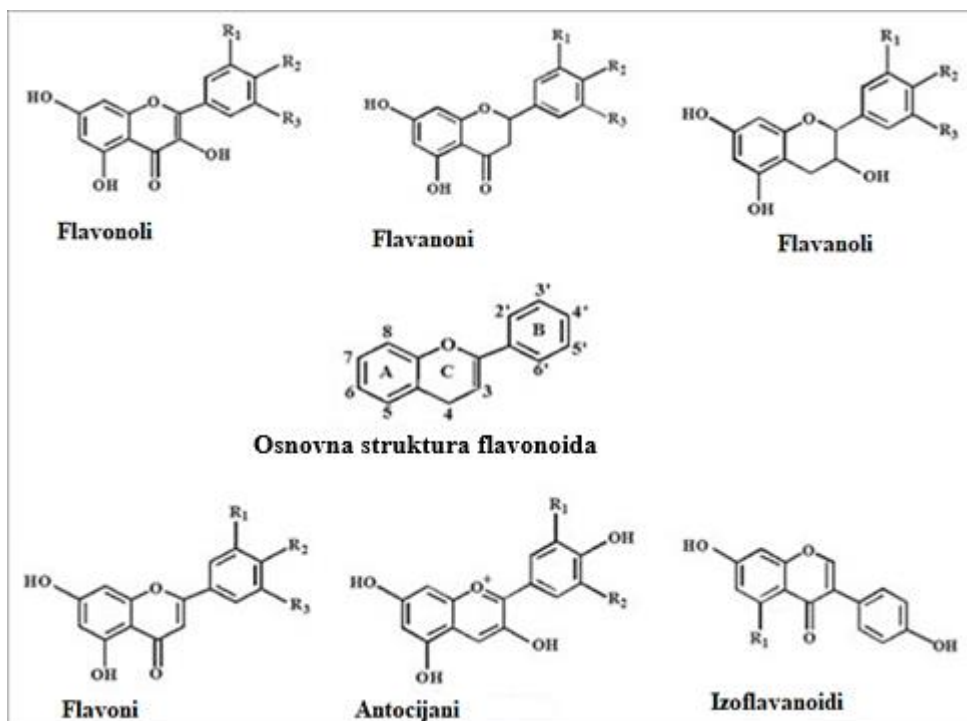
Dobijeni fenoksilni radikali ( $PO\bullet$ ) stabilizuju se rezonancijom ili nastajanjem intramolekularne vodonične veze ili se mogu kombinovati, pri čemu dolazi do dimerizacije. Time se prekida lančana reakcija:



### 2.3.2 Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju klasu fenola, koji su uglavnom prisutni u listovima, sjemenkama, kori i cvjetovima biljaka. Ova jedinjenja imaju zaštitnu ulogu kako od ultraljubičastog zračenja, tako i od patogena i biljojeda (Medvidović-Kosanović i sar., 2014). Flavonoidi imaju različite biološke uloge u biljkama, životinjama i bakterijama. Tako, u biljkama mogu biti odgovorni za boju i aromu cvijeća, za privlačenje oprašivača kao i za zaštitu biljke od različitih biotičkih i abiotičkih stresova. Ovim jedinjenjima se pripisuju antioksidativna, antimutagena i antikancerogena svojstva, kao i mogućnost inhibicije nekoliko enzima, kao što je ksantin oksidaza (Panche i sar., 2016). Takođe, na osnovu istraživanja utvrđeno je da konzumacija hrane bogate ovim jedinjenjima poboljšava funkciju vaskularnog sistema (Delage, 2015).

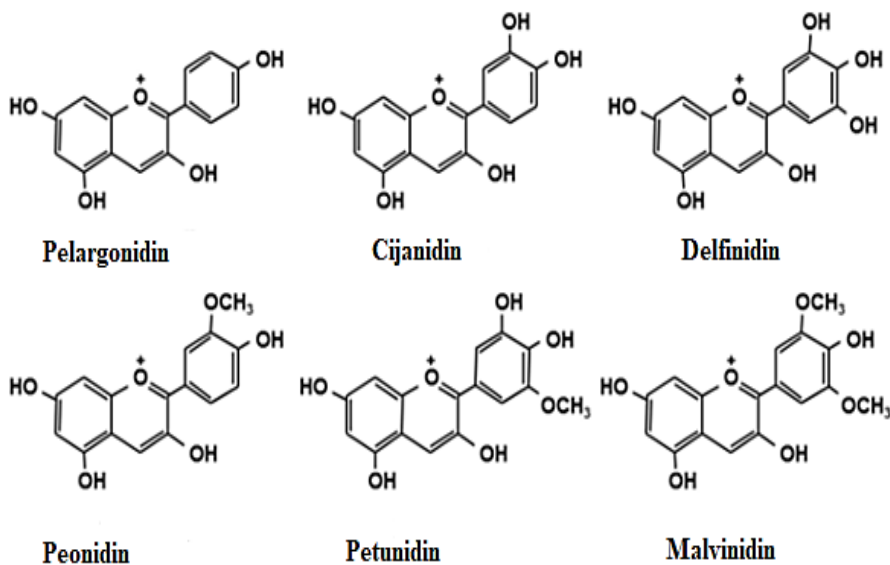
I pored velikog broja modifikacija osnovne strukture, koje uslovljavaju strukturnu raznolikost, može se reći da osnovnu strukturu flavonoida čini 15 atoma ugljenika, koji su podijeljeni u dva benzenova prstena i jedan heterociklični prsten. U zavisnosti od hemijske strukture, stepena oksidacije i nezasićenosti lanca flavonoidi se mogu klasifikovati u različite grupe kao što su flavoni, izoflavonoidi, antocijanidini, flavanoli, flavonoli i flavanoni. Apsorpcija flavonoida u ljudskom organizmu je slaba, brzo se metabolišu i izlučuju. Smatra se da unos hrane bogate flavonoidima smanjuje rizik od nastanka raznih vrsta kancera. Na slici 8 prikazane su hemijske strukture podklasa flavonoida (Rodríguez-García i sar. 2019).



Slika 8. Hemijske strukture podklasa flavonoida (Pandey i sar., 2009)

### 2.3.3 Antocijani

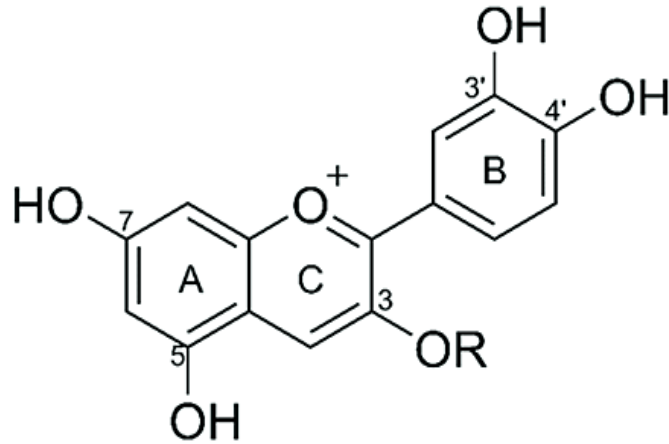
Antocijani su klasa flavonoida koji daju pigmentaciju voću i povrću, obično u obliku crvene, plave, ljubičaste i crne boje (Steyn, 2009). Boja antocijana zavisi od pH vrijednosti, tako da u kiselim rastvorima izgledaju crveno, ljubičasto u neutralnim i plavo u alkalnim rastvorima. Promjena boje hrane može biti potencijalni koristan pokazatelj sigurnosti hrane (Khoo i sar., 2017, Masoodi i sar., 2016). Kopigmentacija je važna za antocijane jer su to pigmenti i kopigmentacija štiti antocijane od degradacije (Gordillo i sar., 2012). Od preko 700 pronađenih antocijana, 90 % njih se sastoji od 6 antocijanidinskih baza. Antocijanidinske baze (koje nemaju supstituent šećera) su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delphinidin, petunidin i malvinidin (Slika 9), koji se razlikuju pomoću 2 supstituenta vezana za jedan od tri fenolna prstena (Wallace i Giusti, 2015).



Slika 9. Struktura antocijanidina (Kovacev, 2019).

Ispitivanjem koncentracije antocijana u 100 namirnica, koje su najčešće zastupljene u ishrani stanovništva SAD, otkriveno je da samo 24 % sadrži antocijane (16 % voća i 7 % povrća), što upućuje na to da voće sadrži više antocijana od povrća. Takođe, pokazano je da bobičasto voće sadrži mnogo bioaktivnih jedinjenja kojima se može pripisati antioksidativni kapacitet, ali se isto tako čini da postoji pozitivna korelacija između antocijana i antioksidativnog kapaciteta pa autori predlažu da treba dalje istražiti njihovu funkcionalnost u ljudskom tijelu (Wu i sar., 2006).

Antocijani se uglavnom nalaze u voću, povrću i cvijeću pojedinih biljnih vrsta. Najzastupljeniji antocijanin u biljnom svijetu je cijanidin-3-O-glukozid i pripisuju mu se antioksidativna i antikancerogena svojstva. Hemijska struktura cijanidina i cijanidin-3-O-glukozida je prikazana na slici 10 (Albuquerque i sar., 2021).



**R = H = cijanidin**

**R = glukoza = cijanidin-3-O-glukozid**

Slika 10. Hemijska struktura cijanidina i cijanidin-3-O-glukozida (Straßmann i sar., 2021).

Naime, osim antioksidativnog kapaciteta antocijana, postoje studije u kojima se pokazuje da antocijani (cijanidin-3-glukoza, cijanidin-3-rutinozid i peonidin-3-glukozid) posjeduju korisne zdravstvene osobine, posebno u vezi sa prevencijom raka (Huang i sar., 2018, Long i sar., 2018, Li i sar., 2016, Wang i Stoner, 2008).

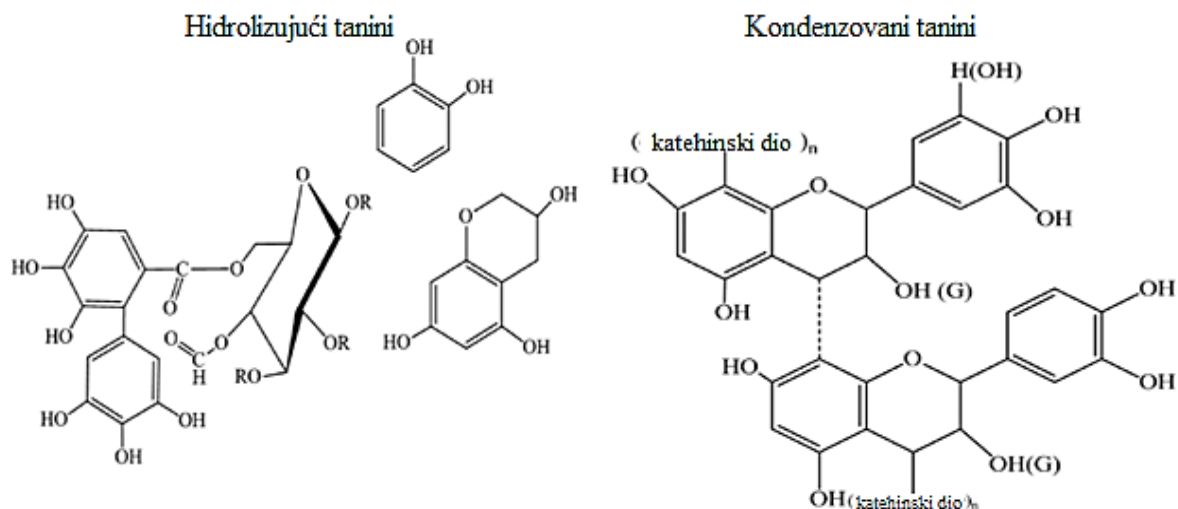
### 2.3.4 Tanini

Tanini predstavljaju grupu fenolnih jedinjenja koja su rastvorljiva u vodi, njihova molekulska masa se kreće između 500-3000 Da i imaju posebna svojstva kao što je formiranje nerastvornih kompleksa sa alkaloidima, proteinima, polisaharidima i nukleinskim kiselinama (Ramakrishnan i Krishnan, 1994, Koleckar i sar., 2008). Tanini su rasprostranjeni u mnogim biljnim vrstama (Das i sar., 2020).

Razlikuju se dvije grupe tanina i to hidrolizujući i kondenzovani tanini. Hidrolizujući tanini su estri šećera i fenolnih kiselina ili njihovih derivata, šećerna komponenta je obično glukoza. Ova vrsta tanina se dijeli na elagitanin i galotanin (Bule i sar., 2020, Koleckar i sar., 2008).

Kondenzovani tanini se sastoje od monomernog flavan-3-ola, otpornog na hidrolizu u stablu. Vezuju se za ćelijske zidove i proteine i na taj način postaju dostupni razlagačima. Na slici 11 prikazana je hemijska struktura hidrolizujućeg i kondenzovanog tanina (Govindarajan i sar., 2016).





Slika 11. Hemijska struktura hidrolizujućeg i kondenzovanog tanina (Govindarajan i sar., 2016)

## 2.4 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DREJNINE

U posljednje vrijeme raste interesovanje za biljnim vrstama koje se koriste u narodnoj medicini, među koje spada i drenjina. Drenjina (*Cornus mas* L.) je privukla pažnju mnogih naučnika zbog značajnih antioksidativnih svojstava, koja potiču od fenolnih jedinjenja, flavonoida, antocijanina, tanina i vitamina C, koji su određivani spektrofotometrijskim metodama.

Sadržaj pojedinih komponenti ploda, kao i njegove osobine zavise od stadijuma zrelosti. Kod drenjina period sazrijevanja se može podijeliti u četiri stadijuma, tj. dok su svijetložute (na početku zrelosti), roze, zatim kada su svijetlocrvene boje (prije potpune zrelosti) i kada su tamnocrvene boje, odnosno u stadijumu potpune zrelosti (Gunduz i sar., 2013). Prilikom praćenja nekoliko karakteristika ploda (širine, dužine, težine) i sadržaja pojedinih materija u zavisnosti od stadijuma zrelosti (ukupne rastvorljive čvrste materije, odnos šećer/kiselina, ukupna fenolna jedinjenja, ukupni antioksidativni kapacitet prema trolox ekvivalentnom antioksidativnom kapacitetu, sadržaj antocijanina i tanina), uočeno je povećanje širine, dužine i težine ploda tokom sazrijevanja (Behrangi i sar., 2015). Uočeno je da se tokom vremena povećava ukupna rastvorljiva čvrsta materija i odnos šećer/kiselina a boja ploda postaje tamnocrvena jer se povećava sadržaj antocijanina tokom sazrijevanja (Gunduz i sar., 2013). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupni antioksidativni kapacitet je identičan kod svijetložutih plodova a manji u tamnocrvenoj

fazi. Plodovi drenjine u svijetložutom stadijumu imaju najveći ukupni fenolni i antioksidativni kapacitet, kao i sadržaj tanina (Gunduz i sar., 2013, Behrangi i sar., 2015).

Biološka i farmakološka svojstva drenjine ispitivana su u drenjinama iz različitih oblasti. U radovima se ispituje ukupni sadržaj fenola, antocijana, flavonoida, tanina, vitamina C, iridoida, dok se ukupna antioksidativna aktivnost određuje primjenom DPPH, FRAP i ABTS metoda. Najčešće korišćena metoda za određivanje sadržaja ukupnih fenola je Folin-Ciocalteu metoda. Ukupan sadržaj fenola zavisi od vrste voća, faze rasta, metode ekstrakcije i drugih faktora. Na osnovu istraživanja je pokazano da se ukupni sadržaj fenola kretao od 196,68 mg GAE/100 g u drenjinama iz Italije (De Biaggi i sar., 2018) do 359,28 mg GAE/100 g u drenjinama iz oblasti Rumunije (Cosmulescu i sar., 2019). Rezultati dobijeni za drenjine iz područja Kavkaza, su slični, tj. ukupan sadržaj fenola iznosio je 150–400 mg/100 g svježeg voća (Perova i sar., 2014), dok su se količine ukupnog sadržaja fenola u drenjinama iz Češke kretale od 2,61 do 8,11 g galne kiseline/kg svježeg voća (261 – 811 mg GAE/100 g) (Rop i sar., 2010). U jednoj studiji vršeno je određivanje ukupnog sadržaja fenola primjenom dvije različite instrumentalne tehnike, spektrofotometrijske i hromatografske, u cilju poređenja rezultata, pri čemu su dobijeni rezultati bili gotovo identični. Tečna hromatografija visokih performansi je korišćena za identifikaciju i kvantifikaciju nekih fitohemijskih jedinjenja, u prvom redu monoterpena, organskih kiselina i vitamina C. Pokazano je da su ekstrakti drenjina imali visok nivo ukupnih rastvorljivih čvrstih materija i nisku kiselost (De Biaggi i sar., 2018). Pojedini naučnici su se bavili proučavanjem antioksidativne aktivnosti više sorti drenjina sa jednog lokaliteta ili iste sorte drenjine uzgajane na različitim lokalitetima, posmatrajući kako će različiti genotip i uslovi uticati na sadržaj pojedinih biološki aktivnih supstanci. Prilikom ispitivanja više sorti drenjina primijećene su varijacije antioksidativne aktivnosti između genotipova drenjine uzgajanih u istim oblastima. Tako se npr. pokazalo da su etanolni ekstrakti deset genotipova drenjine iz oblasti Srbije imali ukupni sadržaj fenola koji se kretao od 494 do 704 mg galne kiseline/100 g suve težine. U ovoj studiji ispitana je i antioksidativna aktivnost drenjine korišćenjem različitih antioksidativnih testova, kao što su DPPH, FRAP, ukupni sadržaj fenola i antocijana (TPC i ACC), kao i jedne relativno nove metode PRAC (permanganat koji smanjuje antioksidativni kapacitet). Poređenjem dobijenih rezultata uočene su izvjesne sličnosti u sadržaju antioksidativne aktivnosti drenjine. Dobijena je pozitivna korelacija između DPPH, ACC i TPC testova kao i između PRAC i TPC, ACC i FRAP (Popović i sar., 2012).

Pored određivanja antioksidativne aktivnosti svježih plodova i ekstrakata drenjine sa istih ili različitih područja, u jednoj studiji procijenjen je antioksidativni kapacitet hibrida, koji je nastao kombinacijom dvije različite sorte drenjina, *Cornus mas* i *Cornus officinalis*. Sadržaj iridoida, flavonoida i antocijana su različiti u pojedinačno ispitivanim sortama i hibridima. Dobijeni hibridi sadrže više iridoida od *Cornus mas* i više antocijana od *Cornus officinalis*. Kod sorti *Cornus mas* antioksidativna aktivnost je zavisila od boje ploda i najveći antioksidativni kapacitet ima sorta sa skoro crnim plodovima, dok sorte ružičaste boje ploda imaju manje vrijednosti. Vrste *Cornus* zaslužuju posebnu pažnju zato što sadrže veliku količinu biološki aktivnih materija (Klymenko i sar., 2021).

Praćenjem antioksidativnog potencijala divljih plodova drena i tri introdukovane sorte drena iz oblasti Crne Gore i Srbije, u četvorogodišnjem periodu, uočeno je da je ukupni sadržaj fenola različit u zavisnosti od vrste drenjine (183,91 - 307,9 mg/100 g) (Jaćimović i sar., 2020). Veći sadržaj fenola u ekstraktima drenjina dobijen je prilikom korišćenja različitih rastvarača i kretao se od 439,85 do 2979,25 mg GAE/100 g. Pokazalo se da se najveći sadržaj fenola dobija upotrebom acetona kao rastvarača. Nakon acetona najbolje rezultate daje metanol, zatim etanol pa acetonitril, dok je najniži sadržaj fenola zabilježen prilikom upotrebe vode kao rastvarača (Karaaslan i sar., 2018). Sadržaj fenola u drenjinama, iz oblasti Srbije, određen je nakon ekstrakcije koja je vršena primjenom više rastvarača, tj. metanola, acetona, vode i mravlje kiseline. Ekstrakti drenjine pokazuju veći sadržaj fenola u poređenju sa rezultatima dobijenim u drugim radovima koji su ispitali sadržaj fenola u svježim plodovima drenjine i vodenim ekstraktima. Takođe, u ovoj studiji vršena je procjena antioksidativnog i antimikrobnog djelovanje ekstrakta drenjine (*Cornus mas*) i divlje kupine (*Rubus fruticosus*), pri čemu je sadržaj fenola u drenjinama iznosio 8625,89 mg GAE/kg (862,5 mg/100 g) (Milenković Anđelković i sar., 2015). Izbor rastvarača takođe utiče na antioksidativnu aktivnost plodova drena. Statistička analiza koja je rađena u jednoj studiji pokazala je da su najbolji rezultati dobijeni za acetonske ekstrakte a najniži rezultati dobijeni su za vodene ekstrakte primjenom svih testova koji su korišćeni za procjenu antioksidativnog kapaciteta. Pored acetona i vode korišćeni su acetonitril, etanol i metanol kao rastvarači. U zavisnosti od upotrijebljenog rastvarača sadržaj flavonoida se kretao od 28,57 do 255,75 mg QE/100 g. Pokazalo se da se najveći sadržaj fenola i flavonoida dobija upotrebom acetona kao rastvarača. Određivanje flavonoida je vršeno spektrofotometrijski a sadržaj je izražen u mg kvercetina/100 g biljne sirovine (Karaaslan i sar., 2018). Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

metanolnih ekstrakata divljih plodova drena pokazalo je da se sadržaj flavonoida kretao od 54,26 do 64,48 mg QE/100 g, što je više u poređenju sa vodenim ekstraktima drena iz prethodnog rada (Cosmulescu i sar., 2019). Nedavno je vršeno ispitivanje sadržaja biološki aktivnih supstanci u soku od zamrznutih plodova drenjine i praćena zavisnost između antioksidativne aktivnosti i intenziteta emisije fluorescencije na dvije talasne dužine u UV oblasti, uz dodatak inulina i laktuloze, koji dovodi do smanjenja količine patogenih bakterija. Najveći sadržaj fenola utvrđen je za sok sa 1 % inulina koji iznosi 286,4 GAE/ 100 ml, a zatim za sok sa 1 ml laktuloze (Nikolova i sar., 2019).

Rezultati dobijeni u ovim radovima pokazuju značajan antioksidativni potencijal plodova *Cornus mas* L. što bi moglo da dovede do njihove upotrebe kao funkcionalne hrane i sirovine za proizvodnju lijekova. U tom cilju istraživan je sastav soka drenjina, iz oblasti Grčke, in vitro antioksidativni kapacitet i antiproliferativni kapacitet protiv ljudskih i mišjih ćelija kancera. Utvrđeno je da plodovi sadrže značajnu količinu limunske, jabučne i drugih organskih kiselina, dok sok ima nisku koncentraciju organskih kiselina. Za mjerenje antioksidativne aktivnosti korišćena je DPPH metoda. Vrijednost IC<sub>50</sub> je 0,067 % (v/v). Sok pokazuje visok antioksidativni kapacitet, a antiproliferativni kapacitet protiv ljudskih i mišjih ćelija kancera je umjeren. Naime, sok od drenjine pokazuje in vitro antiproliferativni učinak na ćelije karcinoma debelog crijeva, ali nije uočena inhibicija rasta tumora u in vivo eksperimentima kod miševa, nakon kratkotrajne oralne primjene soka (Tiptiri-Kourpeti i sar., 2019).

Količina antocijana je različita u zavisnosti od stepena zrelosti ploda, određivana je spektrofotometrijski, i pokazalo se da iznosi 11,2 mg/100 g u metanolnim ekstraktima nezrelih plodova i 92,2 mg/100 g u metanolnom ekstraktu zrelih plodova drena. Glavni antocijanin, 3-galaktozid cijanidin, određen je tečnom hromatografijom visokih performansi i kretao se od 19,0 do 80,3 % (Perova i sar., 2014). Ispitivanjem drenjine sa područja Crne Gore i Srbije dobijeni su slični rezultati, gdje se koncentracija antocijana ispitivanih vrsta kretala od 0 do 157,06 mg/100 g (0-0,157 %) (Jaćimović i sar., 2020). Iz oblasti Azerbejdžana proučavana je antioksidativna aktivnost plodova, listova i koštica drena (*Cornus mas* L.) i utvrđeno je da različiti dijelovi drena sadrže različitu količinu biološki aktivnih materija. Najveći sadržaj antocijana imaju plodovi drena, flavonoida i fenola listovi, a katehina ima najviše u košticama. Sadržaj antocijana se kretao od 0,053 do 0,434 % (Novruzov i sar., 2019). U 18 genotipova drenjina iz oblasti Srbije praćene su antioksidativne karakteristike u toku dvije godine istraživanja, 2007. i 2008. godine. U toku

ovog istraživanja uočene su značajne razlike u hemijskom sastavu plodova. Sadržaj antocijana i tanina, za sve genotipove, je bio veći u 2007. nego u 2008. godini. Količina antocijana, za različite genotipove, se kretala od 36,35 do 116,38 mg/100 g voća. U ovom radu je ispitivan i mineraloški sastav plodova drenjine u vegetacionom periodu iz 2008. godine. Postoje značajne razlike u sadržaju različitih elemenata u zavisnosti od genotipa, npr. utvrđene su varijacije za sadržaj kalcijuma i magnezijuma (Bijelić i sar., 2011). Takođe, vršena su i ispitivanja antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata deset genotipova drenjine, iz oblasti Srbije. Autori su uočili varijacije u sadržaju bioaktivnih supstanci između genotipova drenjine. Sadržaj antocijana je određen spektrofotometrijski i kretao se od 0,058 do 3,029 mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida/g. Osim toga, između ukupnog sadržaja fenola i antocijana primijećena je pozitivna korelacija ( $r = 0,5854$ ). FRAP vrijednost se kretala od 21,0 do 57,8 FRAP jedinica. Kod ove vrijednosti je primijećena pozitivna korelacija sa svim ispitivanim parametrima, a najveća pozitivna korelacija je uočena između FRAP-a i ukupnog sadržaja fenola (Popović i sar., 2012). Sadržaj antocijana je određivan i hromatografski i dobijen je rezultat koji iznosi 1383,20 mg/kg. Hromatografski su određivani i pojedinačni antocijanini, kao npr. cijanidin-3-galaktozid (1006,78), pelargonidin-3-glukozid (327,29) i delphinidin-3-glukozid (49,13) (Milenković Anđelković i sar., 2015).

Sadržaj tanina je određivan spektrofotometrijski, pomoću standardnog praha kože i izražen je u procentima. Antioksidativni kapacitet plodova zavisi od genotipa, stepena zrelosti i mnogih drugih faktora. Tako, plodovi drenjine u svijetložutom stadijumu imaju najveći ukupni fenolni i antioksidativni kapacitet, kao i sadržaj tanina. Sadržaj tanina se smanjio sa stepenom zrelosti, od svijetložute do tamnocrvene faze (sa 0,45 na 0,19 %) (Gunduz i sar., 2013). Količina tanina za različite genotipove drenjina iz oblasti Srbije, u dvogodišnjem ispitivanju, se kretala od 0,73 do 1,21 % (Bijelić i sar., 2011).

Za procjenu ukupne antioksidativne aktivnosti primijenjuju se FRAP, DPPH i ABTS metoda a dobijeni rezultati se razlikuju u zavisnosti od primijenjene metode kao i zemlje porijekla drenjine. Tako je, antioksidativna aktivnost drenjina procijenjena pomoću FRAP metode, iz oblasti Italije iznosila je 20,41 mmol  $Fe^{+2}$ /kg (De Biaggi i sar., 2018), iz područja Irana 235  $\mu$ mol/g FRAP, dok se za DPPH ova vrijednost kretala od 3,95 do 9,67 mg/ml (Behrangi i sar., 2015), a za drenjine iz oblasti Rumunije, vrijednost dobijena pomoću DPPH metode se kretala od 1,24 do 2,71 mmol Trolox/100 g (Cosmulescu i sar., 2019). Prilikom ispitivanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta

12 sorti drenjina (*Cornus mas* L.) iz oblasti Češke, uočena je visoka korelacija između polifenola i antioksidativne aktivnosti u plodovima ( $r^2 = 0,970$  za DPPH test i  $r^2 = 0,978$  za ABTS test) (Rop i sar., 2010). Antioksidativna aktivnost ispitana pomoću DPPH i ABTS metode iz vodenih ekstrakata drenjina je slična, tj. iznosi 508,12 mg TEAC/100 g za DPPH i 506,08 mg TEAC/100 g za ABTS (Karaaslan i sar., 2018). DPPH vrijednost drenjina, iz oblasti Kavkaza, iz vodenometanolnih ekstrakata plodova je veća u poređenju sa prethodnim rezultatom i kretala se od 470,5 do 932,0 mg TE/100 g (Perova i sar., 2014). Osim toga, može se ispitati antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata različitih organa drena upotrebom DPPH metode. Antioksidativna aktivnost se kretala od 30 do 93 %. Najveću antioksidativnu aktivnost imao je ekstrakt dobijen iz koštica (93 %), a najmanju iz plodova (30 %) (Novruzov i sar., 2019).

## 2.5 MAKROELEMENTI I MIKROELEMENTI

Metalni joni su potrebni ljudskom organizmu zbog održavanja bioloških funkcija, a njihovo odsustvo ili nedostatak može dovesti do raznih bolesti (Gupta, 2018, Aliyu i sar., 2015). Mogu se podijeliti u dvije grupe, kao makro i mikro elementi. Makroelementi uključuju kalcijum, magnezijum, fosfor, natrijum, kalijum dok mikroelementi uključuju gvožđe, bakar, kobalt, jod, cink, mangan, molibden, fluor, hrom, selen i sumpor (Bhattacharya i sar., 2016).

U organizam svakodnevno treba unositi različite elemente. S obzirom da hemijski elementi dolaze u obliku soli nazivaju se mineralnim materijama (Hodžić, 2013). Minerali mogu biti klasifikovani kao makro (glavni), mikro (tragovi) i ultramikro elementi (Eruvbetine, 2003). To su neorganski nutrijenti, obično potrebni u malim količinama od manje od 1 do 2500 mg dnevno, zavisno od minerala. Kao i kod vitamina i drugih esencijalnih hranljivih materija, potrebe za mineralima variraju u zavisnosti od životinjskih vrsta (Soetan i sar., 2010). Mineralne materije su jako bitne za regulisanje fizičko-hemijskih procesa u ćelijama, neophodnih za normalno funkcionisanje organizma. Takođe, imaju u organizmu različitu fiziološku funkciju. Mineralne materije su sastavni dio koštanog tkiva, tjelesnih tečnosti, organskih jedinjenja (npr. željezo u hemoglobinu). Minerali su esencijalne materije koje mogu biti neorganskog ili neorgansko-organskog porijekla i neizostavan su dio ishrane. Vrlo su važni za ljudski organizam iako ih organizam ne može sam proizvesti, zbog toga se moraju unositi u organizam putem hrane. Od minerala zavise brojne funkcije ljudskog organizma (Hodžić, 2013, Dahl i Turner, 2022). Mineralni joni su od primarne

važnosti u određivanju nutritivne vrijednosti voća, od kojih su glavni kalijum, kalcijum i magnezijum. Značaj minerala kao što su kalijum, kalcijum, natrijum itd. za ljudsko zdravlje je dobro poznat. Potrebne količine ovih elemenata moraju biti zastupljene u ljudskoj ishrani da bi se ostvario dobar i zdrav život (Valvi i Rathod, 2011).

Elementi u tragovima štite ćeliju od oksidativnog stresa jer su ovi minerali kofaktori antioksidativnih enzima. Cink, bakar i mangan su neophodni za normalno funkcionisanje enzima superoksid dismutaze. Natrijum, kalijum, gvožđe, kalcijum i mnogi elementi u tragovima zajedno sa antioksidativnim vitaminima su neophodni za održavanje zdravog fizičkog stanja organizma (Salma i sar., 2015). Gvožđe je glavni sastojak hemoglobina u crvenim krvnim zrnima koji je zadužen za prenos kiseonika do ćelija tijela (Nisa i sar., 2020).

Mikroelementi su bitne komponente enzimskih sistema. Nedostaci mineralnih elemenata negativno utiču na metabolizam i strukturu tkiva. Za procjenu unosa ishranom i adekvatnosti minerala, potrebno je prikupiti informacije o sadržaju mineralnih elemenata u namirnicama. Mineralni elementi u uzorcima biljaka i tla se mogu odrediti kolorimetrijskim postupkom, nakon odgovarajuće pripreme uzorka. Priprema uzoraka hrane i vode se vrši u prostorijama bez prašine kako bi se izbjegla moguća kontaminacija (Al-Taesh i sar., 2021).

Mineralni sastav drenjina određivan je primjenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS). Postupak pripreme uzorka nije isti kod svih eksperimentatora, ali glavni cilj je da se prevedu uzorak u tečno stanje primjenom odgovarajuće kiseline. Tako se, na primjer, priprema uzorka za određivanje sadržaja pojedinih metala u zemljištu, listu i plodovima nekoliko biljnih vrsta, među kojima je i drenjina, sa područja jugoistočne Srbije, sastoji od sušenja na 105 °C 24 h, zatim mjerenja 1 g uzorka u lončiću od silicijum-dioksida i žarenja u peći 2 h na 450 °C, nakon čega se uzorak rastvara uz dodatak hlorovodonične i nitratne kiseline i dopuni do određene zapremine. Radni standardi su pripremljeni razblaživanjem standarda sa 0,1 M nitratnom kiselinom. Sadržaj Zn se kretao od 2,82 do 16,54 u plodovima drenjine, Mn od 2,22 do 7,99, Fe od 123,8 do 221,7, Cu od 2,57 do 10,38, Cd 0,08 do 0,38 mg/kg. Nije utvrđeno da plodovi drenjine sadrže jone olova i nikla (Randjelovic i sar., 2014). Sadržaj pojedinih metala u plodovima drene, zavisi osim od genotipa i od zemlje porijekla. U slučaju drenjina iz oblasti Turske sadržaj Fe i Zn je manji u poređenju sa drenjinama iz oblasti Srbije (Fe - 2,78 i Zn - 1,34 mg/kg), a sadržaj makroelemenata je iznosio za Ca - 425,92, K - 2090,82 i Mg - 104,23 mg/kg (Karaaslan i sar., 2018). Odsustvo toksičnih metala predstavlja pokazatelj kvaliteta ploda, pa su određivanjem fizičko-hemijskih

parametara i toksičnih metala u uzorcima mješavine meda i divlje drenjine i određivanjem u pojedinačnim uzorcima meda i drenjine dobijeni podaci koji ukazuju na odsustvo kadmijuma i olova u svim uzorcima, da je najveći sadržaj Cu i Zn u drenjini, a zatim u mješavini drenjine i meda, dok uzorak meda sadrži najveću količinu Fe. Uzorak drenjine sadrži: 10,216 mg/kg Fe; 2,665 mg/kg Cu i 14,41 mg/kg Zn (Ahmetović i sar., 2020).

## **2.6 METODE ANALIZE**

Proučavanje antioksidanasa i njihova implikacija u različitim oblastima je od velikog interesa za nauku. Najvažniji testovi koji se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti su: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,20-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Power), ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity), HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity) i TRAP (Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter). Ovi testovi se uspješno primjenjuju u analizi antioksidanasa ili u određivanju antioksidativnog kapaciteta kompleksnih uzoraka. Svi ovi testovi su zasnovani na hemijskim reakcijama a dostizanje ravnotežnog stanja se prati spektrofotometrijski (Munteanu i Apetrei, 2021).

### **2.6.1 UV/VIS spektroskopija**

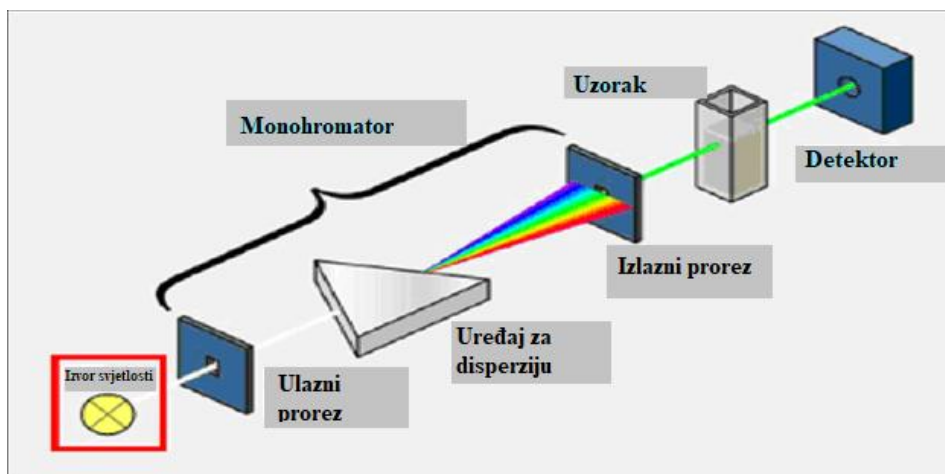
UV-Vis spektroskopija je analitička tehnika kojom se mjeri količina svjetlosti koju uzorak apsorbira, pri čemu je opseg talasnih dužina svjetlosti u oblasti ultraljubičastog (185 - 400 nm) i vidljivog (400 - 700 nm) dijela spektra. Količina apsorbirane svjetlosti zavisi od osobina uzorka. Na opseg talasnih dužina u vidljivoj oblasti spektra reaguje ljudsko oko. Jedinjenja koja apsorbiraju zračenje u vidljivom dijelu spektra su obojena. Boja rastvora određivane supstance ili čvrstog tijela komplementarna je onoj boji koju ispitivana supstanca apsorbira.

Za mjerenje apsorbancije, odnosno transparentije u UV/Vis oblasti spektra koriste se instrumenti koji se nazivaju spektrofotometri (Namioka, 2000, Kim i Sunwoo, 2019).

Spektrofotometar se sastoji od izvora svjetlosti, kolimatora, monohromatora, birača talasnih dužina, kivete za rastvor uzorka, fotoelektričnog detektora i digitalnog ekrana ili mjerača (Aceto i



sar., 2014, Braga i Gomes, 2019). Na slici 12 je prikazana pojednostavljena šema glavnih komponenti jednozračnog UV-Vis spektrofotometra (Gohain, 2019).



Slika 12. Pojednostavljena šema jednozračnog UV-Vis spektrofotometra (Gohain, 2019)

Osnovni zakon koji opisuje zavisnost veličina koje se mjere je Lamber-Berov zakon ili Berov zakon, kako se češće naziva. Količina fotona koja prolazi kroz kivetu i dolazi do detektora zavisi od dužine kivete i koncentracije uzorka. Ako je poznat intenzitet svjetlosti koji prođe kroz kivetu, može se odrediti propustljivost ( $T$ ). Propustljivost je dio svjetlosti koji prolazi kroz uzorak, jednačina (1) (Tomar i Kaur, 2019):

$$T = I_t / I_0 \quad (1)$$

gdje je  $I_t$  intenzitet svetlosti nakon što snop svjetlosti prođe kroz kivetu, a  $I_0$  je intenzitet svjetlosti prije nego što snop svjetlosti prođe kroz kivetu (Tomar i Kaur, 2019).

Propustljivost je povezana s apsorpcijom izrazom (2) (Tomar i Kaur, 2019):

$$A = -\log(T) \quad (2)$$

gdje je  $A$  apsorbancija.

Prema Berovom zakonu postoji linearna zavisnost između apsorbancije i koncentracije uzorka. Iz tog razloga, Berov zakon se može primijeniti samo ako postoji linearni odnos između apsorbancije i koncentracije. Ovaj zakon je dat jednačinom (3) (Tomar i Kaur, 2019):

$$A = \epsilon lc \quad (3)$$

gdje je:  $A$  – apsorbancija;

$\epsilon$  - molarna apsorpcija (ili koeficijent apsorpcije);

l - dužina puta;

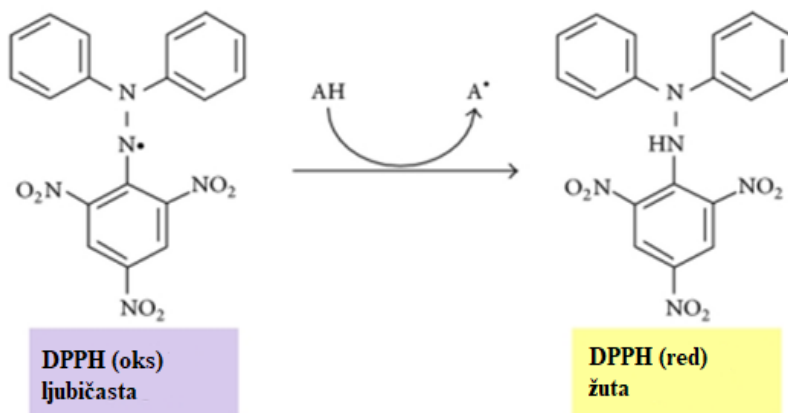
c- koncentracija.

Iako apsorpcija zračenja u UV i vidljivoj oblasti spektra predstavlja isti fenomen, tj. u oba slučaja dolazi do apsorpcije usljed prelaska valentnih elektrona iz nižeg u više energetske stanje ove dvije metode se tretiraju odvojeno. Apсорpcija u vidljivom dijelu spektra pretežno se koristi u analizi neorganskih jedinjenja dok se apсорpcija u UV oblasti pretežno koristi u organskoj analizi. UV spektroskopija se uglavnom koristi kao komplementarna metoda. Osim što se koristi za identifikaciju dijelova molekula (hromofora) koji apsorbuju u UV oblasti spektra koristi se i za kvantitativnu analizu. UV/Vis spektri daju veoma korisne informacije o strukturi ispitivanog jedinjenja. UV/Vis spektroskopija je nezamjenljiva pomoćna, a vrlo često i glavna, metoda koja služi za identifikaciju prirodnih jedinjenja, kao što su npr. fenoli, flavonoidi, antocijani itd.

#### 2.6.1.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test

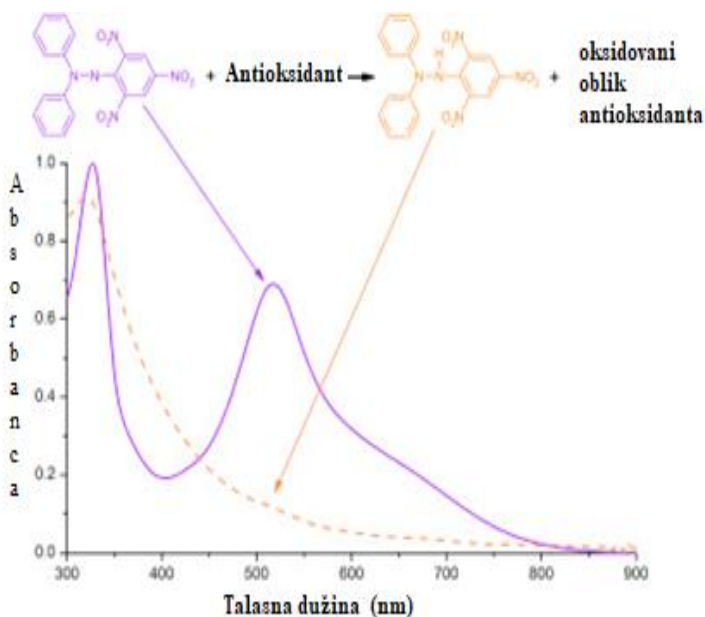
DPPH je skraćena za organsko jedinjenje 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil. DPPH je brza, jeftina i široko korišćena metoda za mjerenje antioksidativne aktivnosti mnogih ekstrakata. Zasniva se na redukciji rastvora DPPH radikala (DPPH•) redukcionim sredstvom. DPPH je tamni prah koji je rastvorljiv u metanolu ili etanolu. Primjenom ove metode određuje se antioksidativni potencijal različitih jedinjenja pomoću stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-pikrilhidrazila (Blois, 1958, Munteanu i Apetrei, 2021, Kedare i sar., 2011).

Nespareni elektron koji se nalazi na atomu azota u DPPH se redukuje pomoću vodonika iz antioksidansa. Prilikom miješanja rastvora DPPH sa supstancom koja može donirati atom vodonika, dolazi do redukcije i gubitka ljubičaste boje. DPPH• je u početku ljubičaste boje, a nakon prelaska u DPPH-H prelazi u žutu, što je prikazano na slici 13, a mjeri se na 515 nm. Promjena boje djeluje kao pokazatelj antioksidativne aktivnosti. Brzina reakcije zavisi od prirode antioksidansa, a količina formiranog DPPH-H zavisi od koncentracije antioksidansa (Teixeira i Gaspar, 2013, Munteanu i Apetrei, 2021, Sirivibulkovit i sar., 2018).



Slika 13. Promjena boje DPPH radikala u prisustvu antioksidansa (Teixeira i Gaspar, 2013)

Ova promjena boje je povezana sa promjenom apsorpcije što je iskorišćeno za određivanje antioksidativne aktivnosti jedinjenja, jer kada se elektron upari u prisustvu antioksidansa dolazi do smanjenja apsorpcije, što je prikazano na slici 14 (Wollinger i Perrin, 2016).

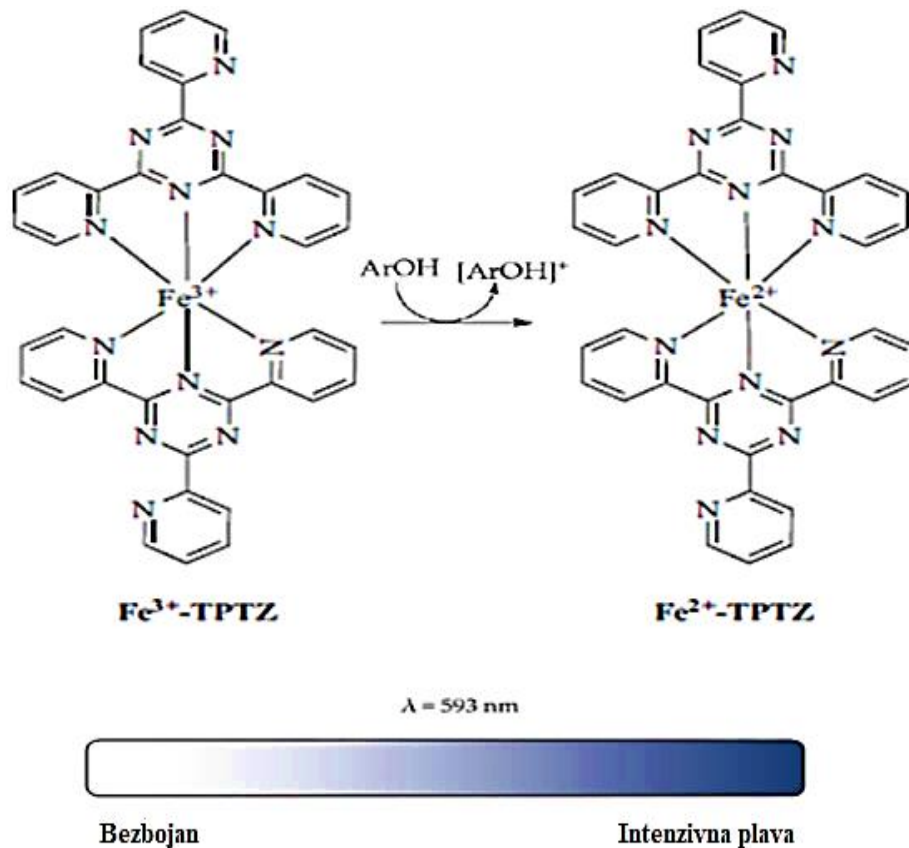


Slika 14. Smanjenje apsorpcione snage u prisustvu antioksidansa (Wollinger i Perrin, 2016)

DPPH metoda primjenjuje se za određivanje antioksidativne aktivnosti antioksidanasa iz hrane, enzima, neenzimskih antioksidanasa itd. Takođe, primjenjuje se za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti u sokovima i tropovima različitih biljnih vrsta.

### 2.6.1.2 FRAP test

FRAP test se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa gvožđe-2,4,6-tripiridil-s-triazina pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks u kojem željezo ima oksidacioni broj +2, što je prikazano na slici 15. Reakcija se odvija u kiseljoj sredini, pri pH=3,6. Svako jedinjenje sa redoks potencijalom nižim od redoks potencijala  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  para, teorijski može redukovati  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$  i omogućiti visoke FRAP vrijednosti (Fernandes i sar., 2016, Munteanu i Apetrei, 2021).



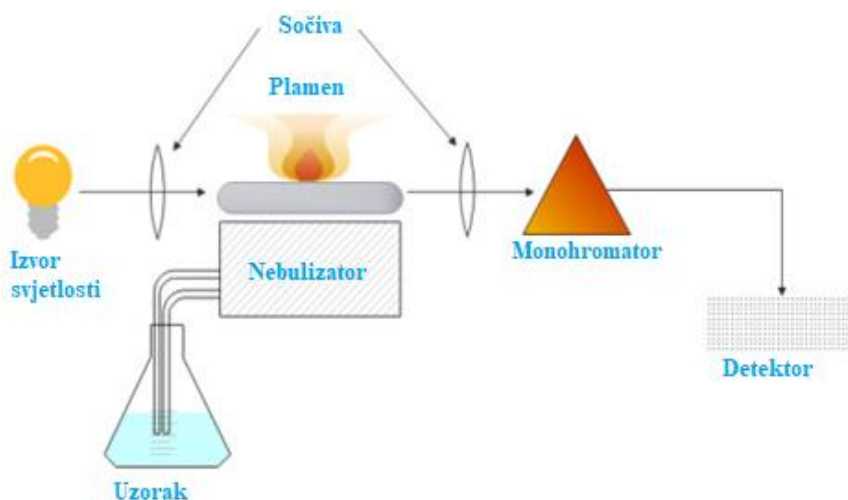
Slika 15. Reakcija na kojoj se bazira FRAP metoda (Munteanu i Apetrei, 2021).

Antioksidativna aktivnost se određuje kao povećanje apsorbanije na 593 nm.

## 2.6.2 Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS)

Atomska apsorpciona spektroskopija je jedna od instrumentalnih tehnika koja se koristi za kvantitativnu i kvalitativnu analizu elemenata u neorganskim ili organskim materijalima (Lagalante, 2007). Metoda AAS se bazira na mjerenju apsorbovanog zračenja od strane hemijskog elementa koji se određuje. Metode atomske apsorpcije mjere količinu energije u obliku fotona svjetlosti koju apsorbuje uzorak (Farrukh, 2012).

AAS metoda se odigrava u dva koraka. Prvi je, pretvaranje molekula analita u atome (proces atomizacije), a drugi apsorpcija zračenja karakteristične talasne dužine od strane slobodnih atoma. Princip određivanja zasniva se na Lamber-Berovom zakonu gdje je apsorbancija direktno proporcionalna koncentraciji atoma u uzorku. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektrometra dat je na slici 16. AAS se razlikuje od drugih spektroskopskih tehnika po prirodi izvora zračenja koji se koristi, kao i izvora toplote koji se koriste za atomizaciju uzorka (Lagalante, 2007).



Slika 16. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektrometra (Fairulnizal i sar., 2019).

Prilikom anize uzorka element se, primjenom odgovarajućeg izvora energije, pretvara u atomsku paru, a zatim se mjeri apsorpcija. Atomizacija se postiže raspršivanjem rastvora uzorka u plamen ili grafitnu peć. Ova analitička metoda je vrlo osjetljiva jer su linije atomske apsorpcije izuzetno uske, takođe, energija prelaza iz osnovnog u više energetske stanje je karakteristična za svaki

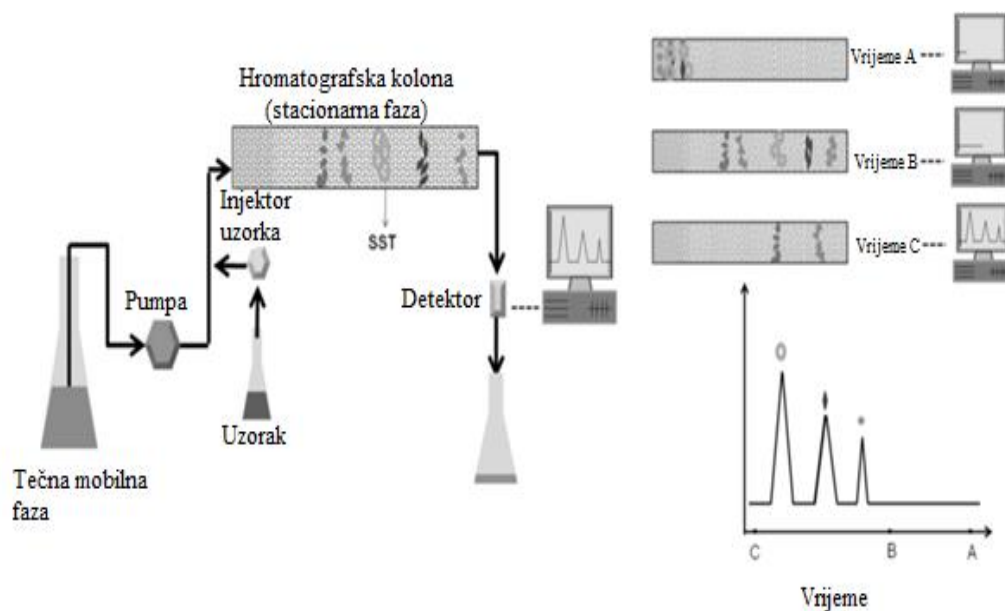
element. Da bi se smanjio problem, prouzrokovan ograničenom širinom linija, neophodno je koristiti snop koji sadrži visok intenzitet svjetlosti potrebnih talasnih dužina. Ovo se postiže upotrebom lampe sa šupljom katodom, (Paul i sar., 2017).

Lampa sa šupljom katodom sastoji se od zatvorene staklene cijevi napunjene inertnim gasom, uglavnom argonom, gdje su postavljene anoda (pozitivni pol) i katoda (negativni pol). Katoda sadrži element koji se ispituje u datom uzorku. Usled potencijalne razlike atomi argona se jonizuju i kreću u smjeru katode gdje, atomi metala pogođeni jonima gasa prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje. Prilikom njihovog povratka u osnovno stanje emituje se svjetlost karakteristične talasne dužine. Nedostatak njihove primjene u AAS je potreba za različitom lampom za svaki element. Analiza postaje spora i skupa prilikom određivanja niza elemenata (Izario Filho i sar., 2012).

### **2.6.3 Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)**

Tečna hromatografija visokih performansi koristi se u analizama za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih jedinjenja (Martin i Guiochon, 2010). U hromatografskom procesu vrste se raspoređuju između dvije faze koje se ne mešaju. Jedna faza teče (mobilna faza) i nosi komponente smješe kroz medijum koji se koristi, a druga miruje (stacionarna faza). Vrijeme zadržavanja varira zavisno od interakcija između stacionarne faze, molekula koji se analiziraju i korišćenih rastvarača (Liu i sar., 2006). Uzorak koji se analizira uvodi se u struju mobilne faze i usporava se specifičnim hemijskim ili fizičkim interakcijama sa stacionarnom fazom. (Abidi, 1991).

Šematski prikaz tečnog hromatografa visokih performansi (HPLC) je dat na slici 17. Pokretna mobilna faza koja nosi analit teče kroz hromatografsku kolonu (stacionarna faza) pod visokim pritiskom. U koloni se komponente analita odvajaju zbog različite sile retencije u stacionarnoj fazi (Bergh i Breytenbach, 1987). Veličina sile zadržavanja zavisi od interakcija (kao što su hidrofobna interakcija, dipol-dipol interakcija, jonska interakcija, itd.) komponente sa mobilnom i stacionarnom fazom. Veličina detektovanog signala proporcionalna je količini odgovarajuće komponente (Yang i sar., 2015).



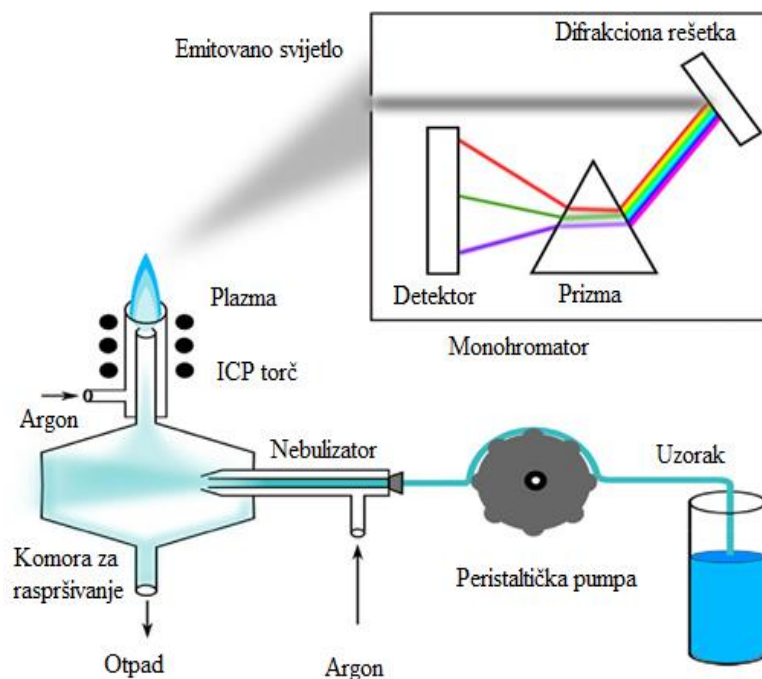
Slika 17. Šematski prikaz tečnog hromatografa visokih performansi (Yang i sar., 2015)

#### 2.6.4 Atomska emisiona spektroskopija sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES)

Atomska emisiona spektroskopija sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES) je moderna i multifunkcionalna analitička tehnika namijenjena za analizu elementa u različitim uzorcima kao što su ekološki, industrijski i biljni uzorci sa širokim rasponom koncentracija (Petrova i sar., 2022). ICP-OES tehnika je zasnovana na spontanoj emisiji fotona iz jona ili atoma nakon ekscitacije koju izaziva plazma, a ovi fotoni posjeduju karakterističnu energiju koja zavisi od nivoa energetske strukture i vrste jona i atoma (Hou i Jones., 2006). Ova tehnika ima niz prednosti u poređenju sa drugim spektroskopskim metodama, tj. ima nisku granicu detekcije, manje hemijskih smetnji i kraće vrijeme rada i mogućnost istovremenog određivanja više elemenata (Ghosh i sar., 2013). Tehnika optičke emisiona spektroskopije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) se pojavljuje kao najistaknutija tehnika pomoću koje se može odrediti preko 70 elemenata u jedinstvenom analitičkom postupku, zauzima vrlo značajno mjesto i u farmaceutskoj industriji (Giussani i sar., 2009).

Šema ICP-OESa predstavljena je na slici 18. Obično se tečni uzorak, koji sadrži analit, pumpa u sistem za uvođenje uzoraka, koji se sastoji od nebulizatora i komore za raspršivanje. U nebulizatoru, gas argon se koristi za formiranje aerosola. Unutar komore za raspršivanje, aerosol se odvaja po veličini kapljica, veće kapljice se odvođe iz sistema a samo mali dio tečnosti ide dalje

do plazme. Zatim tečnost isparava i dolazi do atomiziraje i joniziraje. Energija plazme pobuđuje elektrone, pri čemu dolazi do njihovog prelaza iz osnovnog u više energetske stanje. Kada se vraćaju iz ekscitovanog stanja, ovi joni emituju fotone karakteristične talasne dužine, jedinstvene za svaki element. Emitovana svjetlost koja sadrži brojne talasne dužine fokusirana je na difrakcionu rešetku i prizmu, koje se koriste za razdvajanje spektra na njegove sastavne talasne dužine. Intenzitet emitovane svjetlosti proporcionalan je koncentraciji određenih elemenata u uzorku (Cherevko i Mayrhofer, 2018).



Slika 18. Šematski prikaz ICP-OESa (Cherevko i Mayrhofer, 2018)

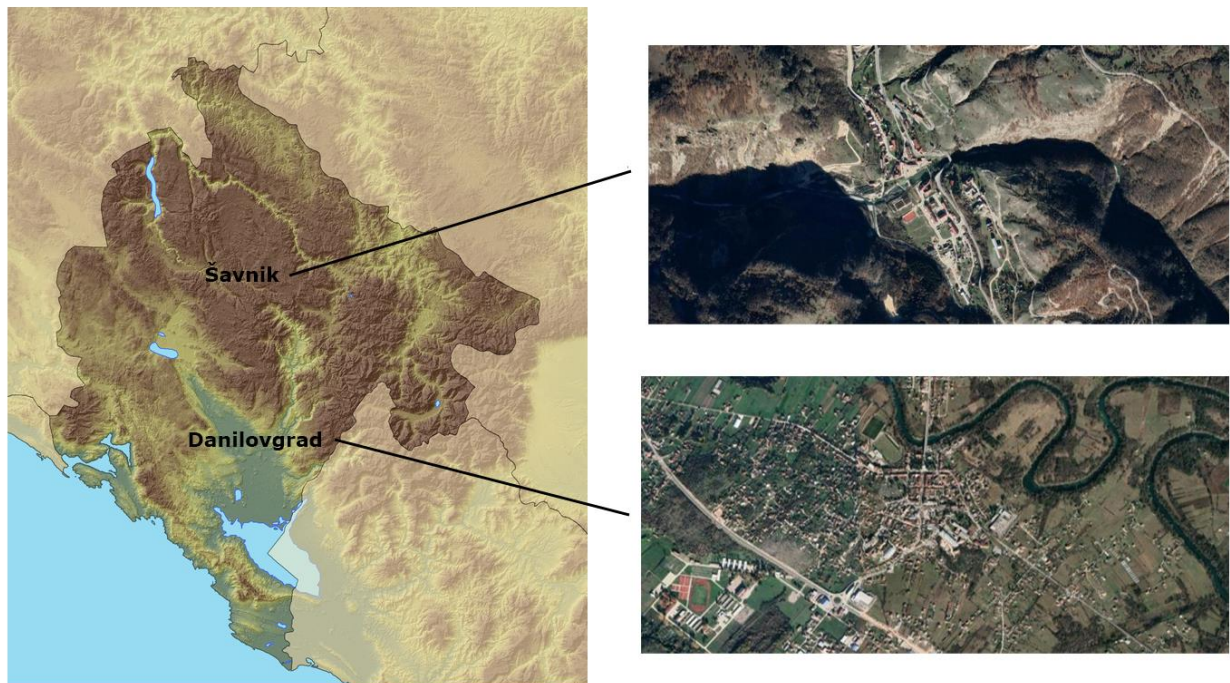


### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 UZORKOVANJE DRENJINE

Drenjina, korišćena u ovom istraživanju, potiče iz Šavnika (sjeverni dio Crne Gore) i Danilovgrada (centralni dio Crne Gore) (Slika 19). Navedene lokalitete karakterišu različiti ekološki faktori. Naime, Šavnik se nalazi na nadmorskoj visini od 995 m, gdje vlada planinska klima, dok je nadmorska visina Danilovgrada znatno niža (48 m) i odlikuje ga mediteranska klima. Zbog različitih klimatskih uslova plod drenjine u Šavniku sazrijeva u oktobru, dok plod drenjine u Danilovgradu sazrijeva ranije, u septembru.

Sakupljeni biljni uzorci su nakon procesa cijedenja podijeljeni na sok ( $S_1$ ) i trop ( $T_1$ ) drenjine sa područja Šavnika, i sok ( $S_2$ ) i trop ( $T_2$ ) iz oblasti Danilovgrada. Uzorci su zatim zamrznuti i čuvani do dalje analize.



Slika 19. Mapa Crne Gore sa lokalitetima uzorkovanja

## **3.2 PRIPREMA UZORAKA DRENJINE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA MAKROELEMENATA I MIKROELEMENATA**

### **3.2.1. Određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS)**

Nakon odmjeravanja oko 2 g soka, tropa i cjelokupnog ploda drenjine dodato je po 28 ml 65 % HNO<sub>3</sub> i 4 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uzorci su zatim upareni do zapremine od 16 ml, nakon čega su kvantitativno prenešeni u normalne sudove od 100 ml, dopunjeni destilovanom vodom do crte i sačuvani za AAS analizu.

Mjerenja makroelemenata i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima drenjine izvršena su na atomskom apsorpcionom spektrometru Perkin Elmer PinAAcle 900T.

### **3.2.2. Određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata optički emisionom spektroskopijom sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)**

Nakon odmjeravanja oko 1 g soka i po 0,5 g tropa i cjelokupnog ploda drenjine dodato je po 5 ml 65 % HNO<sub>3</sub> i 1 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon mikrotalasne digestije, uzorci su kvantitativno prenešeni u normalne sudove od 25 ml, dopunjeni destilovanom vodom do crte i sačuvani za ICP-OES analizu. Mjerenja makroelemenata i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima drenjine izvršena su na optičkom emisionom spektrometru sa indukovano spregnutom plazmom, Thermo Fisher Scientific iCAP 6000.

### **3.2.3. Određivanje nutritivne vrijednosti drenjine**

Da bi se procijenio doprinos dnevnom unosu esencijalnih makroelemenata i mikroelemenata prilikom konzumiranja ispitivane drenjine korišćena je porcija od 300 g svježih plodova po obroku. Ovakva porcija sadrži oko 48 g suvog ostatka.

Dnevni unos elemenata (DMI, %) računat je na osnovu jednačine:

$$DMI = \frac{C \times 100}{RDA}$$

gdje je:

RDA - preporučene dnevne potrebe elemenata prema direktivi Evropske unije (EEC) (European Economic Community-EEC, 2008),

C - sadržaj makroelementa ili mikroelementa (mg) u 300 g obroka.

Da bi se izveo zaključak o unosu toksičnih elemenata i na osnovu toga procijenio eventualni rizik po zdravlje korisnika dnevni unos (DI, %) Cd, Pb i Ni je računat na osnovu jednačine:

$$DI = \frac{C \times 100}{MDI}$$

gdje je:

MDI -maksimalni dnevni unos koji se može tolerisati (EFSA – European Food Safety Authority) (European Food Safety Authority, 2012, European Food Safety Authority, 2010, European Food Safety Authority, 2015).

### **3.3 HEMIJSKA ANALIZA SOKA I TROPA DREJINE**

Za određivanje sadržaja bioaktivnih komponenti u ispitivanim uzorcima drenjine korišćen je spektrofotometar BUCK Scientific 105 UV-VIS spectrophotometer.

#### **3.3.1 Određivanje sadržaja ukupnih fenola**

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je po Folin-Ciocalteu metodi. Za određivanje je uzet 1 ml soka, odn. 1 g tropa ispitivanih uzoraka drenjine S<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>2</sub> (25,41 mg/ml, 25,17 mg/ml, 25,25 mg/ml, 25,11 mg/ml, respektivno) i pomiješano sa 0,5 ml Folin Ciocalteu reagensa (razblažen deset puta), nakon čega je u smješu dodato 2,5 ml 7,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Posle 120 min stajanja na tamnom mjestu, apsorbancija ovako pripremljenih rastvora je očitana na talasnoj dužini od λ=740 nm. Serija standardnih rastvora galne kiseline (u opsegu od 5 - 35 mg/ml) korišćena je za konstrukciju kalibracione krive. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po 100 g biljne sirovine (mg GAE/100 g) i predstavljaju srednju vrijednost tri nezavisna mjerenja.

### 3.3.2 Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen miješanjem 1 ml, odn. 1 g odgovarajućeg ispitivanog uzorka drenjine (S<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>), 3 ml dejonizovane vode i 0,3 ml NaNO<sub>2</sub>. Nakon 5 minuta stajanja na sobnoj temperaturi, u smješu je dodato 3 ml 1 % AlCl<sub>3</sub>, a zatim i 2 ml 1M NaOH. Uzorci su kvantitativno prenešeni u normalne sudove od 10 ml, dopunjeni dejonizovanom vodom do crte, nakon čega je izmjerena apsorbancija na talasnoj dužini od λ=415 nm. Kalibraciona kriva je konstruisana pravljjenjem serije standardnih rastvora kvercetina (početne koncentracije 1 mg/l). Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina po 100 g biljne sirovine (mg QE/100 g) i predstavljaju srednju vrijednost tri nezavisna mjerenja.

### 3.3.3 Određivanje sadržaja tanina

Metoda za određivanje tanina opisana je u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. (Council of Europe, 2016). Njihov sadržaj je izračunat na osnovu razlike u apsorbanciji ukupnih polifenola (A<sub>1</sub>) dobijenih nakon tretiranja uzoraka (S<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>) fosfomolibdovolframovim reagensom u alkalnom medijumu i polifenola koji se ne adsorbuju na kožni prah (A<sub>2</sub>). Apsorbancije su izmjerene na talasnoj dužini od 760 nm.

Sadržaj tanina, izražen kao procenat pirogalola, izračunat je uz pomoć formule:

$$\frac{62,5 (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je:

m<sub>1</sub> - masa ispitivanih uzoraka drenjine (S<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>) u gramima,

m<sub>2</sub> - masa pirogalola u gramima,

A<sub>3</sub> – apsorbancija pirogalola

### 3.3.4 Određivanje sadržaja antocijana

Ukupan sadržaj antocijana je određen nakon hidrolize ispitivanih uzoraka drenjine (S<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>) smješom MeOH/HCl, po metodi koja je opisana u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. (Council of Europe, 2016). Intenzitet apsorbancije je izmjeren na talasnoj dužini od 528 nm.

Procenat antocijana, izražen preko cijanidin-3-glukozid hlorida, izračunat je prema formuli:

$$\frac{Ax \ 5000}{718 \ x \ m}$$

gdje je:

A - apsorbancija na 528 nm,

m - masa ispitivanih uzoraka drenjine (S<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>) u gramima.

### 3.3.5 HPLC metoda

Koncentracije ispitivanih uzoraka drenjine za HPLC analizu bile su 99,36 mg/ml, 100,58 mg/ml, 298,65 mg/ml, 314,20 mg/ml za S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, respektivno. Nakon filtriranja u staklene viala uzorci su analizirani. Njihova zapremina iznosila je 4 µL.

Standardni etanolni rastvori korišćeni u HPLC analizi pripremljeni su u sledećim koncentracijama: 0,46 mg/ml delphinidin-3-glukozid, 0,49 mg/ml cijanidin-3-galaktozid, 0,50 mg/ml cijanidin-3-glukozid i 0,48 mg/ml pelargonin-3-glukozid. Zapremina standardnih rastvora je, takođe, bila 4 µL. Identifikacija jedinjenja izvršena je na osnovu vremena zadržavanja i preklapanja spektra, a kvantifikacija eksternom kalibracijom sa standardima. Identifikacija i kvantifikacija antocijana izvršena je na HPLC aparatu (Agilent Tehnologija 1200).

### 3.3.6 Određivanje antioksidativnih svojstava soka i tropa drenjine

#### 3.3.6.1 Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test

U 300 µl etanolnih rastvora ispitivanih uzoraka drenjine koncentracija 46,47 mg/ml, 50,52 mg/ml, 42,20 mg/ml, 49,56 mg/ml za S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, respektivno, dodato je po 2,7 ml 0,1 mM etanolnog rastvora DPPH. Apsorbancija (na talasnoj dužini od 517 nm) navedenih smješa je izmjerena nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi, uz etanol kao slijepu probu. Procenat inhibicije DPPH izračunat je prema sljedećoj formuli (Blois, 1958):

$$\% = 100 - \left[ (A_S - A_B) \times \frac{100}{A_C} \right]$$

gdje je:

A<sub>S</sub> - apsorbancija etanolnih rastvora uzoraka drenjine (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) prethodno tretiranih DPPH rastvorom,

A<sub>B</sub> - apsorbancija etanolnih rastvora uzoraka drenjine (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>) bez prethodnog tretiranja DPPH rastvorom,

A<sub>C</sub> - apsorbancija etanolnog rastvora DPPH.

Za prikazivanje rezultata ovim testom se koristi IC<sub>50</sub> vrijednost. IC<sub>50</sub> vrijednost predstavlja koncentraciju uzorka koja dovodi do neutralizacije 50 % DPPH radikala, a koja se dobija iz zavisnosti IC<sub>50</sub> i koncentracije uzorka (Rivero-Cruz i sar., 2020).

### 3.3.6.2 Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test

U 100 µl etanolnih rastvora ispitivanih uzoraka drenjine odgovarajućih koncentracija 46,10 mg/ml, 46,39 mg/ml, 44,64 mg/ml, 43,88 mg/ml za S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, respektivno, je dodato 3,0 ml svježe pripremljenog FRAP reagensa (25 ml 300 mmol/l acetatnog pufera, pH vrijednosti 3,6; 2,5 ml 10 mmol/l rastvora TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) u 40 mM rastvoru HCl i 2,5 ml 20 mmol/l rastvora FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O). Apsorbancija je izmjerena na 593 nm, nakon stajanja smješe od 30 min na temperaturi od 37 °C. Slijepa proba je smješa istih sastojaka sa 100 µl etanola umjesto etanolnog rastvora analiziranog uzorka.

Serijski standardnih rastvora gvožđa (u koncentracionom opsegu od 100 - 1000 µmol/l) korišćena za konstrukciju kalibracione krive je napravljena od FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O u FRAP reagensu. Rezultati su izraženi kao mikromolovi Fe<sup>2+</sup> jona po gramu biljne sirovine (µmol Fe<sup>2+</sup>/g) (Benzie i Strain, 1999).

## 3.4 STATISTIČKA ANALIZA

Prilikom određivanja makroelemenata i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima drenjine, parametri deskriptivne statistike (srednja vrijednost i devijacija) su dobijeni NCSS statističkim softverom ([www.ncss.com](http://www.ncss.com)). Statistička analiza hemijskog profila i antioksidativne aktivnosti u uzorcima drenjine je izvršena pomoću programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

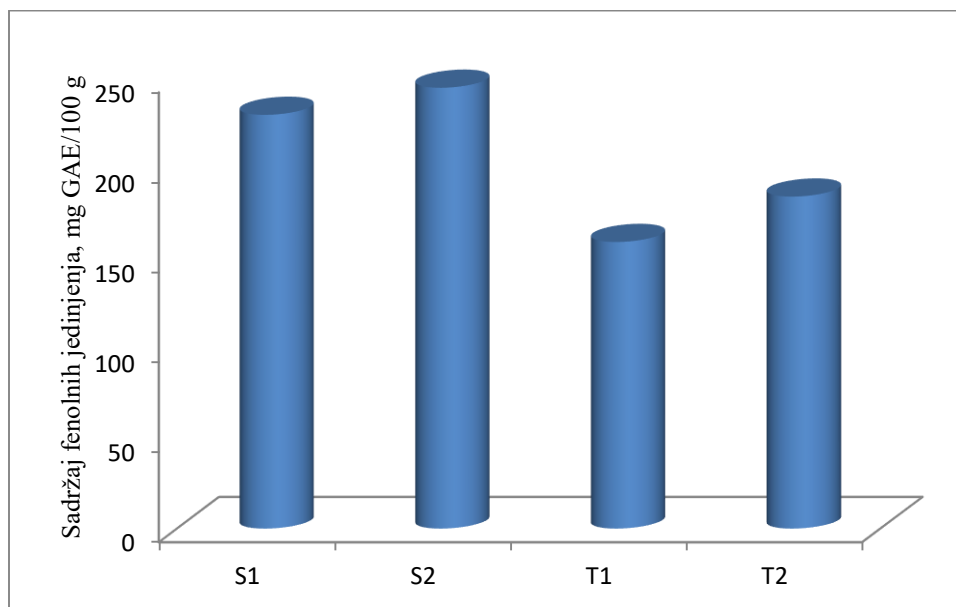
## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U SOKU I TROPU DRENJINE

Zbog blagotvornog dejstva biljaka na ljudsko zdravlje, brojna naučna istraživanja su usmjerena na identifikaciju biološki aktivnih jedinjenja, kao i njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu (Kumar i sar., 2020, Zhao i sar., 2015, Putnik i sar., 2018). S obzirom da ova jedinjenja predstavljaju dio fizioloških funkcija biljaka, odnosno da nastaju kao rezultat sekundarnog metabolizma, njihovo unošenje u ljudski organizam je mnogo korisnije u odnosu na unošenje ovih jedinjenja sintetičkog porijekla. Istraživanja su posebno usmjerena na fenolna jedinjenja, supstance koje predstavljaju najzastupljenije sekundarne metabolite u biljci i koja imaju antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost (Kumar i sar., 2020, Al Mamari, 2021).

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja koji je dobijen proučavajući sok i trop drenjine iz Danilovgrada i Šavnika, predstavljen je na slici 20.

Kalibraciona kriva korišćena u ovom radu prilikom određivanja sadržaja ukupnih fenola predstavljena je na slici 21.

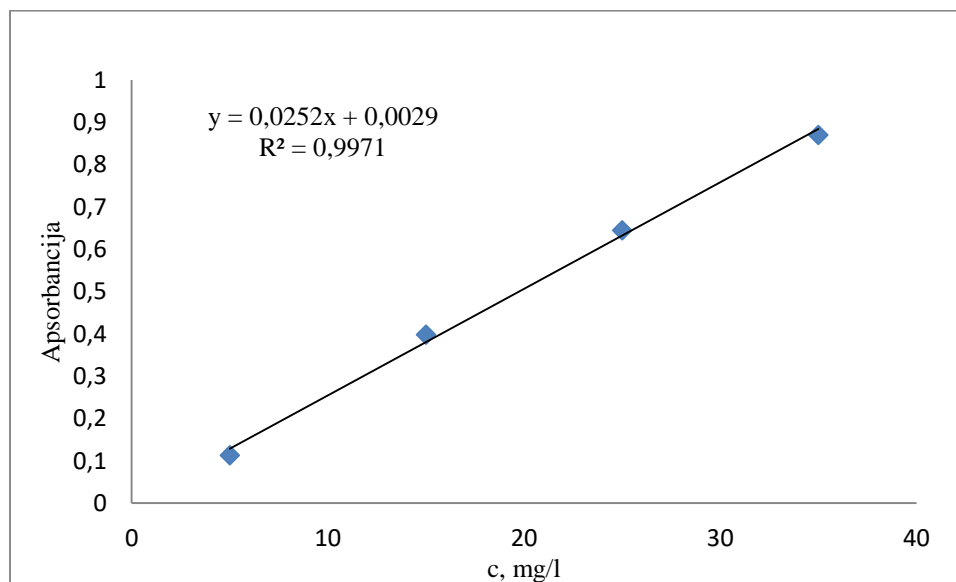


Slika 20. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima soka i tropa drenjine

Dobijeni sadržaj ukupnih fenola u soku drenjine bio je 229,94 mg GAE/100 g u S<sub>1</sub> i 244,93 mg GAE/100 g u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke iznosio 159,57 mg GAE/100 g u T<sub>1</sub> i 184,7 mg GAE/100 g u T<sub>2</sub>. Poređenjem rezultata ukupnih fenola dobijenih analizom ispitivanih uzoraka sa nekoliko ranije objavljenih studija uočena je sličnost. Naime, De Biaggi i saradnici (2018) su proučavajući italijansku drenjinu zabilježili prosječan sadržaj ukupnih fenola od 196,68 mg GAE/100 g, dok je Cosmulescu sa saradnicima (2019) u rumunskoj drenjini našao sadržaj fenola u opsegu od 163,69 mg GAE/100 g do 359,28 mg GAE/100 g. Perova sa saradnicima (2014) u ruskoj drenjini bilježi nešto veći sadržaj fenolnih jedinjenja (od 150 mg GAE/100 g do 400 mg/100 g), dok je Popović sa saradnicima (2012) u drenjini sa područja Srbije zabilježio sadržaj fenola u opsegu od 494 mg GAE/100 g do 704 mg GAE/100 g.

Uočeno je da sok (S<sub>1</sub>) i trop (T<sub>1</sub>) drenjine iz Šavnika imaju manji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na sok (S<sub>2</sub>) i trop (T<sub>2</sub>) drenjine iz Danilovgrada. Ovo se može objasniti činjenicom da postoji veliki uticaj karakteristika staništa na kvantitativni sadržaj fenolnih jedinjenja u biljci (Kumar i sar., 2017, Moreira i sar., 2020): Šavnik karakteriše dominantno planinska klima i veća nadmorska visina, dok je u Danilovgradu prisutna mediteranska klima.

Veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zabilježen je u soku (S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub>) nego u tropu (T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>) drenjine, bez obzira na ispitivano područje (Slika 20).



Slika 21. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola

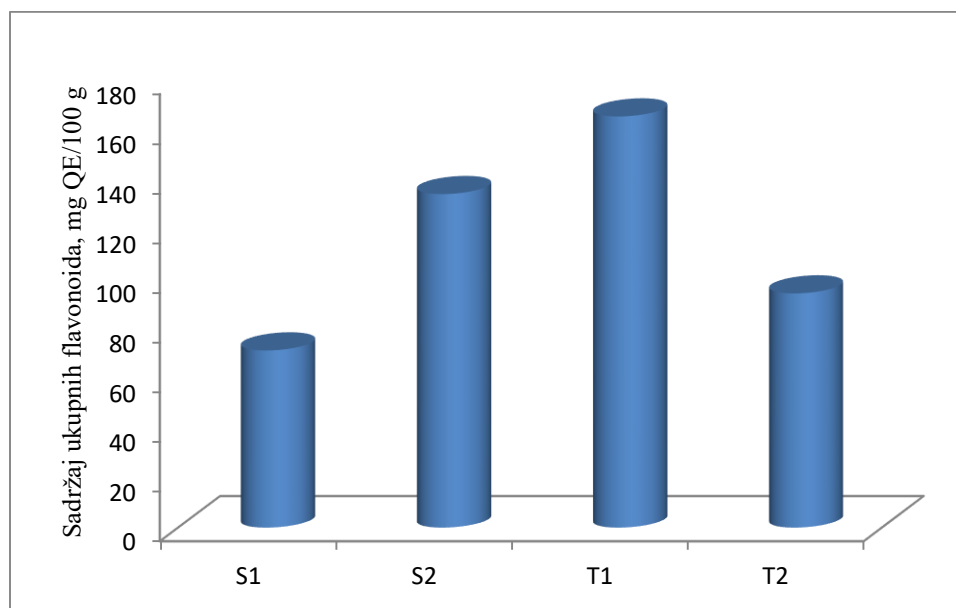


## 4.2 SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U SOKU I TROPU DRENJINE

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih jedinjenja u biljkama. Zajednička karakteristika svih flavonoida je flavanska struktura sastavljena od 15 C-atoma ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Slika 8): dva benzenova prstena A i B povezana s piranskim prstenom C (Kumar i Pandey, 2013). Od mnogobrojnih bioloških aktivnosti flavonoida, u brojnim istraživanjima najviše je ispitivana antioksidativna aktivnost i njeno pozitivno djelovanje na zdravlje, jer su se ova jedinjenja pokazala djelotvornim u prevenciji raznih bolesti, ali i kao terapeutici mnogih oboljenja (Panche i sar., 2016, Jucá i sar., 2020). Kao i kod ostalih fenolnih jedinjenja, visoka antioksidativna aktivnost flavonoida zavisi od njihove strukture i prisustva supstituenata (Rice-Evans i sar., 1996).

Sadržaj ukupnih flavonoida dobijen ispitivanjem drenjine iz Danilovgrada i Šavnika, predstavljen je na slici 22.

Kalibraciona kriva korišćena u ovom radu prilikom određivanja sadržaja ukupnih flavonoida predstavljena je na slici 23.

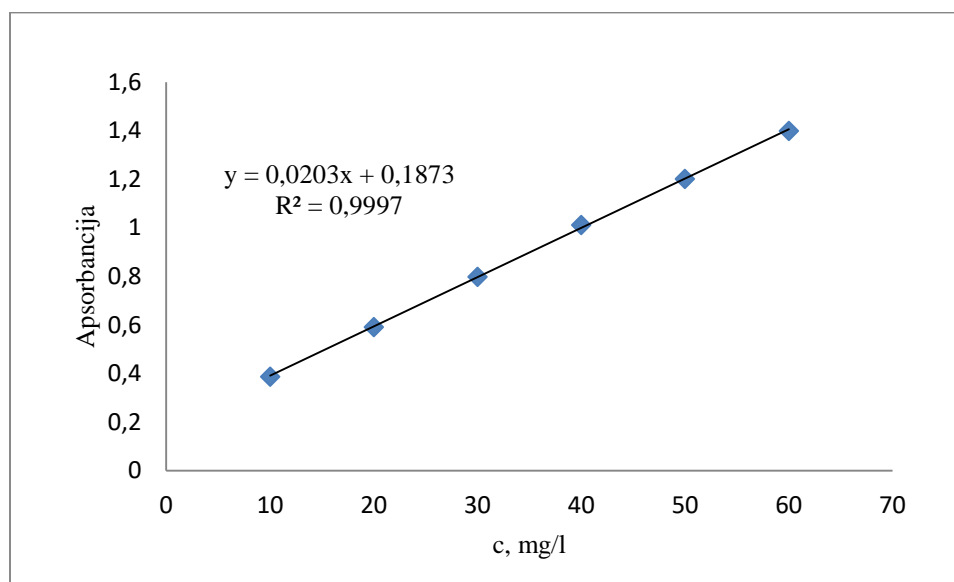


Slika 22. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima soka i tropa drenjine

Dobijeni sadržaj ukupnih flavonoida u soku drenjine bio je 71,71 mg QE/100 g u S<sub>1</sub> i 134,45 mg QE/100 g u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke iznosio 165,58 mg QE/100 g u T<sub>1</sub> i 94,62 mg QE/100 g u T<sub>2</sub>. Poređenjem dobijenih rezultata sa nekoliko ranije objavljenih studija

uočena je sličnost. Naime, u rumunskoj drenjini je zabilježen sadržaj flavonoida u opsegu od 12,14 mg QE /100 g do 64,48 mg QE /100 g (Cosmulescu i sar., 2019), dok je Karaaslan sa saradnicima (2018) zabilježio nešto veći sadržaj flavonoida u turskoj drenjini (255,75 mg QE /100 g).

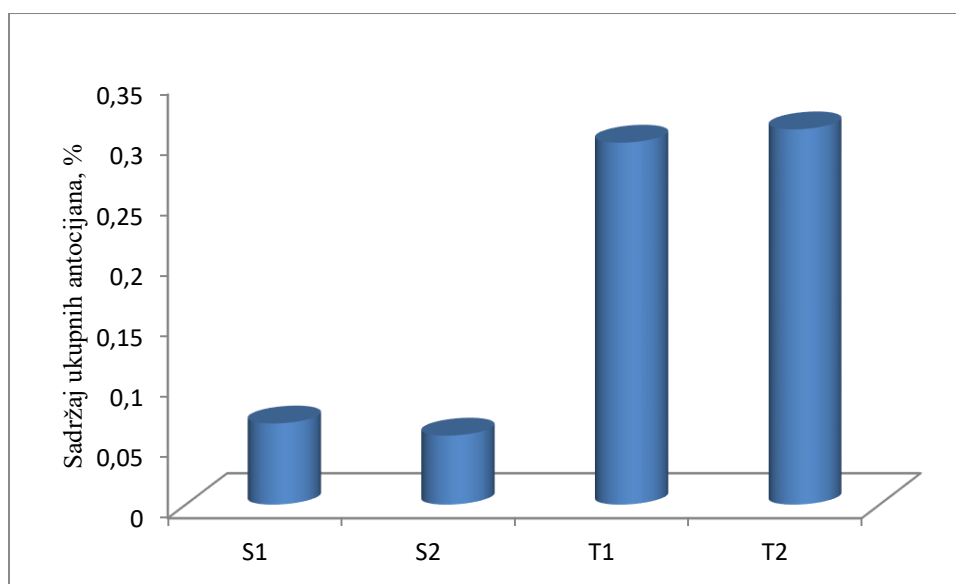
Posmatrajući dobijene rezultate uočeno je da sok drenjine na višoj nadmorskoj visini ( $S_1$ ) ima manji sadržaj flavonoida, nego sok drenjine na nižoj nadmorskoj visini ( $S_2$ ). S druge strane, sadržaj flavonoida je veći u tropu drenjine sa područja Šavnika ( $T_1$ ) nego iz oblasti Danilovgrada ( $T_2$ ). Ovakva raspodijela flavonoida može se, osim uticaju karakteristika predjela (svjetlosti, temperature, prisustva hranljivih materija u zemljištu i nadmorskoj visini), pripisati i zrelosti biljke s obzirom da je poznato da zrelost ima veliki uticaj na sadržaj fenolnih jedinjenja (Kumar i sar., 2017, Gunduz i Özgen, 2013). Naime, u ovom istraživanju drenjina iz centralnog dijela (Danilovgrada) je analizirana u periodu potpune zrelosti za razliku od drenjine sa sjevera (Šavnik Crne Gore).



Slika 23. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

### 4.3 SADRŽAJ UKUPNIH ANTOCIJANA U SOKU I TROPU DREJINE

Antocijani su jedinjenja iz grupe flavonoida koja uzrokuju crvenu, plavu i ljubičastu boju mnogih biljaka (Castañeda-Ovando i sar., 2009). Zainteresovanost za ispitivanjem ovih jedinjenja je intenzivirana poslednjih godina, zahvaljujući njihovoj sposobnosti da neutrališu slobodne radikale doniranjem vodonika iz fenolnih grupa. Na ovaj način antocijani mogu da učestvuju u prevenciji brojnih hroničnih bolesti prouzrokovanih oksidativnim stresom (Nassour i sar., 2020, Enaru i sar., 2021).



Slika 24. Sadržaj ukupnih antocijana u uzorcima soka i tropa drenjine

Procentni sadržaj ukupnih antocijana dobijen u ovom istraživanju predstavljen je na slici 24 i u soku drenjine bio je 0,067 % u S<sub>1</sub> i 0,057 % u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke iznosio 0,299 % u T<sub>1</sub> i 0,310 % u T<sub>2</sub>. Poređenjem dobijenih rezultata sa nekoliko ranije objavljenih studija uočena je sličnost. Proučavajući drenjinu sa područja Azerbejdžana Novruzov je sa saradnicima (2019) zabilježio procenat antocijana u opsegu od 0,053 % do 0,434 %, dok je De Biaggi sa saradnicima (2018) proučavajući italijansku drenjinu zabilježio prosječan sadržaj od 0,134 %. Bijelić sa saradnicima (2011) je u drenjini sa područja Srbije zabilježila procentni sadržaj antocijana u opsegu od 0,036 % do 0,116 %.

Posmatrajući rezultate prikazane na slici 24 uočava se da je procentni sadržaj ukupnih antocijana veći u tropu ( $T_1$  i  $T_2$ ) nego u soku ( $S_1$  i  $S_2$ ) drenjine, bez obzira na karakteristike ispitivanih lokaliteta (Danilovgrad i Šavnik).

Procenat antocijana u soku drenjine iz Šavnika ( $S_1$ ) je veći nego u soku drenjine iz Danilovgrada ( $S_2$ ), dok je suprotno sadržaj ovih fenolnih jedinjenja bio veći u tropu drenjine iz centralnog dijela ( $T_2$ ) u odnosu na sjeverni kraj ( $T_1$ ).

#### 4.3.1 Identifikacija antocijana HPLC metodom u soku i tropu drenjine

U istraživanju HPLC analizom u ispitivanim uzorcima drenjine identifikovana su četiri antocijana (Slika 25, Tabela 1). Potvrđeno je i prisustvo jednog neidentifikovanog derivata pelargonin-3-glukozida. Ovaj nalaz je od velike važnosti s obzirom da su brojne studije potvrdile značaj ishrane bogate antocijanima u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja (Sandoval-Ramirez i sar., 2021, Wallace, 2011).

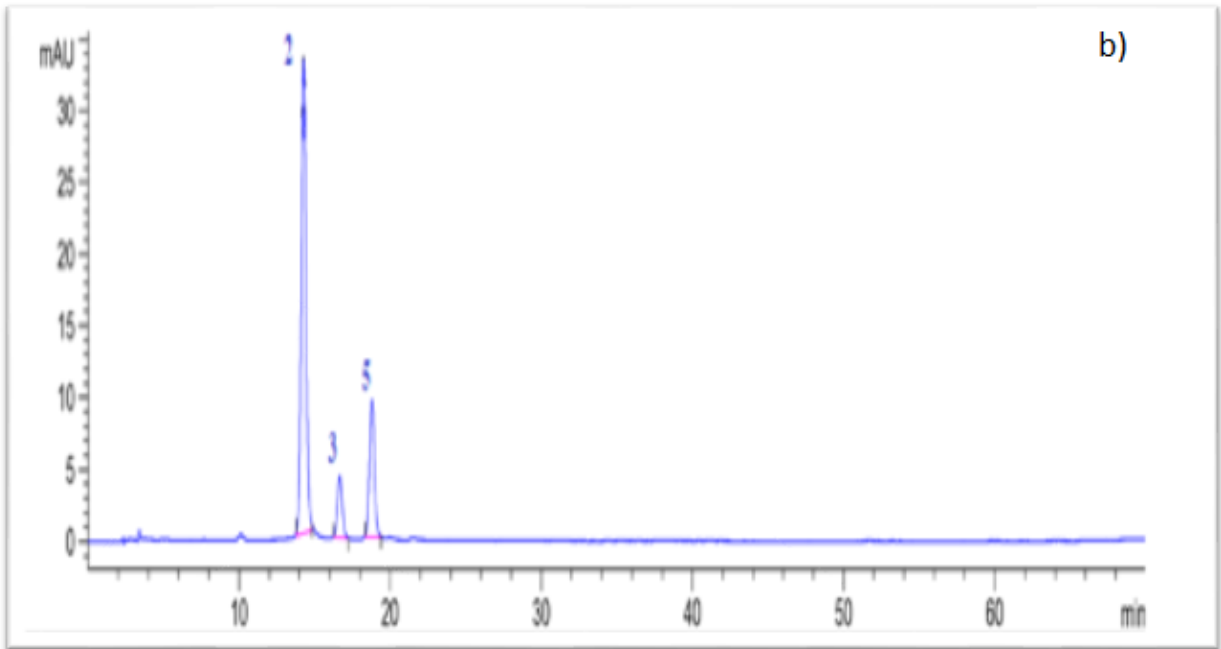
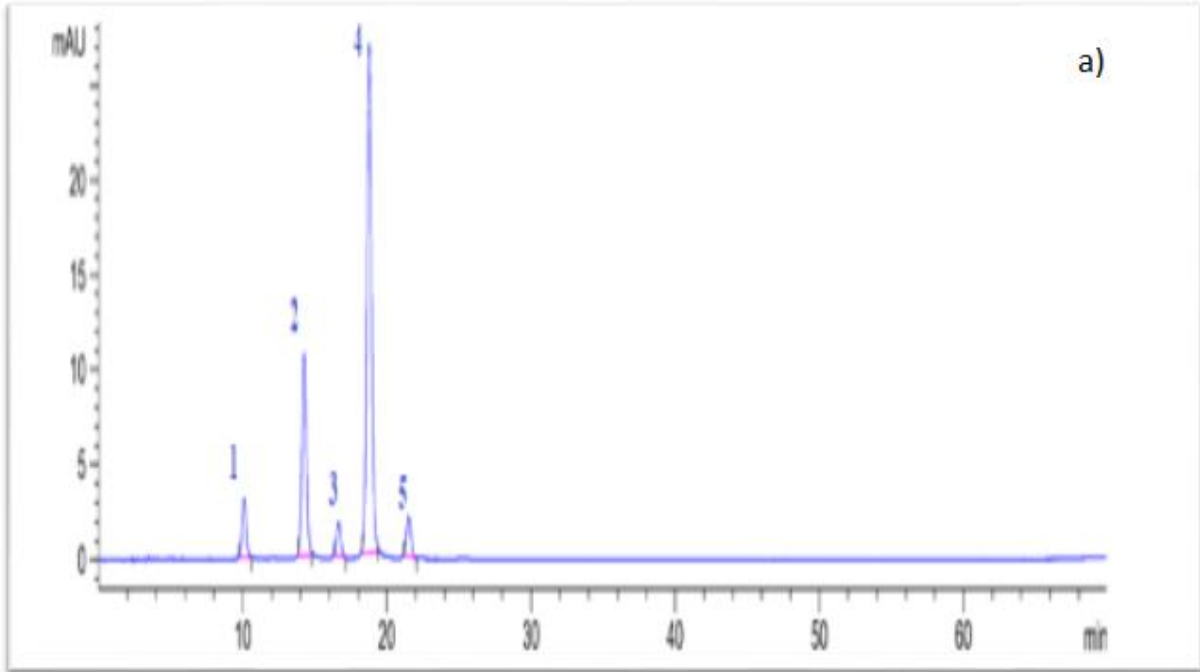
Tabela 1. Sadržaj antocijana identifikovanih HPLC metodom u ispitivanim uzorcima drenjine [mg/g]

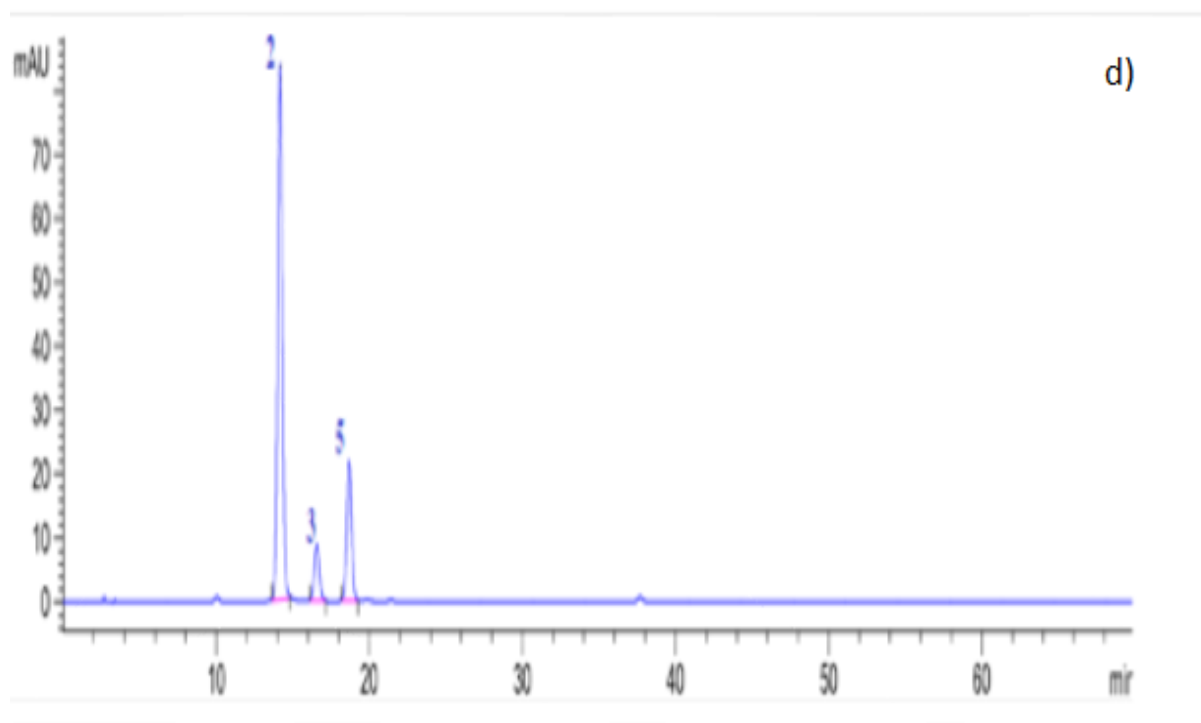
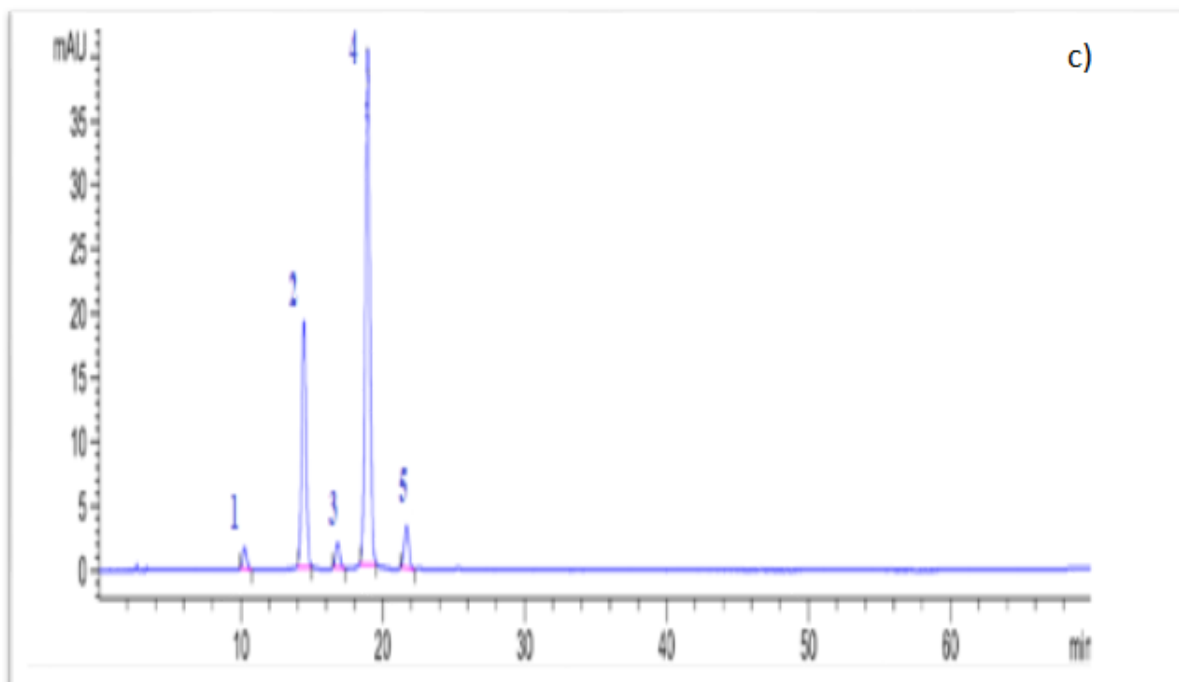
<b>Antocijani</b>		<b>S<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>S<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>
<b>Delfinidin-3-glukozid</b>	1	0,0161	0,0786	-	-
<b>Cijanidin-3-galaktozid</b>	2	0,5008	0,9894	0,1746	4,3705
<b>Cijanidin-3-glukozid</b>	3	0,0069	0,0820	0,0181	0,4870
<b>Derivat pelargonin-3-glukozida</b>	4	0,9420	1,3944	-	-
<b>Pelargonin-3-glukozid</b>	5	0,0070	0,1153	0,0334	0,7462

Rezultati dobijeni HPLC analizom pokazali su da u uzorcima drenjine, sa oba lokaliteta, sadržaj identifikovanih antocijana je veći u tropu ( $T_1$  i  $T_2$ ) nego u soku ( $S_1$  i  $S_2$ ) ove biljke.

Najzastupljeniji antocijan u uzorcima  $S_1$  i  $T_1$  bio je neidentifikovani derivat pelargonin-3-glukozida (0,9420 mg/g i 1,3944 mg/g, respektivno) praćen cijanidin-3-galaktozidom (0,5008 mg/g i 0,9894 mg/g, respektivno), dok je u  $S_2$  i  $T_2$  bio cijanidin-3-galaktozid (0,1746 mg/g i 4,3705 mg/g, respektivno), praćen pelargonin-3-glukozidom (0,0334 mg/g i 0,7462 mg/g, respektivno). Koncentracija cijanidin-3-glukozida u uzorcima  $S_2$  i  $T_2$  iznosila je 0,0181 mg/g odnosno 0,4870 mg/g, dok delphinidin-3-glukozid kao ni derivat pelargonin-3-glukozida u ovim uzorcima nisu identifikovani. Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima koje je objavila Milenković Anđelković sa saradnicima (2015) ispitujući drenjinu iz Srbije uočena je sličnost: koncentracija cijanidin-3-galaktozidabila bila je 1006,78 mg/kg, dok je koncentracija pelargonidin-3-glukozida bila 327,29 mg/kg.

Treći po zastupljenosti antocijan u uzorku  $S_1$  bio je delphinidin-3-glukozid (0,0161 mg/g) praćen pelargonin-3-glukozidom (0,0070 mg/g), i na kraju cijanidin-3-glukozid (0,0069 mg/g). Suprotno, treći po zastupljenosti antocijan u uzorku  $T_1$  bio je pelargonin-3-glukozid (0,1153 mg/g) praćen cijanidin-3-glukozidom (0,0820 mg/g) i delphinidin-3-glukozidom (0,0786 mg/g). Sličnu koncentraciju delphinidin-3-glukozida (49,13 mg/kg) u plodu drenjine zabilježila je Milenković Anđelković sa saradnicima (2015). Međutim, za razliku od ispitivanih drenjina sa područja Crne Gore ovi autori u drenjini nisu identifikovali cijanidin-3-glukozid.



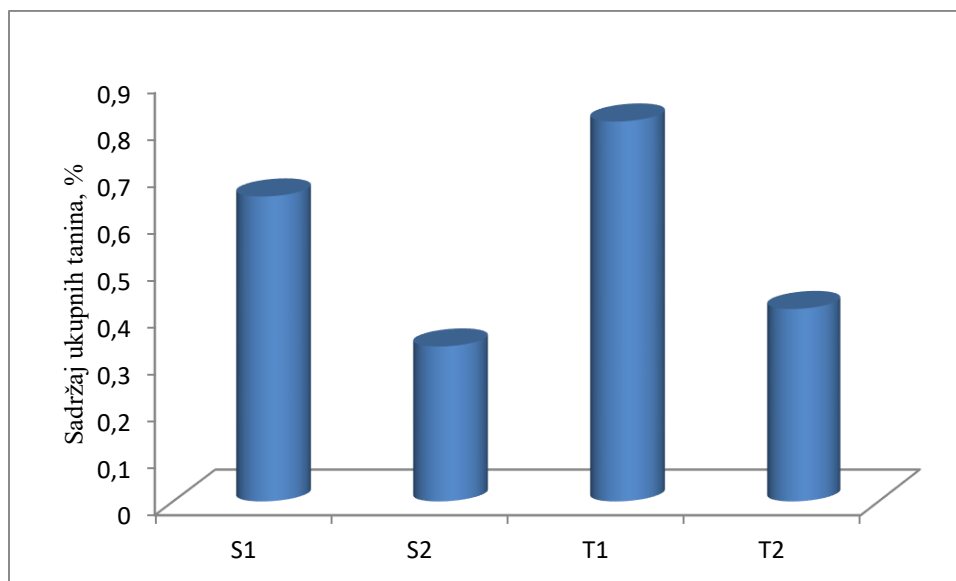


Slika 25. HPLC hromatogrami antocijana identifikovanih na 520 nm u ispitivanim uzorcima:  
 a) S<sub>1</sub>, b) S<sub>2</sub>, c) T<sub>1</sub> i d) T<sub>2</sub>.

Rezultati dobijeni HPLC analizom su pokazali da sok ( $S_1$ ) i trop ( $T_1$ ) iz Šavnika imaju manji sadržaj cijanidin-3-glukozida i pelargonin-3-glukozida u odnosu na sok ( $S_2$ ) i trop ( $T_2$ ) iz Danilovgrada. Uzorak tropa  $T_1$ , takođe, sadrži i manju koncentraciju cijanidin-3-galaktozida u odnosu na uzorak tropa  $T_2$ , dok suprotno uzorak soka  $S_1$  bilježi veći sadržaj ovog jedinjenja u odnosu na uzorak soka  $S_2$ . Ovo se može objasniti činjenicom da se različita fenolna jedinjenja mogu naći u različitim djelovima biljke kao i da se u različitim djelovima biljke nalaze različite koncentracije istih. Takođe, u različitim stadijumima zrelosti biljke različita fenolna jedinjenja mogu biti prisutna. Dodatno i uslovi rasta kao što su temperatura i nadmorska visina značajno utiču na kvalitativni i kvantitativni sastav sekundarnih metabolita biljke (Kumar i sar., 2017).

#### 4.4 SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U SOKU I TROPU DRENJINE

Tanini su složena polifenolna jedinjenja. Iako se ranije smatralo da imaju slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na flavonoide, novija istraživanja su potvrdila da antioksidativna aktivnost ovih jedinjenja zavisi od stepena njihove polimerizacije, i da imaju petnaest do trideset puta intenzivniji antioksidativni potencijal nego prosti fenoli (Stanisavljević, 2015).



Slika 26. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima soka i tropa drenjine



Procentni sadržaj ukupnih tanina koji je dobijen u ovom istraživanju predstavljen je na slici 26 i u soku drenjine iznosio je 0,65 % u S<sub>1</sub> i 0,33 % u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke iznosio 0,81 % u T<sub>1</sub> i 0,41 % u T<sub>2</sub>. Poređenjem dobijenih rezultata sa nekoliko ranije objavljenih studija uočena je sličnost. Bijelić i saradnici (2011) su u drenjini sa područja Srbije zabilježili procentni sadržaj tanina u opsegu od 0,73 % do 1,21 %. Procenat tanina u turskoj drenjini je varirao od 0,19 % do 0,45 % zavisno od stepena zrelosti ploda ove biljke (Gunduz i Özgen, 2013).

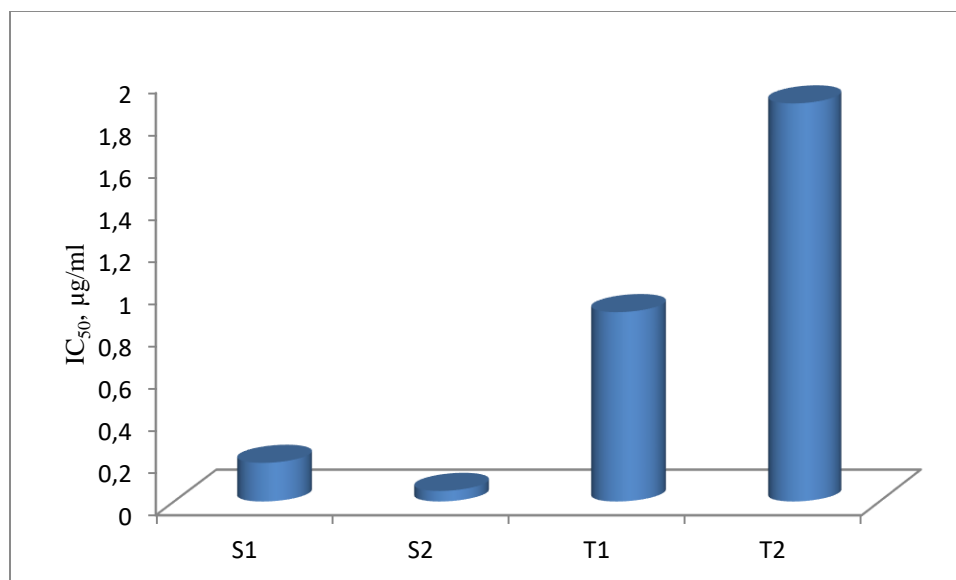
Iz rezultata dobijenih analizom drenjina sa područja Crne Gore može se uočiti da je procentni sadržaj tanina bio veći u tropu (T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>) nego u soku drenjine (S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub>), bez obzira na karakteristike ispitivanih lokaliteta.

Dalje, veći sadržaj ovih jedinjenja zabilježen je u uzorcima soka (S<sub>1</sub>) i tropa drenjine (T<sub>1</sub>) iz Šavnika nego u istim odgovarajućim uzorcima ove biljke iz Danilovgrada (S<sub>2</sub> i T<sub>2</sub>). Ovakva raspodijela ukupnih tanina može biti uzrokovana činjenicom da se njihova količina smanjuje sazrijevanjem plodova biljke (Gunduz i Özgen, 2013). Naime, u ovom istraživanju plod drenjine sa sjevera Crne Gore vjerovatno je ubran prije potpune zrelosti, za razliku od ploda iz centralnog dijela, koji usled mediteranske klime sazrijeva ranije.

#### **4.5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SOKA I TROPA DRENJINE**

Antioksidansi neutrališu slobodne radikale i na taj način štite organizam od različitih bolesti. Endogeni antioksidansi nastaju u ljudskom organizmu dok se egzogeni unose preko hrane ili lijekova (Flieger i sar., 2021, Ahmad i sar., 2014). S obzirom da sintetička antioksidativna jedinjenja mogu pokazati toksična dejstva, sve veća je potražnja za onim biljnog porijekla koji bi bili zamjena za potencijalno toksične sintetičke (Kumar i sar., 2020). Na osnovu ranijih istraživanja zaključeno je da fenolna jedinjenja najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti biljke (Deuschla i sar., 2019).

U ovom istraživanju, antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka drenjine mjerena je DPPH i FRAP metodama (Slika 27 i 28). To je od velike važnosti, s obzirom da antioksidansi mogu dati različite odgovore kada se tretiraju različitim testovima te se stoga i preporučuje kombinacija više testova koji se zasnivaju na različitim mehanizmima djelovanja (Schlesier i sar., 2002).



Slika 27. Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka drenjine dobijena primjenom DPPH metode

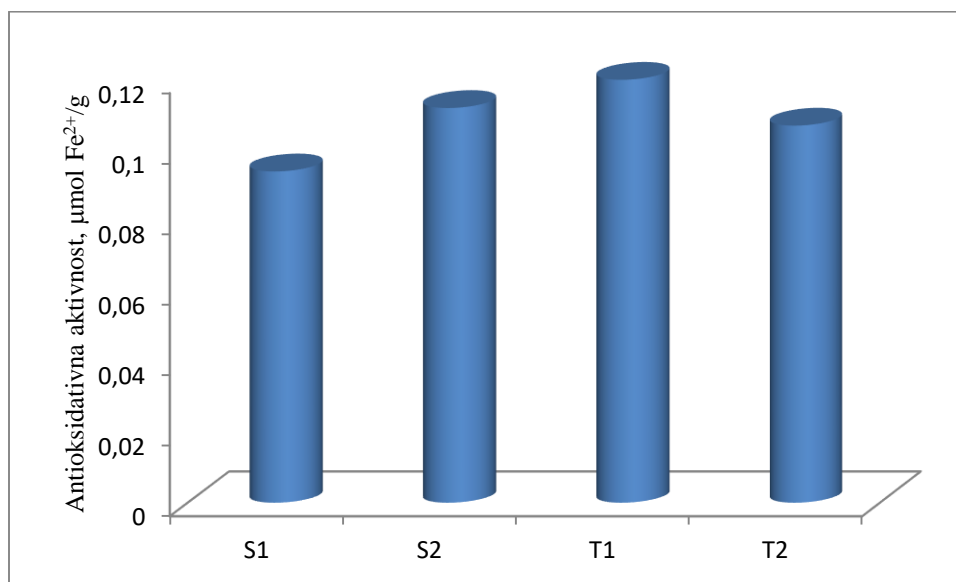
Princip DPPH metode se bazira na tome da antioksidansi, donirajući vodonik iz hidroksilne grupe, reaguju sa slobodnim radikalom i prevode ga u stabilan krajnji proizvod, dok se kod FRAP metode mjerenje antioksidativne aktivnosti jedinjenja zasniva na transferu elektrona (Munteanu i Apetrei, 2021). U ovom radu, rezultati FRAP testa su izraženi kao mikromolovi jona  $\text{Fe}^{2+}$  po gramu ispitivanog uzorka ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ), dok su rezultati DPPH testa predstavljeni onom količinom antioksidansa koja smanjuje koncentraciju radikala za 50 % (efikasna koncentracija- $\text{IC}_{50}$ ). Manje  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti pokazuju da je uzorak većeg antioksidativnog potencijala (Rivero-Cruz i sar., 2020).

Ispitivanjem drenjina sa područja Crne Gore dobijena  $\text{IC}_{50}$  vrijednost (Slika 27) u soku drenjine bila je 0,183  $\mu\text{g}/\text{ml}$  u  $\text{S}_1$  i 0,050  $\mu\text{g}/\text{ml}$  u  $\text{S}_2$ , dok je u tropu ove biljke iznosila 0,897  $\mu\text{g}/\text{ml}$  u  $\text{T}_1$  i 1,886  $\mu\text{g}/\text{ml}$  u  $\text{T}_2$ . Detaljnim pregledom literature nije pronađeno istraživanje čije rezultate je bilo moguće porediti sa rezultatima koji su dobijeni ispitivanjem drenjine sa područja Crne Gore. Naime, Cosmulescu sa saradnicima (2019) je proučavajući rumunsku drenjinu zabilježio antioksidativni kapacitet metanolnih ekstrakata drenjine od 1,24 mmol Trolox/100 g do 2,71 mmol Trolox/100 g, dok je u grčkoj drenjini Tiptiri-Kourpeti sa saradnicima (2019) pronašao  $\text{IC}_{50}$  od 0,067 %. Behrangi i saradnici (2015) su ispitivali različite ekstrakte drenjine i u zavisnosti od

primjenjenog postupka ekstrakcije dobijene vrijednosti  $IC_{50}$  iznosile su od 3,95 mg/ml do 9,67 mg/ml.

Takođe, rezultati ispitivanja drenjina sa područja Crne Gore (Slika 27) su pokazali da bez obzira na ispitivani lokalitet veću antioksidativnu aktivnost mjerenu DPPH testom imaju uzorci soka drenjine ( $S_1$  i  $S_2$ ), nego tropa ove biljke ( $T_1$  i  $T_2$ ).

Dalje, veću antioksidativnu aktivnost pokazuje sok drenjine iz Danilovgrada ( $S_2$ ) nego iz Šavnika ( $S_1$ ). Suprotno, trop  $T_1$  posjeduje veći antioksidativni potencijal u odnosu na trop  $T_2$ .



Slika 28. Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka drenjine dobijena primjenom FRAP metode

Veću antioksidativnu aktivnost mjerenu FRAP testom (Slika 28) pokazuje sok drenjine iz Danilovgrada ( $0,112 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  u  $S_2$ ) nego iz Šavnika ( $0,094 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  u  $S_1$ ). Suprotno, trop  $T_1$  ( $0,120 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  u  $T_1$ ) posjeduje veći antioksidativni potencijal u odnosu na trop  $T_2$  ( $0,107 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  u  $T_2$ ). Nešto veći sadržaj od rezultata koji su dobijeni ispitivanjem drenjine iz Crne Gore, De Biaggi sa saradnicima (2018) bilježi u italijanskoj drenjini ( $20,41 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{kg}$ ).

Poređenjem rezultata dobijenih primjenom DPPH i FRAP metoda u ovom istraživanju uočene su izvjesne razlike. Naime, najveći antioksidativni potencijal dobijen primjenom DPPH metode imao je sok drenjine iz centralne oblasti ( $S_2$ ), dok je primjenom FRAP metode najbolji antioksidativni odgovor dao trop drenjine iz sjevernog dijela ( $T_1$ ) Crne Gore. Dobijeni rezultati još jednom su

potvrdili da samo jedan test procjene antioksidativne aktivnosti nije dovoljan za dobijanje validnih rezultata (Schlesier i sar., 2002).

Važno je naglasiti, da biljka osim fenolnih jedinjenja sadrži i druge nefenolne aktivne komponente, te se stoga moraju uzeti u obzir i moguće sinergističke i antagonističke reakcije koje ova jedinjenja međusobno ostvaruju i na taj način utiču na antioksidativni potencijal (Hajimehdipoor i sar., 2014, Chew i sar., 2011, Lianda, 2012).

## **4.6 MAKROELEMENTI I MIKROELEMENTI U ISPITIVANIM UZORCIMA**

### **DRENJINE**

Pored sekundarnih metabolita biljke sadrže i određenu količinu esencijalnih metala koji su neophodni za optimalno funkcionisanje ljudskog organizma, s obzirom da je poznato da kao kofaktori stimuliraju aktivnost enzima koji učestvuju u brojnim metaboličkim procesima (Dahl i Turner, 2022, Lakatos i sar., 2004). Međutim, zbog mogućeg prisustva toksičnih elemenata produžen unos može biti uzrok raznih zdravstvenih problema, te je stoga od velike važnosti kontrola njihovog sadržaja u biljci u cilju procjene toksikološkog rizika po zdravlje korisnika (Bathla i Jain, 2016).

Osim u soku i tropu drenjine iz sjevernog (Šavnik) i centralnog dijela (Danilovgrad) Crne Gore, u ovom istraživanju sadržaj makroelemenata i mikroelemenata određen je i u cjelokupnom plodu biljke iz navedenih oblasti ( $D_1$  i  $D_2$ , respektivno). Sadržaj mikroelemenata (Mn, Zn, Fe, Cu, Pb, Cd i Ni) određen je primjenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS), dok je sadržaj makroelemenata (Ca, Mg, K i Na) i mikroelemenata (Pb, Ni, Cd) određen pomoću optički emisione spektroskopije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). U tabeli 2 prikazan je dobijeni sadržaj mikroelemenata u soku ( $S_1$  i  $S_2$ ), tropu ( $T_1$  i  $T_2$ ) i cjelokupnom plodu drenjine ( $D_1$  i  $D_2$ ) dobijen AAS metodom, dok je u tabeli 3 prikazan sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u istim uzorcima dobijen ICP-OES metodom. U oba slučaja rezultati su izraženi u mg/kg. Kalibracione krive korišćene u ovom radu za određivanje makroelemenata i mikroelemenata prikazane su na slici 29.

Najzastupljeniji esencijalni mikroelement u svim ispitivanim uzorcima drenjine iz Crne Gore dobijen primjenom AAS metode bilo je Fe (Tabela 2). Koncentracija Fe u soku drenjine iznosila je 23,44 mg/kg u  $S_1$  i 23,53 mg/kg u  $S_2$ , dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 33,6 mg/kg

u T<sub>1</sub> i 29,74 mg/kg u T<sub>2</sub>. U uzorcima D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> zabilježena je koncentracija Fe 31,7 mg/kg i 37,69 mg/kg, respektivno. Ispitujući plod drenjine metodom AAS, sa različitih područja u Srbiji, (Randelović i sar., 2014) zabilježen je znatno veći sadržaj Fe (od 123,8 mg/kg do 221,7 mg/kg), dok je Bijelić sa saradnicima (2011) u plodu ove biljke pronašla nešto niži sadržaj (od 3,10 mg/kg do 9,06 mg/kg) u odnosu na sadržaj u uzorcima drenjine iz Crne Gore. Karaaslan sa saradnicima (2018) je u plodu turske drenjine zabilježio sadržaj Fe od 2,78 mg/kg.

Drugi po zastupljenosti esencijalni mikroelement u svim ispitivanim uzorcima drenjine iz Crne Gore bio je Zn (Tabela 2). Njegova koncentracija u soku drenjine iznosila je 5,33 mg/kg u S<sub>1</sub> i 6,25 mg/kg u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 3,32 mg/kg u T<sub>1</sub> i 3,88 mg/kg u T<sub>2</sub>. Koncentracija Zn u D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> uzorcima bila je 4,89 mg/kg i 3,14 mg/kg, respektivno. Ispitujući plod drenjine Randelović i saradnici (2014) su zabilježili sadržaj Zn u opsegu od 2,02 mg/kg do 16,54 mg/kg, dok je Bijelić sa saradnicima (2011) pronašla sadržaj cinka u opsegu od 0,86 mg/kg do 2,12 mg/kg. Karaaslan sa saradnicima (2018) je u plodu turske drenjine zabilježio koncentraciju Zn od 1,34 mg/kg.

Koncentracija Cu u soku drenjine iznosila je 1,59 mg/kg u S<sub>1</sub> i 1,57 mg/kg u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 1,80 mg/kg u T<sub>1</sub> i 1,50 mg/kg u T<sub>2</sub> (Tabela 2). Koncentracija Cu u D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> uzorcima bila je slična (1,77 mg/kg i 1,65 mg/kg, respektivno). Bijelić i saradnici (2011) u plodu drenjine bilježe opseg koncentracija Cu sličan rezultatima ispitivanih uzoraka iz Crne Gore (od 0,52 mg/kg do 1,47 mg/kg), dok Randelović i saradnici (2014) bilježe nešto veći opseg vrijednosti (od 2,57 mg/kg do 10,38 mg/kg).

Koncentracija Mn u soku drenjine iznosila je 0,78 mg/kg u S<sub>1</sub> i 0,60 mg/kg u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 0,78 mg/kg u T<sub>1</sub> i 0,69 mg/kg u T<sub>2</sub> (Tabela 2). Vrijednosti koncentracija Mn u D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> uzorcima bile su 0,78 mg/kg i 0,58 mg/kg, respektivno. Bijelić sa saradnicima (2011) u plodu drenjine bilježi opseg vrijednosti Mn sličan vrijednostima u uzorcima iz Crne Gore (od 0,24 mg/kg do 1,59 mg/kg), dok je Randelović sa saradnicima (2014) zabilježio veći opseg vrijednosti (od 2,22 mg/kg do 7,99 mg/kg).

Primjenom AAS metode, u svim ispitivanim uzorcima drenjine (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>) koncentracije Pb, Cd i Ni su bile ispod granice detekcije instrumenta (Tabela 2). Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti, s obzirom da je potvrdio bezbjednu upotrebu ploda drenjine, bez toksikološkog rizika. Naime, poznato je da Cd i Pb imaju visok afinitet prema tiolnim grupama enzima te su stoga konkurentni esencijalnim elementima, pri čemu vezujući se za njih mogu poremetiti veliki broj

metaboličkih procesa i na taj način uzrokovati brojna oboljenja (Qin i sar., 2016, Trombini i sar., 2015, Saad i sar., 2016). Ranđelović (2014) sa saradnicima ispitujući plod drenjine sa različitih područja u Srbiji takođe nije detektovao Ni, Cd i Pb.

Tabela 2. Koncentracija mikroelemenata i toksičnih metala [mg/kg] u soku, tropu i plodu drenjine određena primjenom AAS tehnike

	<b>S<sub>1</sub></b>	<b>S<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>D<sub>1</sub></b>	<b>D<sub>2</sub></b>
<b>Zn</b>	5,33±0,48	6,25±0,31	3,32±0,24	3,88±0,18	4,89±0,24	3,14±0,40
<b>Cu</b>	1,59±0,30	1,57±0,31	1,80±0,53	1,50±0,39	1,77±0,22	1,65±0,30
<b>Mn</b>	0,78±0,08	0,60±0,15	0,78±0,23	0,69±0,23	0,78±0,08	0,58±0,05
<b>Fe</b>	23,44±2,08	23,53±1,60	33,6±7,10	29,74±0,37	31,7±3,71	37,69±16,97
<b>Ni</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Pb</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Cd</b>	-	-	-	-	-	-

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 2 uočeno je da sok i trop drenjine iz Šavnika (S<sub>1</sub> i T<sub>1</sub>) imaju veći sadržaj gotovo svih ispitivanih elemenata (Fe, Cu i Mn) nego sok i trop drenjine iz Danilovgrada (S<sub>2</sub> i T<sub>2</sub>). Izuzetak je Zn čiji je sadržaj veći u soku i tropu iz centralnog dijela (S<sub>2</sub> i T<sub>2</sub>) Crne Gore.

Analizirajući cjelokupan plod drenjine primjećeno je suprotno (Tabela 2), za Zn je zabilježena značajnija koncentracija u uzorku iz Šavnika (D<sub>1</sub>), kao i za Cu i Mn, dok je za Fe nađena veća koncentracija u uzorku drenjine D<sub>2</sub>.

Primjenom AAS metode sličan sadržaj ispitivanih elemenata nađen je u soku (S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub>) i tropu (T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>) drenjine, bez obzira na ispitivano područje (Tabela 2).

Tabela 3. Koncentracija makroelemenata i toksičnih metala [mg/kg] u soku, tropu i plodu drenjine određena primjenom ICP-OES tehnike

	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
<b>Ca</b>	475,7±4,39	361,5±0,21	442,5±11,4	641,8±27,8	398,05±8,76	366,3±6,66
<b>Mg</b>	130,6±0,77	97,22±0,24	146,5±2,91	113,3±3,39	140,6±1,66	95,41±0,90
<b>K</b>	2810,6±69	2427,8±49	3276,2±193	2749,7±50	3274,2±53	2397±6,06
<b>Na</b>	11,91±0,63	8,347±1,54	16,59±3,19	9,341±1,99	14,30±1,58	10,01±1,09
<b>Ni</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Pb</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Cd</b>	-	-	-	-	-	-

Primjenom ICP-OES metode dobijeno je da je najzastupljeniji esencijalni makroelement u svim ispitivanim uzorcima drenjine bio K (Tabela 3). Koncentracija K u soku drenjine iznosila je 2810,6 mg/kg u S<sub>1</sub> i 2427,8 mg/kg u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 3276,2 mg/kg u T<sub>1</sub> i 2749,7 mg/kg u T<sub>2</sub>. Koncentracija K u D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> uzorcima bila je 3274,2 mg/kg i 2397 mg/kg, respektivno. Dobijeni sadržaj K u ispitivanim uzorcima ploda drenjine je u skladu sa opsegom vrijednosti koji su zabilježili Bijelić i saradnici (2011) ispitujući plod drenjine sa nekoliko različitih lokaliteta u Srbiji (od 1585 mg/kg do 9171 mg/kg). Takođe, Karaaslan sa saradnicima (2018) je u turskoj drenjini zabilježio sličan sadržaj ovog makroelementa (2090,82 mg/kg).

Drugi po zastupljenosti esencijalni makroelement u svim ispitivanim uzorcima drenjine sa područja Crne Gore bio je Ca (Tabela 3). Koncentracija Ca u soku drenjine iznosila je 475,7 mg/kg u S<sub>1</sub> i 361,5 mg/kg u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 442,5 mg/kg u T<sub>1</sub> i 641,8 mg/kg u T<sub>2</sub>. Koncentracija Ca u D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> uzorcima bila je 398,05 mg/kg i 366,3 mg/kg, respektivno. Dobijeni sadržaj Ca u ispitivanim uzorcima ploda drenjine je u skladu sa opsegom vrijednosti koji je zabilježila Bijelić sa saradnicima (2011) ispitujući plod drenjine sa nekoliko različitih lokaliteta u Srbiji (od 24,47 mg/kg do 526 mg/kg). Takođe, Karaaslan i saradnici (2018) su u turskoj drenjini zabilježili sličan sadržaj ovog makroelementa (425,92 mg/kg).

Koncentracija Mg u soku drenjine sa područja Crne Gore iznosila je 130,6 mg/kg u S<sub>1</sub> i 97,22 mg/kg u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 146,5 mg/kg u T<sub>1</sub> i 113,3 mg/kg u T<sub>2</sub> (Tabela 3). Koncentracija Mg u D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> uzorcima bila je 140,6 mg/kg i 95,41 mg/kg, respektivno. Dobijeni sadržaj Mg u ispitivanim uzorcima ploda drenjine je u skladu sa opsegom vrijednosti koji

je zabilježila Bijelić sa saradnicima (2011) ispitujući plod drenjine sa nekoliko različitih lokaliteta u Srbiji (od 10,12 mg/kg do 160,90 mg/kg). Takođe, Karaaslan sa saradnicima (Karaaslan i sar., 2018) je u turskoj drenjini zabilježio sličan sadržaj Mg (104,23 mg/kg).

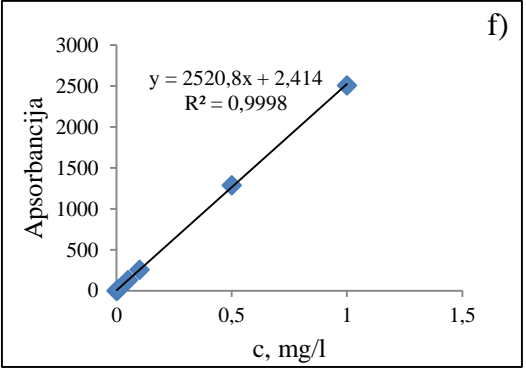
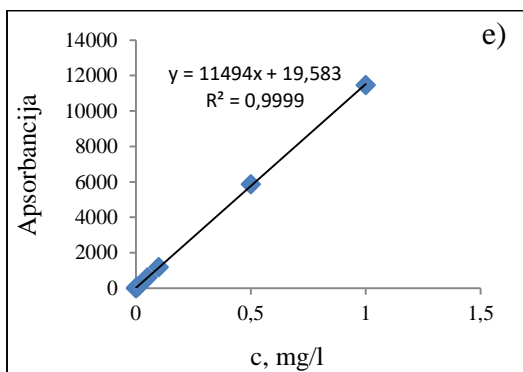
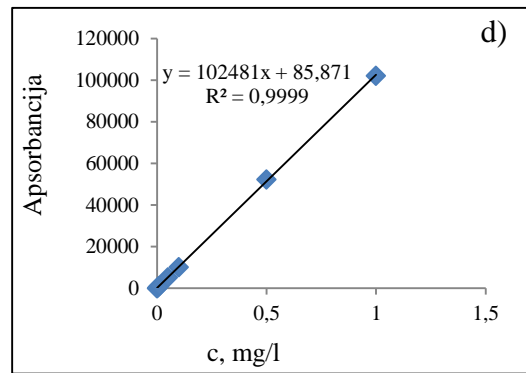
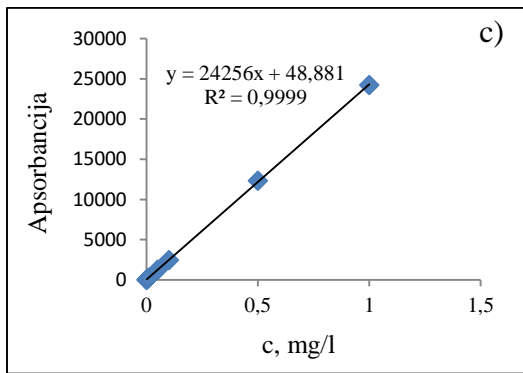
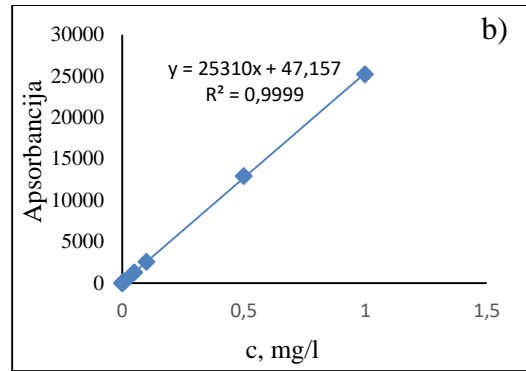
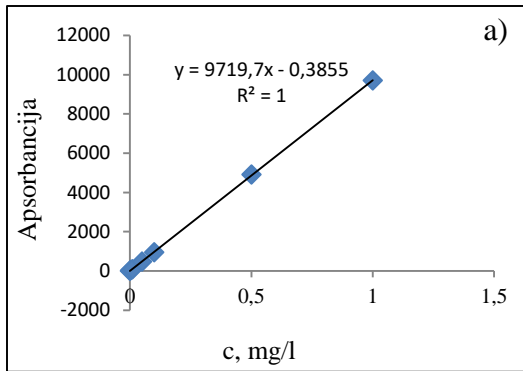
Koncentracija Na u soku ispitivane drenjine iznosila je 11,91 mg/kg u S<sub>1</sub> i 8,347 mg/kg u S<sub>2</sub>, dok je u tropu ove biljke njegov sadržaj iznosio 16,59 mg/kg u T<sub>1</sub> i 9,341 mg/kg u T<sub>2</sub> (Tabela 3). Koncentracija Na u D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub> uzorcima bila je 14,30 mg/kg i 10,01 mg/kg, respektivno). Dobijeni sadržaj Na u ispitivanim uzorcima ploda drenjine niži je od opsega vrijednosti koji je zabilježila Bijelić sa saradnicima (2011) (od 40,75 mg/kg do 315,04 mg/kg). U turskoj drenjini Karaaslan i saradnici (2018) bilježe znatno veći sadržaj ovog makroelementa (2090,82 mg/kg).

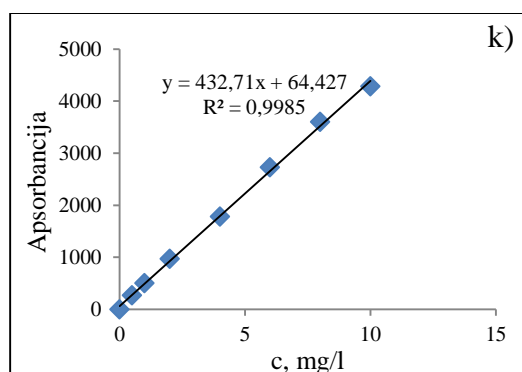
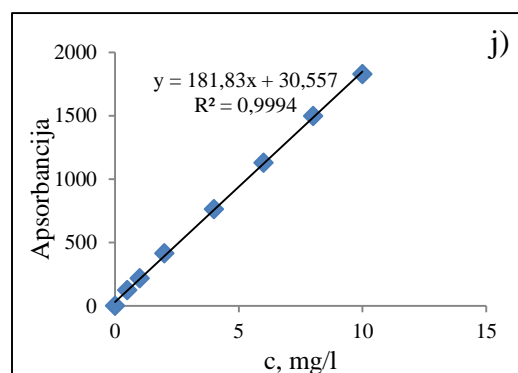
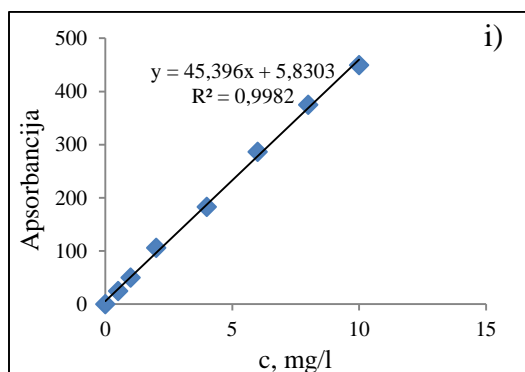
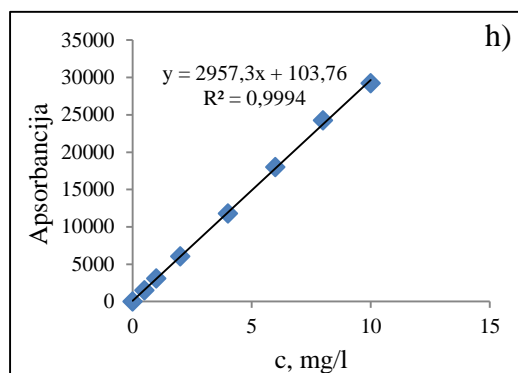
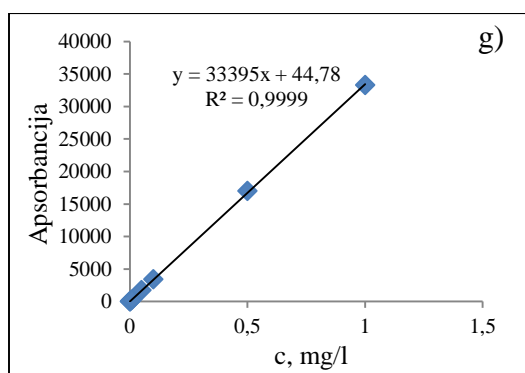
Primjenom ICP-OES metode, takođe u svim ispitivanim uzorcima drenjine (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>) koncentracije Pb, Cd i Ni su bile ispod granice detekcije instrumenta (Tabela 3). Ovaj nalaz je dodatno potvrdio bezbjednu upotrebu ploda drenjine, bez toksikološkog rizika.

Dalje, na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da sok i trop drenjine iz Šavnika (S<sub>1</sub> i T<sub>1</sub>) imaju veći sadržaj pojedinih makroelemenata (Mg, Na i K) nego sok i trop iz Danilovgrada (S<sub>2</sub> i T<sub>2</sub>). Za Ca uočena je nešto drugačija raspodjela. Naime, u soku drenjine iz sjeverne oblasti (S<sub>1</sub>) zabilježene su veće koncentracije ova tri makroelementa, dok trop iz istog mjesta (T<sub>1</sub>) ima manji sadržaj Ca u odnosu na odgovarajuće uzorke iz centralne oblasti (S<sub>2</sub> i T<sub>2</sub>).

Analizirajući cjelokupan plod drenjine (Tabela 3) na sadržaj Ca, Mg i Na zabilježena je veća koncentracija ovih elemenata u plodu D<sub>1</sub>, dok je za K zabilježena veća koncentracija u plodu D<sub>2</sub>. Primjenom ICP-OES metode veći sadržaj gotovo svih ispitivanih elemenata zabilježen je u tropu (T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>) u odnosu na sok (S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub>) drenjine, bez obzira na ispitivano područje (Tabela 3). Ovo se može objasniti činjenicom da sekundarni metaboliti biljke najvjerojatnije ostvaruju jače interakcije sa makroelementima u tropu u odnosu na sok biljke.







Slika 29. Kalibracione krive za određivanje makroelemenata i mikroelemenata: a) Fe, b) Zn, c) Cu, d) Mn, e) Ni, f) Pb, g) Cd, h) Ca, i) Mg, j) K i k) Na.

#### 4.6.1 Nutritivna vrijednost drenjine

Dobijeni procentualni dnevni unos esencijalnih makroelemenata i mikroelemenata, kao i toksičnih elemenata iz jedne porcije (300 g) ispitivanih drenjina predstavljen je u tabeli 4.

Tabela 4. Unos [%] a) esencijalnih makroelemenata i mikroelemenata i b) toksičnih elemenata, na dnevnom nivou iz jedne porcije ispitivanih plodova drenjine.

a)

Metoda	Element	RDA (mg/dan)	DMI (%)	
			D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
AAS	Fe	14	10,866	12,921
	Mn	2	1,872	1,392
	Zn	10	2,346	1,506
	Cu	1	8,496	7,920
ICP-OES	Ca	800	2,388	2,196
	Mg	375	1,797	1,221
	K	2000	7,857	5,751
	Na	575	0,117	0,081

b)

Metoda	Element	MDI (µg/dan)	DI (%)	
			D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
AAS	Ni	196	/	/
	Pb	250	/	/
	Cd	25	/	/
ICP-OES	Ni	196	/	/
	Pb	250	/	/
	Cd	25	/	/

S obzirom da preporučeni dnevni unos K prema direktivi Evropske unije, iznosi 2000 mg (European Economic Community-EEC, 2008), na osnovu dobijenih podataka (Tabela 4a) može se primjetiti da dnevni doprinos ovog esencijalnog makroelementa, iz jedne porcije ispitivanih

drenjina, iznosi 7,85 % iz D<sub>1</sub> i 5,75 % iz D<sub>2</sub>. Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti s obzirom da je poznato da je K aktivator brojnih enzima, i da ima značajnu ulogu u biosintezi proteina i nukleinskih kiselina, te da utiče na brojne fiziološke procese (Page i Di Cera, 2006, Pohl i sar., 2013).

Preporučeni dnevni unos Ca i Mg, prema direktivi Evropske unije, iznosi 800 mg odnosno 375 mg (European Economic Community-EEC, 2008), tako da je dnevni doprinos ovih elemenata, iz jedne porcije ispitivanih drenjina mali i iznosi 2,38 % i 1,79 %, respektivno, iz D<sub>1</sub>, dok iz D<sub>2</sub> iznosi 2,19 % i 1,22 %, redom. Takođe, mali je i dnevni unos Na (0,117 % iz D<sub>1</sub> i 0,081 % iz D<sub>2</sub>).

Preporučene dnevne potrebe Fe iznose 14 mg (European Economic Community-EEC, 2008). Doprinos ovog esencijalnog mikroelemenata iz 300 g ispitivanih plodova drenjina iznosi 10,86 % iz D<sub>1</sub>, i 12,92 % iz D<sub>2</sub> od preporučenog dnevnog unosa. Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti, s obzirom da se zna da u ljudskom organizmu Fe ulazi u sastav hemoglobina. Deficit ovog elementa može biti uzrok anemije kao i smanjenog dopremanja kiseonika do tkiva (Khurshid i sar., 1984, Nisa i sar., 2020, Gupta, 2018).

Dalje, s obzirom da preporučeni dnevni unos Cu iznosi 1 mg (European Economic Community-EEC, 2008), porcija ispitivanih drenjina obezbjeđuje 8,49 % (D<sub>1</sub>) odnosno 7,92 % (D<sub>2</sub>) od dnevnih potreba. I ovaj nalaz je od velikog značaja jer Cu ulazi u sastav enzima bakar-zink superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD), enzima koji je važan za zaštitu od oksidativnog stresa. Bakar je neophodan jer pomaže organizmu da eliminiše slobodne radikale koji mogu dovesti do nepovratnih oštećenja a samim tim i nepovoljno uticati na zdravlje čovjeka (Saad i sar., 2016).

Preporučene dnevne potrebe Zn i Mn iznose 10 mg odnosno 2 mg, respektivno (European Economic Community-EEC, 2008). Njihov dnevni doprinos iz jedne porcije ispitivanih drenjina je mali (do 2,34 % i 1,87 %, respektivno, od preporučenog dnevnog unosa).

Ni, Cd i Pb u svim našim ispitivanim uzorcima (Tabela 4b) bili su ispod granice detekcije instrumenta te stoga ovaj nalaz dodatno doprinosi bezbjednoj upotrebi ploda ove biljke, bez toksikološkog rizika.

#### **4.7 KORELACIJA SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, MAKROELEMENATA I MIKROELEMENATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA DREJINE**

U cilju procjene uticaja sadržaja i sastava fenolnih jedinjenja kao i makroelemenata i mikroelemenata na antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka drenjine, u ovom istraživanju korišćena je korelaciona analiza. Dobijeni rezultati predstavljeni su u tabelama 5, 6, 7, 8 i 9.

U ispitivanim uzorcima drenjine utvrđen je izuzetno visok stepen korelacije (Tabela 5) između sadržaja ukupnih flavonoida i antioksidativne vrijednosti mjerene FRAP metodom ( $R^2 = 0,9216$ ). Mnoga istraživanja su pokazala da ova jedinjenja znatno doprinose antioksidativnoj aktivnosti biljke i da njihova antioksidativna aktivnost raste sa porastom stepena hidroksilacije (Prabhu i sar., 2021). Međutim, pri procjeni antioksidativne aktivnosti mora se uzeti u obzir i prisustvo ostalih sekundarnih metabolita biljke jer njihova antioksidativna aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente, već je posledica, i njihovih međusobnih antagonističkih i sinergističkih djelovanja (Chew i sar., 2011, Lianda, 2012).

Sadržaj ukupnih antocijana u ispitivanim uzorcima (Tabela 5) je pokazao visok stepen korelacije sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom ( $R^2 = 0,7946$ ), tako da visok stepen korelacije zabilježen i između identifikovanih antocijana i DPPH vrijednosti nije iznenađujuć (Tabela 6). Najveći doprinos antioksidativnoj aktivnosti pokazuje cijanidin-3-galaktozid ( $R^2=0,9164$ ), zatim cijanidin-3-glukozid ( $R^2=0,9007$ ) i pelargonin-3-glukozid ( $R^2=0,8896$ ), dok delfinidin-3-glukozid i neidentifikovani derivat pelargonin-3-glukozida pokazuju nešto slabiji stepen korelacije sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP testom ( $R^2 = 0,3219$  i  $R^2=0,0167$ , respektivno).

Korelacija (Tabela 5) sadržaja ukupnih tanina sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP i DPPH testovima bila je niska ( $R^2 = 0,0185$  i  $R^2 = 0,0018$ , respektivno).

Iako su rezultati pokazali da flavonoidi i antocijani u velikoj mjeri doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih uzoraka drenjine, umjerena korelacija (Tabela 5) između sadržaja ukupnih fenola i vrijednosti antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP i DPPH testovima ( $R^2 = 0,3046$  i  $R^2 = 0,5178$ ) ukazuje da pored fenolnih jedinjenja, veliki doprinos vjerovatno potiče od prisutnih, nefenolnih aktivnih komponenti koje imaju antioksidativno dejstvo (Tabela 7). Naime, ovo istraživanje je pokazalo da Ca ima visok stepen korelacije sa vrijednostima antioksidativne

aktivnosti mjerene DPPH testom ( $R^2 = 0,7862$ , respektivno). Ostali ispitivani makroelementi su pokazali niži stepen korelacije  $R^2 < 0,5$ .

Tabela 5. Stepen korelacije ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i tanina i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima drenjine

	DPPH	FRAP
<b>Ukupni fenoli</b>	$y = -0,0153x + 3,8888$ $R^2 = 0,5178$	$y = -0,0002x + 0,1394$ $R^2 = 0,3046$
<b>Flavonoidi</b>	$y = -0,0009x + 0,862$ $R^2 = 0,0021$	$y = 0,0003x + 0,079$ $R^2 = 0,9216$
<b>Antocijani</b>	$y = 5,3515x - 0,2267$ $R^2 = 0,7946$	$y = 0,0405x + 0,1008$ $R^2 = 0,2706$
<b>Tanini</b>	$y = -0,1615x + 0,8428$ $R^2 = 0,0018$	$y = 0,0067x + 0,1045$ $R^2 = 0,0185$

Tabela 6. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih antocijana i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima drenjine

	DPPH	FRAP
<b>Delfinidin-3-glukozid</b>	$y = 0,4879x + 0,7424$ $R^2 = 0,0005$	$y = 0,1655x + 0,1043$ $R^2 = 0,3219$
<b>Cijanidin-3-galaktozid</b>	$y = 0,4158x + 0,1266$ $R^2 = 0,9164$	$y = -3 \cdot 10^{-5}x + 0,1083$ $R^2 = 3 \cdot 10^{-5}$
<b>Cijanidin-3-glukozid</b>	$y = 3,5008x + 0,2341$ $R^2 = 0,9007$	$y = 0,0021x + 0,1079$ $R^2 = 0,0019$
<b>Pelargonin-3-glukozid</b>	$y = 2,2659x + 0,2431$ $R^2 = 0,8896$	$y = 0,0012x + 0,108$ $R^2 = 0,0015$
<b>Derivat pelargonin-3-glukozida</b>	$y = -0,2307x + 0,8888$ $R^2 = 0,0368$	$y = 0,002x + 0,1071$ $R^2 = 0,0167$

Tabela 7. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih elemenata određenih ICP-OES metodom i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima drenjine

	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Ca</b>	$y = 0,0063x - 2,2874$ $R^2 = 0,7862$	$y = -2 \cdot 10^{-5}x + 0,1201$ $R^2 = 0,0708$
<b>Mg</b>	$y = 0,0045x + 0,2008$ $R^2 = 0,0132$	$y = 6 \cdot 10^{-5}x + 0,1008$ $R^2 = 0,0143$
<b>K</b>	$y = 0,0007x - 1,3045$ $R^2 = 0,0945$	$y = 1 \cdot 10^{-5}x + 0,077$ $R^2 = 0,1241$
<b>Na</b>	$y = 0,0066x + 0,6775$ $R^2 = 0,0008$	$y = 0,0011x + 0,0955$ $R^2 = 0,1386$

Tabela 8. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih elemenata određenih AAS metodom, i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima drenjine

	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Fe</b>	$y = 0,1145x - 2,4024$ $R^2 = 0,4593$	$y = 0,0015x + 0,0668$ $R^2 = 0,4710$
<b>Zn</b>	$y = -0,4793x + 3,0041$ $R^2 = 0,5815$	$y = -0,0034x + 0,1243$ $R^2 = 0,1757$
<b>Mn</b>	$y = 1,1152x - 0,0405$ $R^2 = 0,0130$	$y = -0,0253x + 0,1262$ $R^2 = 0,0398$
<b>Cu</b>	$y = -1,1531x + 2,6162$ $R^2 = 0,0314$	$y = 0,05x + 0,0275$ $R^2 = 0,3511$

Tabela 9. Stepen korelacije makroelemenata i mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima drenjine

		<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>AAS</b>	Mikroelementi (Fe, Zn, Mn, Cu)	$y = 0,1329x - 3,8458$ $R^2 = 0,3701$	$y = 0,0021x + 0,034$ $R^2 = 0,5741$
<b>ICP-OES</b>	Makroelementi (Ca, Mg, Na, K)	$y = 0,0011x - 2,9496$ $R^2 = 0,2732$	$y = 6 \cdot 10^{-6}x + 0,0861$ $R^2 = 0,0582$

Stepen korelacije između identifikovanih pojedinačnih elemenata određenih AAS metodom i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima drenjine dat je u tabeli 8. Stepen korelacije je umjeren za Zn sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom ( $R^2 = 0,5815$ ) i za Fe sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH i FRAP testovima ( $R^2 = 0,4593$  i  $R^2 = 0,4710$ ), dok su Mn i Cu pokazali niži stepen korelacije. Korelacija mikroelemenata sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP testom (Tabela 9) je umjerena ( $R^2 = 0,5741$ ), dok je za makroelemente stepen korelacije niži  $R^2 < 0,5$ .



## 5. ZAKLJUČAK

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da drenjina (*Cornus mas* L.) sadrži značajnu količinu antioksidativnih materija (fenola, flavonoida, antocijana i tanina) i makroelemenata (K i Ca).

Analizom soka i tropa drenjine sa dva geografski različita lokaliteta Crne Gore zapažene su razlike u pogledu količine i sadržaja antioksidativnih materija, makroelemenata i mikroelemenata, koje su prouzrokovane različitom nadmorskom visinom, reljefom a samim tim i klimom. Naime, rezultati su pokazali da sok ( $S_1$ ) i trop ( $T_1$ ) iz Šavnika imaju manji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na sok ( $S_2$ ) i trop ( $T_2$ ) iz Danilovgrada. Sličan trend je zabilježen i za ukupni sadržaj flavonoida u soku drenjina ( $S_1$  i  $S_2$ ), dok je sadržaj flavonoida veći u tropu drenjine sa područja Šavnika ( $T_1$ ) nego iz oblasti Danilovgrada ( $T_2$ ). Raspodjela antocijana je bila drugačija u soku i tropu drenjina u odnosu na sadržaj flavonoida, tj. ukupni sadržaj antocijana u soku drenjine iz Šavnika ( $S_1$ ) je veći nego u soku drenjine iz Danilovgrada ( $S_2$ ), dok je sadržaj ovih fenolnih jedinjenja bio veći u tropu drenjine iz centralnog dijela ( $T_2$ ) u odnosu na trop drenjine iz sjevernog dijela ( $T_1$ ). Sadržaj tanina je bio veći u uzorcima soka ( $S_1$ ) i tropa drenjine ( $T_1$ ) iz Šavnika nego u uzorcima ove biljke iz Danilovgrada ( $S_2$  i  $T_2$ ). Ovakva raspodijela antioksidanasa može se pripisati uticaju karakteristika predjela (svijetlost, temperatura, prisustvo hranljivih materija u zemljištu i nadmorska visina) i zrelosti biljke (Kumar i sar., 2017, Gunduz i Özgen, 2013).

Rezultati dobijeni HPLC analizom su pokazali da sok ( $S_1$ ) i trop ( $T_1$ ) iz Šavnika imaju manji sadržaj cijanidin-3-glukozida i pelargonin-3-glukozida u odnosu na sok ( $S_2$ ) i trop ( $T_2$ ) iz Danilovgrada. Delfinidin-3-glukozid i derivat pelargonin-3-glukozida su prisutni u uzorcima soka ( $S_1$ ) i tropa ( $T_1$ ) iz Šavnika, dok ova jedinjenja nisu identifikovana u uzorcima drenjine iz Danilovgrada ( $S_2$  i  $T_2$ ).

Mineralni sadržaj plodova drenjine određen je primjenom AAS i ICP-OES metoda, pri čemu je uočeno da sok i trop drenjine iz Šavnika ( $S_1$  i  $T_1$ ) imaju veći sadržaj pojedinih ispitivanih elemenata (Mg i Na) nego sok i trop iz Danilovgrada ( $S_2$  i  $T_2$ ). Za K i Ca uočena je nešto drugačija raspodjela. Naime, u soku drenjine iz sjeverne oblasti ( $S_1$ ) zabilježene su veće koncentracije oba ova makroelementa, dok trop iz istog mjesta ( $T_1$ ) sadrži veću koncentraciju K ali manji sadržaj Ca u odnosu na odgovarajuće uzorke iz centralne oblasti ( $S_2$  i  $T_2$ ). Veći sadržaj mikroelementa (Fe, Cu i Mn) zabilježen je u soku i tropu drenjine iz Šavnika ( $S_1$  i  $T_1$ ). Izuzetak je Zn za koji je zabilježen

veći sadržaj u soku i tropu iz centralnog dijela (S<sub>2</sub> i T<sub>2</sub>) Crne Gore. Primjenom obje metode, AAS i ICP-OES, toksični metali (Ni, Cd i Pb) nisu detektovani u ispitivanim uzorcima drenjine.

Na osnovu rezultata ispitivanja drenjine sa područja Crne Gore zaključuje se da drenjine mogu biti veoma bitan dio ljudske ishrane, zbog značajne količine antioksidanasa, makroelemenata i mikroelemenata, koji mogu doprinijeti borbi organizma protiv slobodnih radikala i opasnih bolesti. Takođe, može se zaključiti da trop drenjine sa oba lokaliteta sadrži značajne količine ispitivanih materija što ukazuje da se trop, iako nusproizvod od procesa dobijanja soka, može koristiti za izdvajanje bioaktivnih materija.

U ispitivanim uzorcima drenjine utvrđen je izuzetno visok stepen korelacije između sadržaja ukupnih flavonoida sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP testom ( $R^2=0,9216$ ), dok je sadržaj ukupnih antocijana u ispitivanim uzorcima pokazao visok stepen korelacije sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom ( $R^2 = 0,7946$ ), kao i sa pojedinačno identifikovanim antocijanima. Najveći doprinos antioksidativnoj aktivnosti pokazuje cijanidin-3-galaktozid ( $R^2=0,9164$ ), a zatim cijanidin-3-glukozid ( $R^2=0,9007$ ). Antioksidativna aktivnost može poticati i od prisutnih nefenolnih komponenti. Naime, ovo istraživanje je pokazalo da Ca ima visok stepen korelacije sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom ( $R^2 = 0,7862$ ).

## 6. LITERATURA

1. Abidi S.L., High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids, *Journal of Chromatography A.*, 587, 193-203 (1991).
2. Aceto M., Agostino A., Fenoglio G., Idone A., Gulmini M. i sar., Characterisation of colourants on illuminated manuscripts by portable fibre optic UV-visible –NIR reflectance spectrophotometry, *Analytical Methods*, 6, 1488-1500 (2014).
3. Ahmad S, Arshad A. M., Ijaz S., Khurshid U., Rashid F., Azam R., Review on methods used to determine Antioxidant activity, *International Journal of Multidisciplinary Research and Developmen*, 1(1), 41-46 (2014).
4. Ahmetović M., Leko E., Keran H., Šestan I., Odobašić A. i sar., Examination of Physicochemical Parameters of Products Based on Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) and Honey, *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 7, 2349-3889 (2020).
5. Al Mamari H. H., Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis, *Phenolic Compounds*, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98958> (2021).
6. Alavian M. S., Banihabib N., Haghi M. E., Panahi F., Protective Effect of *Cornus mas* Fruits Extract on Serum Biomarkers in CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatotoxicity in Male Rats, *Hepatitis Monthly*, 14(4), e10330 (2014).
7. Aliyu O.A., Faruruwa M.D., Abdu A.H., Seasonal Evaluation of Mineral Elements, Heavy Metals, Essential Amino Acids, Proximate Compositions and Pesticides in Goat Milk, *World Journal of Analytical Chemistry*, 3(1), 1-9 (2015).
8. Anbudhasan P., Alagarsamy S., Sivanandham K., Satishkumaran S., Natural Antioxidants And Its Benefits, *International Journal Of Food And Nutritional Sciences*, 3(6), 2320 – 7876 (2014).
9. Albuquerque R. B., Beatriz M., Oliveira P. P., Barros L. and Ferreira C. F. R. I., Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(5), 805–835 (2021).
10. Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S. & Robards K, Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry*, 127, 183-198 (2002).

11. Anuj Y., Rewa K., Ashwani Y., J.P. Mishra J.P., Seweta S. and Shashi P., Antioxidants and its functions in human body - A Review, *Research in Environment and Life Sciences*, 9(11), 1328-1331 (2016).
12. Al-Taesh H., Celekli A., Sucu M., and Taysi S., Trace elements in patients with aortic valve sclerosis, *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 15, (2021).
13. Atta M. E., Mohamed H. N., Abdelgawad A.M. A., Antioxidants: An Overview on the Natural and Synthetic Types, *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365-375 (2017).
14. Ayoub Z., Mehta A., Mishra K. S., Ahirwal L., Medical plants as natural antioxidants: A review, *Journal of Botanical Society*, 48, ISSN 2229-7170 (2017).
15. Bathla S., Jain T., Heavy Metals Toxicity, *International Journal of Health Sciences & Research*, 6(5), 361-367 (2016).
16. Behrangi N., Ghafoori H., Farahmand Z., Khani M. E., Sanati H. M., Comparison among Cornelian Cherry and *Prunus cerasus* According to Phenolic Content and Antioxidant Capacity by Three Various Methods of Extraction, *Food and Nutrition Sciences*, 6, 1166-1173 (2015).
17. Benzie F. F. I. and Strain J. J., Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Methods Enzymol.*, 299, 15–27 (1999).
18. Bergh J. J., Breytenbach, J. C., Stability-indicating High-performance Liquid-chromatographic Analysis of Trimethoprim in Pharmaceuticals, *Journal of Chromatography A*, 387, 528-531 (1987).
19. Bhattacharya P. T., Misra S. R., and Hussain M., Nutritional aspects of essential trace elements in oral health and disease: an extensive review, *Scientifica*, <https://doi.org/10.1155/2016/5464373> (2016).
20. Bijelić M. S., Gološin R. B., Ninić-Todorović I. J., Cerović B. S., Popović M. B., Physicochemical Fruit Characteristics of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Genotypes from Serbia, *American Society for Horticultural Science*, 46(6),849–853 (2011).
21. Bisht R., Antioxidants: a brief review, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(6-s), 373-376 (2018).

22. Blois MS., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181,1199-1200 (1958).
23. Braga S. M., Gomes O., Multispectral colorimetric portable system for detecting metal ions in liquid media, *Portable Multispectral Colorimeter for Metallic Ion Detection and Classification*, 4th International Symposium on Instrumentation Systems, Circuits and Transducers, 1-6, (2019).
24. Brindza J., Toth D, Forgotten and Less Utilised Plant Species as Functional Food Resources, in *Functional Properties of Traditional Foods*, Springer, Boston, 12, 209-232 (2016).
25. Bule M., Khan F., Nisar M. F., Niaz K., Tannins (hydrolysable tannins, condensed tannins, phlorotannins, flavono-ellagitannins), *Phytonutrients*, In *Recent Advances in Natural Products Analysis*, Elsevier, 132-146 (2020).
26. Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M.L., Páez-Hernández M.E., Rodríguez J.A., Galán-Vidal C.A., Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113(4), 859-871 (2009).
27. Cheeseman K.H., Slater T.F., An introduction to free radicals chemistry, *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-93 (1993).
28. Cherevko S., Mayrhofer K. J. J., On-Line Inductively Coupled Plasma Spectrometry in Electrochemistry: Basic Principles and Applications, In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry, Surface Science and Electrochemistry*, Elsevier, 326-335 (2018).
29. Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., Wan Aida W.M., Ho C.W., Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts, *International Food Research Journal*, 18, 571–578 (2011).
30. Cosmulescu S., Trandafir I., Cornescu F., Antioxidant Capacity, Total Phenols, Total Flavonoids and Colour Component of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Wild Genotypes, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 390-394 (2019).
31. Council of Europe, *European Pharmacopeia*, 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France (2016).

32. Czerwinska M. E., Melzig M. F., *Cornus mas* and *cornus officinalis*-analogies and differences of two medicinal plants traditionally used, *Frontiers in Pharmacology*, 9, 894 (2018).
33. Dahl J. W. and Turner R. E., Facts about Minerals, This document is FCS8809, one of a series of the Department of Family, Youth and Community Sciences, UF/IFAS Extension. Original publication date December 2006. Revised April 2015, October 2018, and May 2022.
34. Das A. K., Islam M.N., Faruk M. O., Ashaduzzaman M., Dungani R., Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities, *South African Journal of Botany*, 135, 58 – 70 (2020).
35. De Biaggi M., Donno D., Mellano G. M., Riondato I., Rakotoniaina N. E., Beccaro L. G., *Cornus mas* (L.) Fruit as a Potential Source of Natural Health-Promoting Compounds: Physico-Chemical Characterisation of Bioactive Components, *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 89-94 (2018).
36. Delage B., Flavonoids, Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis, Oregon, (2015).
37. Deuschla V. C. N., Cruz R. D., Flores V. C., Denardi L. B., Deuschle R. A. N. i sar., Phenolic profile, Antioxidant potential, Antimicrobial Activity and in silico Prediction of Pharmacokinetic and Toxicological Properties, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(4),766-775 (2019).
38. Dinda B., Kyriakopoulos A. M., Dinda S., Zoumpourlis V., Thomaidis N. S., *Cornus mas* L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry, *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 670–690 (2016).
39. Droge W., Free radicals in the physiological control of cell function, *Americal Physiological society, Physiological Reviews*, 82, 47–95 (2002).
40. D'Orazio A. J., Jarrett S., UV Radiation and the Skin, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222-12248 (2013).

41. Enaru B., Dretcanu G., Pop D. T., Stanila A., Diaconeasa Z., Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation, *Antioxidants*, 10(12), 1967 (2021).
42. Eruvbetine D., Canine Nutrition and Health, A paper presented at the seminar organized by Kensington Pharmaceuticals Nig. Ltd., Lagos on August 21 (2003).
43. European Economic Community-EEC, Commission Directive 2008/100/EC. Amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for food stuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. *Off. J. Eur. Commun.*, L285, 9-12 (2008)
44. European Food Safety Authority-EFSA, Scientific opinion on lead in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), *EFSA J.*, 8, 1570 (2010).
45. European Food Safety Authority-EFSA, Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.*, 13, 4002 (2015).
46. European Food Safety Authority-EFSA, Cadmium dietary exposure in the European population, *EFSA J.*, 10, 2551 (2012).
47. Fairulnizal M. M. N., Vimala B., Rathi D. N., Naeem M. M. N., In *Evaluation Technologies for Food Quality*, Woodhead Publishing Series in Food Science, 145-173 (2019).
48. Farrukh A. M., Atomic Absorption Spectroscopy, In *TechOpen* (2012).
49. Fernandes R. P. P., Trindade M. A., Tonin F. G., Lima C. G., Pugine S. M. P. i sar., Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers, *Journal of Food Science Technology*, 53(1), 451–460 (2016).
50. Flieger J., Flieger W., Baj J., Maciejewski R., *Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles*, *Materials*, Basel, 14(15), 4135 (2021).
51. Ghosh S., Prasanna V.L., Sowjanya B., Srivani P., Inductively coupled plasma - Optical emission spectroscopy: A review, *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(1), 2231–5675, 24-33 (2013).

52. Giussani B., Monticelli D., Rampazzi L., Role of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry in cultural heritage research: A review, *Analytica Chimica Acta* 635(1), 6-21 (2009).
53. Gohain N., Studies on the structure and function of phenazine modifying enzymes PhzM and PhzS involved in the biosynthesis of pyocyanin, *Doktorska disertacija, Odsjek za hemiju, Univerzitet u Dortmundu, Dortmund, Njemačka* (2009).
54. Gordillo, B., Rodriguez-Pulido, F. J., Escudero-Gilete, L. M., Gonzalez-Miret, L. M., & Heredia, F. J., Comprehensive Colorimetric Study of Anthocyanin Copigmentation in Model Solutions. Effects of pH and Molar Ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2896-2905 (2012).
55. Govindarajan R. K., Revathi S., Rameshkumar N., Krishnan M., Kayalvizhi N., Microbial tannase: Current perspectives and biotechnological advances, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, 6, 168-175 (2016).
56. Gunduz K., Saracoglu O., Özgen M., Serce S., Antioxidant, physical and chemical characteristics of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) at different stages of ripeness, *Acta scientiarum Polonorum, Hortorum cultus = Ogronictwo* 12(4), 59-66 (2013).
57. Gupta P. S., Roles of metals in human health, *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry*, 2(5), 221–224 (2018).
58. Hajimehdipoor H., Shahrestani R., Shekarchi M., Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds, *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3), 35-40 (2014).
59. Harborne JB, Baxter H, Moss GP, *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, 2nd edition London, Taylor & Francis, 976 (1999).
60. Hodžić A., *Minerali u ishrani*, Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo (2013).
61. Hou X., Jones T. B., *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, doi 10.1002/9780470027318.a5110 (2006).
62. Huang, H., Chang, Y., Wu, C., Hung, C., & Wang, C., Anthocyanin-rich mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun, *Food Chemistry*, 129(4), 1703-1709 (2011).



63. Hussein I. Abdel-Shaf, Mona S.M. Mansour, Polyphenols: Properties, Occurrence, Content in Food and Potential Effects, Environmental Science and Engineering (Multi-Volume Set), Toxicology, 6, 232-261 (2017).
64. Izario Filho J. H., Santos Salazar D. RF., Rosa Capri D. M., Neto C. A., Alcantara D. MAK, Castro Peixoto D. AL., State-of-the-Art and Trends in Atomic Absorption Spectrometry, IntechOpen, 13-36 (2012).
65. Jamshidi-Kia F., Wibowo J. P., Elachouri M., Masumi R., Salehifard-Jouneghani A. i sar., Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body, Journal of Herbmed Pharmacology, 9(3), 191-199 (2020).
66. Jaćimović V., Božović Đ, Ercisli S., Bosančić B. and Necas T., Sustainable Cornelian Cherry Production in Montenegro: Importance of Local Genetic Resources, Sustainability, 12, 8651 (2020).
67. Jayaprakasam B., Olson K. L., Schutzki R. E., Tai M.H., Nair M. G., Amelioration of Obesity and Glucose Intolerance in High-Fat-Fed C57BL/6 Mice by Anthocyanins and Ursolic Acid in Cornelian Cherry (*Cornus mas*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 243-248 (2006).
68. José Teixeira S. C., Gaspar A., Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview, BioMed Research International, 3, (2013).
69. Jucá M. M., Cysne Filhoa S. M. F., de Almeida C. J., da Silva Mesquitac D., de Moraes Barrigac R. J. i sar., Flavonoids: biological activities and therapeutic potential, Natural product research, 34(5), 692-705 (2020).
70. Karaaslan G. M., Karaaslan M. N., Ates B., Investigation of Mineral Components and Antioxidant Properties of a Healthy Red Fruit: Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.), Journal of the Turkish chemical society chemistry, 5(3), 1319–1326 (2018).
71. Kazimeirski M., Regula J., Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) – characteristics, nutritional and pro-health properties, Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 18(1), 5-12 (2019).
72. Khoo H. E., Azlan A., Tang S. T., and Lim S. M., Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food & Nutrition Research, 61(1), 1-21 (2017).

73. Khurshid J. S. i sar., The Role of Inorganic Elements in Human Body, *Nucleus*, 21(4), 3-23 (1984).
74. Kim H. S., Sunwoo Y. I., Lipid and unsaturated fatty acid productions from three microalgae using nitrate and light-emitting diodes with complementary LED wavelength in a two-phase culture system, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(9), 1517–1526 (2019).
75. Kedare B. S., Singh R., Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422 (2011).
76. Keshari A.K., Verma A.K., Kumar T., Ragini Srivastava, Oxidative Stress: A Review, *The International Journal Of Science & Technoledge*, 3(7), 155-162 (2015).
77. Klymenko S., Kucharska Z. A., Sokól-Letowska A., Piórecki N., Przybylska D., Grygorieva O., Iridoids, Flavonoids, and Antioxidant Capacity of *Cornus mas*, *C. officinalis*, and *C. mas* × *C. officinalis* Fruits, *Biomolecules*, 11(6), 776 (2021).
78. Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(5), 436-447 (2008).
79. Kovacev K., Master thesis, Kansas state University, Manhattan, Kansas (2019).
80. Krivoruchko, E. V., Carboxylic acids from *Cornus mas.*, *Chemistry of Natural Compounds*, 50, 112–113 (2014).
81. Kumar A., Ahmad F., Zaidi S., Importance of Bioactive Compounds Present in Plant Products and Their Extraction: A Review, *Agricultural Reviews*, 40(4), 249-260 (2020).
82. Kumar S. and Pandey K. A., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *Scientific World Journal*, <https://doi.org/10.1155/2013/162750> (2013).
83. Kumar S., Yadav A., Yadav M., Yadav P. J., Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f., *BMC Research Notes*, 10(1), 60 (2017).
84. Lagalante A., Atomic Absorption Spectroscopy: A Tutorial Review, *Applied Spectroscopy Reviews*, 34(3),173-189 (2007).
85. Lakatos B., Szentmihalyi K., Vinkler P., Balla J., The role of essential metal ions in the human organism and their oral supplementation to the human body in deficiency states, *Orvosi Hetilap*, 145(25), 1315-1319 (2004).

86. Li X., Xu J., Tang X., Liu Y., Yu X., Wang Z., and Liu W., Anthocyanins inhibit trasuzumab-resistant breast cancer in vitro and in vivo, *Molecular Medicine Reports*, 13, 4007- 4013 (2016).
87. Lianda R.L.P., Sant´ Ana L.D.O., Echevarria A., Castro R.N., Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 618–627 (2012).
88. Liu Y., Lee M.L., Yanqiao Xiang, Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography*, 1104 (1-2), 198–202 (2006).
89. Long H., Zhang F., Wang H., Yang W., Hou H., Yu J., and Liu B., Mulberry anthocyanins improves thyroid cancer progression mainly by inducing apoptosis and autophagy cell death. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 34(5), 255-262 (2018).
90. Martin M., Guiochon, G., Effects of high pressures in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1090(1-2), 16-38 (2005).
91. Masoodi K. Z., Balkhi M. B., Rasool R. S., Shah F., Kaul S., and Dhar M. K., Anthocyanins from purple black carrot (*Daucus carota* L.) act as effective natural food biocolorant and real time indicators of food spoilage. *Journal of Plant Science Research*, 32(2), 115-120 (2016).
92. Medvidovic-Kosanovic M, Seruga M, Jakobek L, i sar. Eletrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin [J]. *Croat Chem Acta*, 83, 197-207 (2014).
93. Milenković Anđelković A., Radovanović C.B., Anđelković M., Radovanović A., The anthocyanin content and bioactivity of cornelian cherry (*Cornus mas*) and wild blackberry (*Rubus fruticosus*): Fruit extracts from the Vlasina region, *Advanced Technologies*, 4(2), 26-31 (2015).
94. Moreira X, Abdala-Roberts L., Hidalgo-Galvez D. M., Vazquez-Gonzalez C., Perez-Ramos M. I., Micro-climatic effects on plant phenolics at the community level in a Mediterranean savanna, *Scientific Reports*, 10, 14757 (2020).
95. Munteanu G. I. and Apetrei C., A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Assessing Antioxidant Activity, *Antioxidants (Basel)*, 11(3), 584 (2022).
96. Munteanu G. I. and Apetrei C., Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380 (2021).

97. Namioka T. Diffraction Gratings. In: Vacuum Ultraviolet Spectroscopy, Experimental Methods in Physical Sciences, Elsevier, 1, 347-377 (2000).
98. Nassour R., Ayash A., Al-Tameemi K., Anthocyanin pigments: Structure and biological importance, Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 13(4), 45 – 57 (2020).
99. Nguyen T., Nioi P., Pickett C.B., ‘The Nrf2-antioxidant response elementsignaling pathway and its activation by oxidative stress’, Journal of Biological Chemistry, 284(20), 13291-13295 (2009).
100. Nikolova K., Minkova S., Milkova-Tomova I., Genova T., Borisova E. i sar., Fluorescence spectra and antioxidant activity of juices from dogwood (*cornus mas*), International Conference on Agronomy and Food Science and Technology, Agrofood (2019).
101. Nisa K. U., Samiullah, Khan N., Attiq-ur-Rehman, Detection of Heavy metals in Fruits and Vegetables available in the Market of Quetta city, Al-Nahrain Journal of Science, 23(1), 47–56 (2020).
102. Novruzov N. E., Mustafayeva A. L., Zeynalli Z. A., Comparative study of the chemical composition and antioxidant properties of extracts of various cornel (*Cornus mas* L.) organs, Plant & Fungal Research, 2(2), 41-48 (2019).
103. Olfa B., Mariem A., Cyrine D., Salah A. M., Najla S., Nasri-Ayachi B. M., Screening for antifungal activity polyphenols content of *Origanum majorana* L. essential oil treated and non treated with salt, International Journal of Advanced Research, 3(5), 570-574 (2015).
104. Page J. M., Di Cera E., Role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in Enzyme Function, Physiological Reviews, 86(4), 1049-1092 (2006).
105. Panche A., Diwan A. D., Chandra S. R., Flavonoids: An overview, Journal of nutritional science, Journal of Nutritional Science, 5 e47, 1-15 (2016).
106. Pandey K. B. and Rizva S. I., Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2(5), 270-278 (2009).
107. Paul V., Pandey R., Ramesh K.V., Meena R.C., Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) for Elemental Analysis of Plant Samples, Manual of ICAR Sponsored Training Programme on “Physiological Techniques to Analyze the Impact of Climate Change on Crop Plants” New Delhi, 84-86 (2017).

108. Perova I. B., Zhogova A. A., Polyakova A. V., Eller K. I., Ramenskaya G. V., Samylina I. A., Biologically active substances of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.), Вопросы питания, 83(5), 86-94 (2014).
109. Petrova V. K., Baranovskaya B. V., Korotkova A. N., Direct inductively coupled plasma optical emission spectrometry for analysis of waste samarium-cobalt magnets, Arabian Journal of Chemistry, 15(1), 103501 (2022).
110. Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C., Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health, International journal of Biomedical science, 4(2), 89-96 (2008).
111. Pohl R. H., Wheeler S. J., and Murray H. E., Sodium and Potassium in Health and Disease, Metal Ions in Life Sciences, 13, 29-47 (2013).
112. Popović M. B., Štajner D., Kevrešan S., Bijelić S., Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) – Comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods, Food Chemistry, 134, 734-741 (2012).
113. Prabhu S., Molath A., Choksi H., Kumar S. and Mehra R., Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases, International Journal of Physiology, Nutrition and Physical Education, 6(1), 293-301 (2021).
114. Putnik P., Lorenzo J. M., Barba J. F., Roohinejad S., Jambrak R.A. i sar., Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials, Foods, 7(7), 106 (2018).
115. Qin W., Bazeille N., Henry E., Zhang B., Deprez E., Xi XG., Mechanistic insight into cadmium-induced inactivation of the Bloom protein, Scientific Reports, 6, 26225 (2016).
116. Ramakrishnan K., Krishnan M.R.V., Tannin – classification, analysis and applications, Ancient Science of Life, XIII 3and 4, 232 – 238 (1994).
117. Randjelovic S. S., Kostic A. D., Stojanovic S. G., Mitic S. S, Mitic N. M. i sar., Metals content of soil, leaves and wild fruit from Serbia, Central European Journal of Chemistry, 12(11), 1144-1151 (2014).
118. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Free Radic Biol Med, 20, 933–956 (1996).
119. Rivero-Cruz F. J., Granados-Pineda J., Pedraza-Chaverri J., Pérez-Rojas J. M., Kumar-Passari A. i sar., Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis, Antioxidants, 9, 70 (2020).

120. Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, J Gaforio J, "Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies", *Review Antioxidants*, (5), 137 (2019).
121. Rop O., Mlcek J., Kramarova D. and Jurikova T., Selected cultivars of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) as a new food source for human nutrition, *African Journal of Biotechnology*, 9(8), 1205-1210 (2010).
122. Saad A. A., El-Sikaily S., Kassem H., Essential, non-essential metals and human health, *Blue Biotechnology Journal*, 3(4), 2163-3886 (2016).
123. Salma I. J., Sajib M. A. M., Motalab M., Mumtaz B., Jahan S., Hoque M. M., Saha B. K., Comparative Evaluation of Macro and Micro-Nutrient Element and Heavy Metal Contents of Commercial Fruit Juices Available in Bangladesh, *American Journal of Food and Nutrition*, 3 (2), 56-63 (2015).
124. Sandoval-Ramirez B. A., Catalan U., Llauro E., Valls R. M., Salamanca P., Rubio L. i sar., The health benefits of anthocyanins: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and controlled clinical trials, *Nutrition Reviews*, 80(6), 1515-1530 (2021).
125. Santo A., Zhu H., and Li Y. R., Free Radicals: From Health to Disease, *Reactive Oxygen Species*, 2(4), 245–263 (2016).
126. Straßmann S., Passon M. and Schieber A., Chemical Hemisynthesis of Sulfated Cyanidin-3-O-Glucoside and Cyanidin Metabolites, *Molecules*, 26(8), 2146 (2021).
127. Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R., Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods, *Free Radical Research*, 36(2), 177-87 (2002).
128. Seeram N.P., Schutzki R., Chandra A., Nair M.G., Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in *Cornus species*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2519–2523 (2002).
129. Shi H, Noguchi N, Niki E, Natural antioxidants, In *Antioxidants in food Practical application* Introducing natural antioxidants in food, CRC Press Woodhead Publishing Ltd, 22-70 (2001).
130. Sirivibulkovit K., Nouanthavong S., Sameenoi Y., Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis, *Analytical Sciences*, 34(7), 795-800 (2018).

131. Soetan K. O., Olaiya C. O., Oyewole O. E., The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review, *African Journal of Food Science*, 4(5), 200-222 (2010).
132. Song R., Wu Q., Zhao L., Yun Z., Advances on antioxidants in research and applications, *E3S Web of Conferences*, 131, 01009 (2019).
133. Stanisavljević S. N., Karakterizacija i in vitro biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja graška (*Pisum sativum* L.), Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija (2015).
134. Steyn W. J., Prevalence and Functions of Anthocyanins in Fruits. In *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions and Applications*, 86-105, (2009).
135. Mandal S., Yadav S., Yadav S., Nema R.K., Antioxidants: A Review, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1), 102-104 (2009).
136. Szczepaniak O. M., Kobus-Cisowska J., Kusek W., Przeor M., Functional properties of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.): A comprehensive review, 245, 2071–2087 (2019).
137. Tiptiri-Kourpeti A., Fitsiou E., Spyridopoulou K., Vasileiadis S., Iliopoulos C. i sar., Evaluation of Antioxidant and Antiproliferative Properties of *Cornus mas* L. Fruit Juice, *Natural Products in Health Promotion and Disease Prevention, Antioxidants*, 8(9), 377 (2019).
138. Tomar D., Kaur H., ATR-FTIR Spectroscopy and Its Relevance to Probe the Molecular-Level Interactions Between Amino Acids and Metal-Oxide Nanoparticles at Solid/Aqueous Interface, *Advances in Spectroscopy: Molecules to Materials*, 3-21 (2019).
139. Trombini L. T., Oliveira E., Berlese B. D., Minozzo R., Inhibition of thiol-containing enzymes in erythrocytes of workers exposed to lead, *Interciencia*, 40(2), 84-90 (2015).
140. Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J., Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1-2), 37-56 (2004).
141. Valviv S. R., Rathod V. S., Mineral Composition of Some Wild Edible Fruits from Kolhapur District, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(1), 239 (2011)
142. Verma N., Singh H., Classification of Drug Molecules for Oxidative Stress Signaling Pathway, *ET Systems Biology*, 13(5), 243-250 (2019).

143. Vermerris W., Nicholson R., Families of phenolic compounds and means of classification, Phenolic Compound Biochemistry, Springer, (2008).
144. Virgili F. and Marino M., Regulation of cellular signals from nutritional molecules: A specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine, 45(9), 1205–1 (2008).
145. Wallace T.C., Anthocyanins in Cardiovascular Disease, Advances in Nutrition, 2(1), 1–7 (2011).
146. Wallace T. C., and Giusti M., Anthocyanins, Advances in Nutrition, 6(5), 620-622 (2015).
147. Wang LS. and Stoner G.D., Anthocyanins and their role in cancer prevention, Cancer Letters, 269(2), 281–290 (2008).
148. Williamson G. and Manach C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies, The American journal of clinical nutrition, 81(1), 243S–255S (2005).
149. Wollinger A., Perrin E., Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays, Comptes Rendus Chimie, 754-765 (2016).
150. Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E., and Prior R. L., Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(11), 4069-4075 (2006).
151. Yang W., Li J., Gao JH., Huang Z., Tang C., Progresses of Somatostatin Quantification for Clinical Practice, Current Pharmaceutical Analysis, 11(3), 164–172 (2015).
152. Yilmaz K.U., Ercisli S., Zengin Y., Sengul M., Kafkas E.Y., Preliminary Characterisation of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Genotypes for Their Physico-Chemical Properties. Food Chemistry, 114, 408-412 (2009).
153. Young IS., Woodside JV., Antioxidants in health and disease, Journal of clinical pathology, 54(3), 176-186 (2001).
154. Yousefi B., Abasi M., Abbasi M.M., Jahanban-Esfahlan, R. Anti-Proliferative Properties of Cornus mas Fruit in Different Human Cancer Cells, Asian Pacific journal of cancer prevention, 16, 5727 (2015).



155. Zafar S., Ahme R., Khan R., Biotransformation: a green and efficient way of antioxidant synthesis, *Free Radical Research*, 50(9), 1-22 (2016).
156. Zhao Y., Wu Z. Y., and Wang M., Bioactive Substances of Plant Origin, *Handbook of Food Chemistry*, 967-1008 (2015).