

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

**JOVANA ĐUROVIĆ**

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL ŠIPURKA  
(*ROSA CANINA L.*) SA PODRUČJA CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2023. godine**

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

**JOVANA ĐUROVIĆ**

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL ŠIPURKA  
(*ROSA CANINA L.*) SA PODRUČJA CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2023. godine**

## PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Jovana Đurović

Datum i mjesto rođenja: 23.11.1998. godine; Nikšić

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

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 šipurka (*Rosa canina* L.) sa područja Crne Gore

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

## UDK, Ocjena i ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 16.02.2023. godine

Datum prihvatanja teme: 07.04.2023. 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 rada:

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, predsjednik

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 02.11.2023. godine

## IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Jovana Đurović

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „Antioksidativni potencijal šipurka (*Rosa canina* L.) sa područja Crne Gore” rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nijesam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta:

## **Zahvalnica**

*Ovaj master rad je rađen na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici, u laboratoriji za analitičku hemiju, laboratoriji za instrumentalne metode, laboratoriji za organsku hemijsku tehnologiju i u Institutu za proučavanje lekovitog bilja »dr Josif Pančić« u Beogradu. Zahvalna sam posebno naučnom saradniku dr Vanji Tadić na ukazanoj pomoći.*

*Neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Nadi Blagojević na zalaganju, strpljenju i povjerenju, nemjerljivoj posvećenosti, smjernicama i stručnim savjetima tokom izrade i pisanja ovog master rada.*

*Zahvaljujem se i prof. dr Vesni Vukašinović-Pešić, prof.dr Biljani Damjanović-Vratnici i dr Snežani Vukanović na izdvojenom vremenu i pomoći tokom izrade ovog rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Mariji Kaluđerović koja mi je pružala nesebičnu pomoć i podršku od početka studiranja do danas, i koja je učinila da ovaj period bude mnogo ljepši i lakši, Mari Kandić i Anđeli Lalatović za svu podršku i pomoć prilikom izrade ovog rada.*

*Takođe, hvala mojoj porodici koja je uvijek bila uz mene i pružala mi bezrezervnu podršku u svemu.*

**Jovana Đurović**

## IZVOD

U ovom radu vršena je analiza šipurka sa dva područja Crne Gore, iz okoline Nikšića i iz okoline Žabljaka. Određivan je sadržaj fenola, flavonoida, antocijana, tanina, vitamina C kao i antioksidativna aktivnost u sjemenkama, mesnatom dijelu i plodovima šipurka kao i u ekstraktima dobijenim različitim metodama ekstrakcije (infuz, meceracija, ultrazvučna i Sokslet ekstrakcija). Za određivanje sadržaja fenola, flavonoida, antocijana, tanina korišćene su spektrofotometrijske metode, za određivanje vitamina C korišćena je metoda direktne jodometrijske titracije, a za antioksidativnu aktivnost DPPH i FRAP test. Identifikovana su i određena fenolna jedinjenja HPLC metodom. U navedenim uzorcima određivani su pojedini esencijalni (Fe, Cu, Mn, Zn) i toksični elementi (Pb i Ni) metodom AAS.

Ustanovljeno je da plod šipurka iz okoline Nikšića sadrži veću količinu fenola, flavonoida, tanina i da ima bolju antioksidativnu aktivnost nego plod šipurka iz okoline Žabljaka. Sadržaj fenola u uzorcima sjemenki, mesnatog dijela i plodova sa oba lokaliteta se kretao od 179,39 do 231,08 mg GAE/100 g, flavonoida od 1,21 do 28,99 mg Qc/g, tanina od 0,31 do 2,01 %, antocijana od 0,00198 do 0,0209 %. Antioksidativna aktivnost određivana DPPH testom se kretala od 50,96 do 854,6  $\mu\text{g/mL}$ , a mjerena FRAP testom od 0,042 do 0,174  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ . Najzastupljeniji mikroelement kod uzoraka sa oba lokaliteta je bio bakar sa koncentracijom od 8,279 do 48,555 mg/kg, zatim gvožđe u opsegu koncentracija 5,438-23,037 mg/kg, mangan u opsegu koncentracija 6,809-20,009 mg/kg, cink u opsegu koncentracija 3,331-18,673 mg/kg. Pokazalo se da toksičnih elemenata ima u vrlo niskim koncentracijama, tako olova ima u opsegu 0,318-2,653 mg/kg, a nikla 0,514-1,291 mg/kg, dok kadmijum nije identifikovan u uzorcima.

U ekstraktima se sadržaj: fenola kretao od 180,40 do 354,11 mg GAE/100 g s.e.; flavonoida od 13,56 do 54,96 mg Qc/g s.e.; tanina od 0,42 do 3,86 %; vitamina C od 642,57 do 1862,68 mg/100 g s.e. Antioksidativna aktivnost mjerena DPPH testom se kretala od 107,25 do 407,52  $\mu\text{g/mL}$ , a mjerena FRAP testom od 0,113 do 0,494  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ . Infuz ekstrakcija se pokazala kao najbolja metoda izolovanja bioaktivnih jedinjenja (fenola, flavonoida, tanina) kao i vitamina C iz šipurka sa oba lokaliteta (osim za sadržaj flavonoida kada se radi o uzorku iz okoline Žabljaka, kod koga se ultrazvučna ekstrakcija pokazala kao najbolja za izolovanje flavonoida). Takođe, najbolji

antioksidativni potencijal od svih vrsta ekstrakata šipurka posjeduju infuz ekstrakti sa oba lokaliteta (važi i za DPPH i FRAP test).

HPLC metodom je potvrđeno prisustvo sledećih fenolnih jedinjenja: galna kiselina, protokatehinska kiselina, elaginska kiselina, hiperozid, kvercetin, kvircitrin, rutin, epikatehin i epikatehin galat.

*Ključne riječi:* šipurak, *Rosa canina* L., antioksidativna aktivnost/potencijal, DPPH, FRAP, AAS, HPLC, fenoli, flavonoidi, tanini, antocijani, vitamin C, mikroelementi, ekstrakt

## ABSTRACT

In this study, an analysis of rosehip was conducted from two regions in Montenegro, from the vicinity of Nikšić and Žabljak. The content of phenols, flavonoids, anthocyanins, tannins, vitamin C, as well as antioxidant activity, was determined in the seeds, fleshy part, and fruits of rosehip, as well as in extracts obtained by different extraction methods (infusion, maceration, ultrasonic, and Soxhlet extraction). Spectrophotometric methods were used to determine the content of phenols, flavonoids, anthocyanins, and tannins, while the direct iodometric titration method was used for determining vitamin C content. DPPH and FRAP tests were employed to assess antioxidant activity. Phenolic compounds were identified and quantified using HPLC. In the mentioned samples, certain essential elements (Fe, Cu, Mn, Zn) and toxic elements (Pb and Ni) were determined using the AAS method.

It was found that rosehips from the area of Nikšić contain a higher amount of phenols, flavonoids, and tannins and show better antioxidant activity compared to rosehips from the Žabljak region. The phenol content in samples of seeds, fleshy parts, and fruits from both locations ranged from 179.39 to 231.08 mg GAE/100 g, flavonoids from 1.21 to 28.99 mg Qc/g, tannins from 0.31 to 2.01%, and anthocyanins from 0.00198 to 0.0209 %. Antioxidant activity measured by the DPPH assay ranged from 50.96 to 854.6  $\mu\text{g/mL}$ , while the FRAP assay measured from 0.042 to 0.174  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ . The most abundant microelement in the samples from both localities was copper, with concentrations ranging from 8.279 to 48.555 mg/kg, followed by iron with concentrations in the range of 5.438-23.037 mg/kg, manganese in the range of 6.809-20.009 mg/kg, and zinc in the range of 3.331-18.673 mg/kg. It was shown that there are toxic elements in very low concentrations, so lead is in the range of 0.318-2.653 mg/kg, and nickel 0.514-1.291 mg/kg, while cadmium was not detected in the samples.

In the extracts, the content of compounds varied as follows: phenols ranged from 180.40 to 354.11 mg GAE/100 g dry weight; flavonoids ranged from 13.56 to 54.96 mg Qc/g dry weight; tannins ranged from 0.42 to 3.86 %; vitamin C ranged from 642.57 to 1862.68 mg/100 g dry weight. Antioxidant activity measured by the DPPH assay ranged from 107.25 to 407.52  $\mu\text{g/mL}$ , and by the FRAP assay, it ranged from 0.113 to 0.494  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ . Infusion extraction was found to be the best method for isolating bioactive compounds (phenols, flavonoids, tannins) as well as vitamin



C from rosehip from both locations (except for flavonoid content in the Žabljak region sample, where ultrasonic extraction proved to be the most effective for isolating flavonoids). Additionally, the highest antioxidant potential among all types of rosehip extracts was observed in the infusion extracts from both locations (applies to both DPPH and FRAP tests).

The HPLC method confirmed the presence of the following phenolic compounds: gallic acid, protocatechinic acid, ellagic acid, hyperoside, quercetin, quercitrin, rutin, epicatechin and epicatechin gallate.

Keywords: Rosehip, *Rosa canina* L., antioxidant activity/potential, DPPH, FRAP, AAS, HPLC, phenols, flavonoids, tannins, anthocyanins, vitamin C, microelements, extract

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	12
2. TEORIJSKI DIO .....	13
2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ŠIPURKA .....	13
2.2. ŠIPURAK KAO IZVOR VITAMINA C, FENOLA, FLAVONOIDA, TANINA, ANTOCIJANA I MAKRO I MIKROELEMENATA .....	15
2.3. METODE EKSTRAKCIJE.....	23
2.3.1. Maceracija.....	24
2.3.2. Infuz ekstrakcija .....	24
2.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija .....	25
2.3.4. Sokslet ekstrakcija .....	25
2.4. TEČNA HROMATOHRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) .....	28
2.5. ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROMETRIJA (AAS).....	29
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	31
3.1. HEMIKALIJE, INSTRUMENTI I APARATURE.....	32
3.2. PRIPREMA BILJNOG MATERIJALA .....	32
3.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI, FENOLA, FLAVONOIDA, TANINA I ANTOCIJANA U PLODU, MESNATOM DIJELU, SJEMENKAMA I EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA.....	33
3.3.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti u plodu, mesnatom dijelu, sjemenkama i ekstraktima ploda šipurka.....	33
3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u plodu, mesnatom dijelu, sjemenkama i ekstraktima ploda šipurka.....	37
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida .....	39
3.3.4. Određivanje sadržaja tanina .....	40
3.3.5. Određivanje sadržaja antocijana .....	42
3.4. ODREĐIVANJE METALA U PLODU, MESNATOM DIJELU, SJEMENKAMA I EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA.....	43
3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VITAMINA C U EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA DOBIJENIM RAZLIČITIM PROCESIMA EKSTRAKCIJE.....	43
3.6. IDENTIFIKACIJA FENOLNIH JEDINJENJA HPLC METODOM .....	45
3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	45

4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	46
4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODOVA I RAZLIČITIH EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA.....	46
4.2. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I RAZLIČITIH EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA.....	49
4.3. SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I RAZLIČITIH EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA.....	52
4.4. SADRŽAJ ANTOCIJANA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA I PLODA ŠIPURKA.....	54
4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA.....	55
4.5.1. FRAP test.....	56
4.5.2. DPPH test.....	58
4.6. MINERALNI SASTAV UZORAKA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA.....	60
4.7. SADRŽAJ VITAMINA C U RAZLIČITIM EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA ...	63
4.8. IDENTIFIKACIJA FENOLNIH JEDINJENJA HPLC METODOM U PLODOVIMA ŠIPURKA.....	65
5. KORELACIJA IZMEĐU SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, VITAMINA C, MIKROELEMENTATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA PLODA ŠIPURKA.....	68
6. ZAKLJUČAK.....	72
7. LITERATURA.....	74

# 1. UVOD

Šipurak (*Rosa canina* L.) spada u red najzastupljenijih ljekovitih biljaka na našim prostorima. Zahvaljujući svom hemijskom sastavu (visok sadržaj vitamina C, fenola i antioksidanata) ima veliki farmakološki značaj i široku primjenu. Na tržištu se najčešće nalazi u obliku biljnog čaja, ali i kao džem, marmelada, voćni sok i dr. Šipurak (*Rosa canina* L.) je vrlo malo ispitan na području Crne Gore u pogledu njegovog hemijskog sastava, prisutnih biološki aktivnih materija u njemu kao i njegov antioksidativni kapacitet/potencijal.

U ljudskom organizmu stvaraju se slobodni radikali, koji imaju dvojaku ulogu, odnosno oni mogu biti korisni za neke fiziološki važne procese u ljudskom organizmu ali isto tako mogu biti i jako štetni, a njihova štetnost se ogleda u formiranju oksidativnog stresa, koji predstavlja disbalans oksidanata i antioksidanata koji se smatra glavnim razlogom nastanka velikog broja oboljenja. Samim tim neophodno je obezbijediti dovoljnu količinu antioksidanata čija je uloga da spriječe ili uspore procese oksidacije u ljudskom organizmu. Voće i povrće se smatra prirodnim izvorom antioksidanata. Antioksidativna svojstva potiču od fenolnih jedinjenja, flavonoida, antocijana, tanina i vitamina C.

U ovom radu je ispitan sadržaj antioksidativnih supstanci u šipurku (*Rosa canina* L.), sa dva različita područja Crne Gore (okoline Nikšića i Žabljaka). Određivan je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i tanina u šipurku primjenom UV-VIS spektrometrije i sadržaj vitamina C titrimetrijski. Takođe, primjenom HPLC (high performance liquid chromatography) tehnike su određivana fenolna jedinjenja. Za procjenu antioksidativne aktivnosti korišćeni su FRAP test (Ferric Reducing Antioxidant Power) i DPPH test (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Ispitivanja ovih materija su vršena u suvom plodu, sjemenkama, mesnatom dijelu šipurka, kao i u različitim ekstraktima ploda šipurka, što omogućava da se na osnovu dobijenih rezultata uoče razlike u navedenim uzorcima sa različitim lokaliteta.

Osim biološki aktivnih supstanci određen je i mineralni sastav uzoraka korišćenjem atomske apsorpcione spektroskopije (AAS).

Cilj je bio da se odredi antioksidativni kapacitet šipurka (*Rosa canina* L.) (iz suvog biljnog materijala i ekstrakata), da se odredi kojom vrstom ekstrakcije se izdvaja najviše biološki aktivnih materija, ali i da se HPLC određivanjem ustanovi koja su pojedinačna jedinjenja prisutna u šipurku.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ŠIPURKA

Samonikla divlja ruža (*Rosa canina* L.), poznata pod nazivom šipurak, je višegodišnji žbun koji pripada porodici Rosaceae (Selahvarzian i sar., 2018). Biljke roda *Rosa* rastu i razvijaju se u umjerenim i suptropskim zonama sjeverne hemisfere (Nađpal i sar., 2016). Prilično je rasprostranjen po cijeloj Evropi, sjevernoj Africi, sjevernoj i zapadnoj Aziji (Selahvarzian i sar., 2018). U Crnoj Gori šipurak je rasprostranjena biljka u šumama, šikarama, kamenjarima, proplancima, živicama (Stevanović i sar., 2016). Raste uz ograde i puteve, po pašnjacima nizijskog i brdovitog područja. Šipurak raste i na kamenitim podlogama, pri čemu izrastaju manji plodovi (Tihelka, 2022). *Rosa canina* L. ima veliku otpornost na “teške” uslove u kojima niče (kamenita područja, nagnuta mjesta, siromašna zemljišta, ograničenje dotoka vode), a uspijeva na različitim nadmorskim visinama i temperaturama (Demir i sar., 2001). Šipurak je ljekovita biljka koja raste kao bodljikavi, višegodišnji listopadni žbun koji dostiže visinu i do 3 metra, koji ima vitke stabljike sa bodljama (Anđelković, 2016; Selahvarzian i sar., 2018). Korijenov sistem biljke je veoma jak i prodire duboko u zemljište, a horizontalno se pruža u dužinu do 40 cm (Bumbak, 2021; Tihelka, 2022). Cvjetovi su bijele ili roze boje, zreli plodovi su crveni i glatki, veličine oko 2 cm i u unutrašnjosti sadrže mnogobrojne tvrde sjemenke (Selahvarzian i sar., 2018). Srednja težina ploda je 2,8 do 2,9 g, raspoređena između mesnatog dijela (65–70 %) i sjemenki (30–35 %) (Igal i sar., 2021). Srednja visina ploda je 20,08 mm, srednja širina ploda 12,44 mm, najveći broj plodova je okruglastog ili ovalnog oblika (Bosilj, 2022). Boja plodova potiče od karotenoida (Winther i sar., 2016; Igal i sar., 2021). Karotenoidi su vrlo važna klasa žuto-crvenih biljnih pigmenata. Karotenoidi se definišu kao bioaktivna jedinjenja koji apsorbuju svjetlost talasne dužine između 400 i 500 nm. Oni su važni molekuli za prikupljanje svjetlosti koji prenose energiju reakcionim centrima tokom fotosinteze i koji potiskuju štetne fotohemijske reakcije, posebno oksidacije (čistači radikala). Karotenoidi se generalno dijele u dvije podgrupe: 1) ksantofili, koji su molekuli koji sadrže kiseonik (npr. lutein, zeaksantin i kriptoksantin) i 2) karoteni, koji su nehidroksilovani ugljovodonicima (tj.  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, i likopen). Boje karotenoida su direktno povezane sa njihovom strukturom (broj konjugovanih dvostrukih veza i prisustvo ili odsustvo kiseonika). Ksantofili, koji sadrže kiseonik, često su žuti, dok su karoteni, kojima nedostaje kiseonik, narandžasti ili crveni. Likopen je aciklični karotenoid sa sposobnošću da djeluje kao jak antioksidans i identifikovan je u šipurku u rasponu od 9,07–19,93 mg/100 g suvog ploda. Razlike u sadržaju karotenoida mogu se opravdati sa nekoliko faktora, kao što su stepen

sazrijevanja ploda i njegova zrelost, genetski faktori, klima, uslovi skladištenja i način ekstrakcije (Winther i sar., 2016; Igual i sar., 2021).

Na slici 1 je prikazan izgled cvijeta, stabljike, plodova, mesnatog dijela i sjemenki *Rosa canina* L.



Slika 1. Šipurak: a) cvijet b) stabljika, c) plodovi sa peteljka, d) plodovi, e) mesnati dio, f) sjemenke (1.a, Institut "Dr Josif Pančić"; 1.b-f, Autor: Jovana Đurović)

## 2.2. ŠIPURAK KAO IZVOR VITAMINA C, FENOLA, FLAVONOIDA, TANINA, ANTOCIJANA I MAKRO I MIKROELEMENATA

Plod šipurka sadrži velike količine askorbinske kiseline (vitamina C), koja je antioksidant i ima veliki značaj u prevenciji virusnih i bakterijskih infekcija, kardiovaskularnih oboljenja i slično. Osim vitamina C šipurak sadrži i vitamine: A, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, K, P, voćne kiseline (jabučnu, limunsku i vinsku), tanine, flavonoide, fenole, antocijane, šećer, karotenoide, kao i mikroelemente (bakar, gvožđe, mangan, cink, selen) i makroelemente (kalcijum, magnezijum, fosfor, kalijum, natrijum) (Demir i sar., 2001; Özcan, 2002; Nojavan i sar., 2008; Chrubasik i sar., 2008; Kazaz i sar., 2009; Türkben i sar., 2010; Adamczak i sar., 2012; Tumbaš i sar., 2012; Vural, 2015; Murathan i sar., 2016; Javanmard i sar., 2018; Saygi, 2021; Sabahi i sar., 2022). Sjemenke sadrže dosta vitamina E i C, nezasićenih i zasićenih masnih kiselina. Bilježi se i prisustvo pojedinih aminokiselina u listovima i grančicama šipurka kao što su: lizin, valin, alanin, metionin, tirozin, histidin, fenilalanin, leucin, prolin, treonin, serin (Kubczak i sar., 2020). Vitamini imaju raznoliku lepezu funkcija u organizmu, kao što su aktivnost koenzima, aktivnost prekursora, antioksidativno dejstvo, regulacija unosa kalcijuma i fosfora i regulacija koagulacije (zgrušavanja) krvi. Nedostatak vitamina kod ljudi dovodi do brojnih bolesti i tegoba. Vitamini rastvorljivi u vodi, kao što su vitamini C i B, ne skladište se u tijelu, već ih je potrebno stalno unositi ishranom. Na primjer, vitamin C je važan u sintezi dopamina, karnitina, brojnih neuroendokrinih peptida i u transformaciji holesterola u žučne kiseline (Winther, 2016).

Zbog vitaminsko-minerološkog sastava, šipurak (*Rosa canina* L.) se od davnina koristi u liječenju mnogih bolesti. U domaćinstvima se koristi u vidu čajeva, pekmeza, sokova, kompota, likera itd. Sastojci šipurka imaju važnu ulogu u liječenju gojaznosti, dijabetesa. Šipurak se koristi protiv reumatodnog artritisa, bola u leđima, osteoartritisa, smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti (Gruenwald i sar., 2019). Takođe se koristi u liječenju čireva i jačanju desni. Korijen šipurka se koristi za liječenje kašlja, hemoroida, disurije (bolnog mokrenja), primjenjuje se i kao zaštita od urinarnih infekcija (Seifi i sar., 2018), a listovi se koriste u liječenju prehlada, gripa i kašlja. Plod se koristi u liječenju astme i bronhitisa (Selahvarzian i sar., 2018), kao i kod liječenja kožnih poremećaja i čireva (Guimarães, 2010). Korisna svojstva šipurka mogu, u izvjesnoj mjeri, biti povezana sa fenolnim jedinjenjima i velikom količinom vitamina C. Fenolna jedinjenja imaju širok spektar biohemijskih karakteristika, uključujući antimutagena i antikancerogena svojstva i antibakterijsku aktivnost (Liaudanskas i sar., 2021). Štaviše, askorbinska kiselina, kao glavni antioksidant rastvorljiv u vodi u

tijelu, ima antikancerogena i druga biološka svojstva. Askorbinska kiselina ima značajnu regulatornu funkciju u tijelu jer je uključena u sintezu hormona (Živković i sar., 2015; Selahvarzian i sar., 2018). Vasić i sar. (2021) su se bavili procjenom hemijskog sastava sjemenki šipurka, sa najvećim fokusom na sadržaj masnih kiselina. Koristili su Ramanovu spektroskopiju i gasnu hromatografiju (gasni hromatograf sa detektorom plamene jonizacije GC-FID) za ovo ispitivanje. Ramanovi spektri su prikazali prisustvo lipida, masnih kiselina, polifenola i saharida kao preovlađujućih jedinjenja u sjemenkama. Rezultati GC analize ukazuju da sjemenke šipurka predstavljaju dobar izvor nutritivno vrijednih masnih kiselina (Vasić i sar., 2021). Ulje sjemenki, koje je takođe bogato flavonoidima, koristi se za zaštitu kože od opekotina (Winther, 2016).

Tumbaš i sar. (2012) su ispitivali uticaj fitohemikalija iz šipurka (*Rosa canina* L.) na stabilne slobodne radikale i ćelije kancera kod ljudi. Šendil (2006) je utvrdio da se askorbinska kiselina brzo raspada na visokim temperaturama, a Erenturk i sar. (2004) su ispitivali kako utiče vrijeme trajanja sušenja kao i temperatura na kojoj se suše plodovi na sadržaj vitamina C.

Zbog značaja šipurka u liječenju mnogih bolesti, veliki broj naučnika se bavio ispitivanjem hemijskog sastava šipurka. U radovima se može uočiti da je posebna pažnja posvećena analizi fenolnog sastava. U tabeli 1 je predstavljen hemijski sastav šipurka, kao i metode određivanja datih jedinjenja uz odgovarajući pregled referenci.

Tabela 1. Hemijski sastav šipurka (*Rosa canina* L.)

Metoda određivanja	Jedinjenja	Referenca
GCMS <sup>1</sup>	$\alpha$ -E-akaridijal, vitispiran (izomer), $\beta$ -jonon, 2-heksenal, 6-metil-5-hepten-2-on, 1-heksanol, 2-heksen-1-ol, 4-okten-3-on, $\beta$ -elemen	(Selahvarzian i sar., 2018)
GCMS	$\alpha$ -humulen, $\alpha$ -pinen, $\beta$ -mircen, $\alpha$ -tujen, <i>p</i> -cimen, heneikozan, geraniol, linalol, $\beta$ -kariofilen, $\alpha$ -terpinen, $\gamma$ -terpinen	(Ghazghazi i sar., 2012)
GCMS	Vitamin C, gadoleinska kiselina, buterna kiselina, palmitinska kiselina, stearinska kiselina, oleinska kiselina, linoleinska kiselina, arahidinska kiselina	(Kayahan i sar., 2022)
GCMS	palmitinska kiselina, stearinska kiselina, oleinska kiselina, linoleinska kiselina	(Wenzig i sar., 2008)
	3-hidroksiflavon, vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol, $\beta$ -tokoferol, $\gamma$ -tokoferol), naringenin, kamferol, luteolin, mircetin, kvercetin, hesperidin, <i>o</i> -kumarna kiselina, salicilna	

<sup>1</sup> GCMS Gas chromatography–mass spectrometry (gasna hromatografija-masena spektrometrija)



HPLC <sup>2</sup>	kiselina, elaginska kiselina, rutin (kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid), kumarin, sinapinska kiselina, <i>m</i> -kumarna kiselina, luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glukozid, siringaldehid, <i>p</i> -kumarna kiselina, ferulinska kiselina, cijanidin, galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzoeva kiselina), <i>p</i> -benzohinon (kinon), 3,5-dihidroksibenzoeva kiselina, pirokatehol, protokatehinska kiselina, neohlorogenska kiselina, epigalokatehin (monomer flavan-3-ol), 4-hidroksibenzoeva kiselina, 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, 4-hidroksibenzaldehid, hlorogena kiselina, vanilinska kiselina, $\beta$ -rezorcilna kiselina, kofeinska kiselina, siringinska kiselina, procijanidin B <sub>2</sub> (pentahidroksiflavan)	(Kubczak i sar., 2020)
Kapilarna elektroforeza	lizin, valin, alanin, metionin, tirozin, histidin, fenilalanin, leucin, prolin, treonin, serin, vitamin B <sub>1</sub> (tiamin hlorid), vitamin B <sub>2</sub> (riboflavin), vitamin B <sub>3</sub> (nikotinska kiselina), vitamin B <sub>5</sub> (pantotenska kiselina), vitamin B <sub>9</sub> (folna kiselina)	(Kubczak i sar., 2020)
HPLC	galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzoeva kiselina), kofeinska kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina, ferulinska kiselina, elaginska kiselina, mircetin, kvercetin, kamferol, vitamin C	(Tumbaš i sar., 2012)
LC-MS/MS <sup>3</sup>	galna kiselina, katehin, hlorogena kiselina, <i>p</i> -kumarna kiselina, luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glukozid, kvercetin, kamferol	(Saygi, 2021)
LCMS <sup>4</sup>	galokatehol, pirogalol-2- <i>O</i> -glukuronid, katehin, apigenin, procijanidin B <sub>2</sub> , procijanidin B <sub>3</sub> , procijanidin B <sub>6</sub> , luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glukozid, elaginska kiselina, rozmarinska kiselina, limunska kiselina, kamferol	(Fetni i sar., 2020)
UHPLC <sup>5</sup>	epigalokatehin (monomer flavan-3-ol), katehin, hlorogena kiselina, luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glukozid, kvercetin, kamferol-3- <i>O</i> -glukozid, florizin	(Liaudanskas i sar., 2021)
HPLC-MS <sup>6</sup>	katehin, cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid, kvercetin	(Stănilă i sar., 2015)
LC-ESI-MS <sup>7</sup>	resveratrol, apigenin, tilirozid	(Stănilă i sar., 2015)
HPLC	oksalna kiselina, vinska kiselina, jabučna kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, vitamin C, glukoza, fruktoza, sorbitol	(Murathan i sar., 2016)

<sup>2</sup> **HPLC** High-Performance Liquid Chromatography (tečna hromatografija visokih performansi)

<sup>3</sup> **LC-MS/MS** Liquid chromatography (LC) tandem mass spectrometry (MS) (tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom)

<sup>4</sup> **LCMS** Liquid chromatography-mass spectrometry (tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom)

<sup>5</sup> **UHPLC** Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (tečna hromatografija ultra-visokih performansi)

<sup>6</sup> **HPLC-MS** High performance liquid chromatography-mass spectrometry (tečna hromatografija visokih performansi-masena spektrometrija)

<sup>7</sup> **LC-ESI-MS** Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (tečna hromatografija-elektrosprej jonizacija-masena spektrometrija)

LC-MS/MS	kvercetin-3- <i>O</i> -glukuronid, kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid, kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid, kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozid, neohlorogena kiselina, luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glukozid	(Bajić-Ljubičić, 2018)
LC-DAD-ESI/MS <sup>8</sup>	galna kiselina, hlorogena kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, <i>p</i> -kumarna kiselina, ferulinska kiselina, luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glukozid, rozmarinska kiselina, sinapinska kiselina, cimetna kiselina, kvercetin	(Polumackanycz i sar., 2020)
HPLC	katehin, procijaidin B <sub>2</sub> , ferulinska kiselina, kvercetin	(Anđelković, 2016)
LC-MS/MS	galna kiselina, katehin, kvircitrin, vanilinska kiselina, <i>p</i> -kumarna kiselina, ferulinska kiselina, kvercetin, kamferol-3- <i>O</i> -glukozid	(Nađpal i sar., 2016)
LC-MS/MS	galna kiselina, protokatehinska kiselina, katehin, kvircitrin, vanilinska kiselina, hiperozid, <i>p</i> -kumarna kiselina, elaginska kiselina, naringenin, kamferol-3- <i>O</i> -glukozid	(Nađpal, 2017)
LC-MS/MS	<i>p</i> -kumarna kiselina, ferulinska kiselina, elaginska kiselina, mircetin, kvercetin, kamferol	(Türkben i sar., 2020)
LC-ESI-MS	4-hidroksibenzoeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, siringaldehid, ferulinska kiselina	(Grajzer i sar., 2015)
HPLC	hlorogena kiselina, siringinska kiselina, <i>p</i> -kumarna kiselina	(Czyzowska, 2015)
HPLC	limunska kiselina, vitamin C	(Adamczak i sar., 2012)
HPLC	vitamin C	(Sabahi i sar., 2022)
HPLC	vitamin C	(Nojavan i sar., 2008)

Pregledom literature uočeno je da su korišćene različite vrste rastvarača za ekstrakciju bioaktivnih materija i da su u istraživanjima utvrđene različite koncentracije bioaktivnih materija u dobijenim ekstraktima. Tako su u istraživanju šipurka sa teritorije Francuske Daels-Rakotoarison i sar. (2002) našli sadržaj fenola od 197,24 mg GAE/100 g suvog ekstrakta (u maceratu, korišćenjem aceton/voda (60/40, v/v) kao rastvarača). Kayahan i sar. (2022) su ispitivanjem uzoraka iz Turske (rađena maceracija gdje je rastvarač bio metanol) otkrili sadržaj fenola od 1538,68 mg GAE/100 g, a Murathan i sar. (2016) su ispitivanjem suvih plodova šipurka iz Turske našli sadržaj fenola od 6298 mg GAE/100 g. Takođe, pregledom literature je ustanovljeno da su neki istraživači određivali sadržaj bioaktivnih materija u svježim plodovima šipurka. Stanić (2017) je određivala fenole u svježim plodovima šipurka iz Hrvatske i ustanovila da se sadržaj fenola kretao od 1109,62 do 1310,79 mg GAE/100 g, takođe u svojim istraživanjima i Bosilj (2022) bilježi, u svježim plodovima šipurka iz Hrvatske, sličan sadržaj fenola 1266,25 mg/100 g, dok su Rovná i sar. (2020) pronašli od 2,61 do 6,33 mg GAE/g svježeg materijala u uzorcima iz Slovačke. Vršena su i ispitivanja sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima ploda

<sup>8</sup> LC-DAD-ESI/MS Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detection and Electrospray Ionisation- mass spectrometry (tečna hromatografija-elektrosprej jonizacija-masena spektrometrija sa detektorom diodnog niza)

šipurka. Tako su Moldovan i sar. (2021) u liofiziranom ekstraktu (metodom Folin-Ciocalteu) našli sadržaj ukupnih fenola 24,1 mg GAE/g. Oni su takođe, određivali i sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja pomoću LC-DAD-ESI/MS i ustanovili da je ukupan sadržaj tako određivanih fenolnih jedinjenja u ekstraktu 0,992 mg/g ekstrakta (Moldovan i sar., 2021).

Postoje podaci da je sadržaj fenola odredivan i u smrznutoj pulpi. Roman i sar. (2013) su ispitivanjem uzorka iz Rumunije na sadržaj fenola došli do rezultata od 326,3 do 575,1 mg GAE/100 g smrznute pulpe.

Rovná i sar. (2020) su određivali sadržaj flavonoida u svježem šipurku sa teritorije Slovačke i dobili rezultate u granicama od 0,08 do 2,03 mg QE/g, dok je Bosilj (2022) u svježem šipurku iz Hrvatske za flavonoide ustanovila vrijednost od 608,5 mg GAE/100 g. Roman i sar. (2013) su ispitivanjem flavonoida u zamrznutom svježem šipurku iz Rumunije došli do vrijednosti koje su se kretale u granicama od 101,3 do 163,2 mg QE/100 g.

I pored toga što je sadržaj antocijana vrlo nizak u plodu šipurka, pregledom dostupne literature uočeno je da se mali broj istraživača bavio određivanjem tanina i antocijana i u plodu šipurka i u ekstraktima ploda šipurka. Naime, Skrypnik i sar. (2019) su ispitivali tanine u potpuno zreom plodu šipurka koji je liofiziran (sa područja Baltičkog mora) i dobili vrijednost oko 4 mg/g, dok su Ghendov-Mošanu i sar. (2018) odredili sadržaj tanina u hidro-alkoholnim ekstraktima i dobili vrijednost od 106,41 mg TAE/g suvog materijala (TAE- Tannic Acid Equivalent (ekvivalent taninske kiseline)).

Javanmard i sar., (2018) su određivali sadržaj antocijana u različitim uzorcima sa teritorije Irana i dobili vrijednosti u granicama od 74,15 do 119,80  $\mu\text{mol/g}$  svježeg šipurka, a Murathan i sar. (2016) su odredili sadržaj ukupnih antocijana u svježim plodovima u vrijednosti od 2,75 mg/100 g.

Određivanje antioksidativne aktivnosti u plodovima šipurka i u ekstraktima dobijenim različitim tehnikama ekstrakcije i u različitim rastvaračima radili su mnogi istraživači. Koristili su različite testove za određivanje antioksidativne aktivnosti. Rezultate koje su dobili izražavali su u različitim jedinicama posebno ako su koristili FRAP test. Nađpal (2017) je ispitivala antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta svježeg ploda šipurka (*Rosa canina* L.), metanolnog ekstrakta suvog ploda, vodenog ekstrakta svježeg ploda, vodenog ekstrakta suvog ploda, vodenog ekstrakta voćne kaše, džema korišćenjem FRAP testa; rezultati su se kretali od 13,3 do 88,2,1 mg ekv. ask. kis. /g s.e. Mihaylova i sar. (2015) su ispitivali vodene ekstrakte šipurka (dekokte i infuze) i ustanovili da su se vrijednosti dobijene FRAP metodom kretale od 344,85 do 771,86  $\mu\text{M TE/g}$  suvog materijala (TE- Trolox equivalents), a Moldovan i sar. (2021) su dobili 99 mg TE/g u ekstraktima šipurka koji su dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom plodova šipurka iz Italije.

Wenzig i sar. (2008) su koristili DPPH test za određivanje antioksidativnog kapaciteta za ekstrakte dobijene ekstrakcijom po Soksletu pri čemu su koristili različite rastvarače, i nađene vrijednosti u ovom istraživanju su se kretale od 13,7 do 988  $\mu\text{g/mL}$ . Dok su Skrypnik i sar. (2019) određivali totalni antioksidativni kapacitet u nezrelom, poluzrelom i potpuno zrelom plodu šipurka sa sledećih lokaliteta sa područja Baltičkog mora: Curonian Spit, Sambia Peninsula, Vistula Spit i dobili sledeće rezultate koji su navedeni u tabeli 2.

Tabela 2. Antioksidativni kapacitet nezrelih, poluzrelih i potpuno zrelih plodova *Rosa canina* L. sa područja Baltičkog mora određivan DPPH testom (Skrypnik i sar., 2019)

Lokalitet	Nezreo plod	Poluzreo plod	Zreo plod
Curonian Spit	114,1 $\mu\text{mol TE/g}$	126,3 $\mu\text{mol TE/g}$	127,6 $\mu\text{mol TE/g}$
Sambia Peninsula	124,1 $\mu\text{mol TE/g}$	128,4 $\mu\text{mol TE/g}$	132,2 $\mu\text{mol TE/g}$
Vistula Spit	108,2 $\mu\text{mol TE/g}$	119,7 $\mu\text{mol TE/g}$	116,3 $\mu\text{mol TE/g}$

Na osnovu navedenih podataka u ovom radu (tabela 2) ne uočava se značajna razlika između rezultata dobijenih za nezreo, poluzreo i potpuno zreo plod.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti osušenog ploda šipurka Liaudanskas i sar. (2021) su, korišćenjem DPPH testa, dobili vrijednost oko 250  $\mu\text{mol TE/g}$ . Jemaa i sar. (2017) su ispitali uzorak iz Irana i utvrdili antioksidativnu aktivnost od 0,668  $\text{mg/mL}$  za metanolni ekstrakt. Mihaylova i sar. (2015) su za vodeni ekstrakt (dekot i infuz) dobili vrijednosti od 2,66 do 6,32  $\mu\text{M TE/g}$  (uzorak iz Bugarske). Polumackanycz i sar. (2020) su ispitali razne vodene i hidrometanolne ekstrakte DPPH testom gdje su se vrijednosti za vodene ekstrakte kretale od 1,95 do 35,64  $\text{mg TE/100 g}$  i 3,66 do 9,45  $\text{mg TE/100 g}$  za hidrometanolne ekstrakte.

S obzirom da plod šipurka sadrži velike količine vitamina C, koji je antioksidant i ima veliki značaj u prevenciji virusnih i bakterijskih infekcija, kardiovaskularnih oboljenja i slično, veliki broj istraživača se bavio određivanjem sadržaja vitamina C. U radovima su navedene vrijednosti dobijene za sadržaj vitamina C u suvom i svježem plodu šipurka, u različitim djelovima ploda šipurka, te u ekstraktima dobijenim različitim tehnikama ekstrakcije i u različitim rastvaračima. Oprica i sar. (2015) su ispitali pulpu i sjemenke šipurka na sadržaj vitamina C i dobili 449,91 i 25,54  $\text{mg/100 g}$  svježeg šipurka, respektivno. Adamczak i sar. (2012) su za liofizirani šipurak dobili vrijednosti od 0,08 do 2,67  $\text{mg/100 g}$ . Nojavan i sar. (2008) su ispitali sadržaj vitamina C u potpuno zrelom, poluzrelom i nezrelom

plodu. Uzorke su pripremali na dva načina (zamrzavanjem i sušenjem na blagim temperaturama). Rezultati njihovog istraživanja dati su u tabeli 3.

Tabela 3. Sadržaj vitamina C u plodovima šipurka različite zrelosti (Nojavan i sar., 2008)

	<b>Priprema zamrzavanjem</b>	<b>Priprema sušenjem na blagim T</b>
Potpuno zreo plod šipurka	417,5 mg/100 g	211 mg/100 g
Poluzreo plod šipurka	175 mg/100 g	34 mg/100 g
Nezreo plod šipurka	18 mg/100 g	3 mg/100 g

Na osnovu podataka iz tabele 3, uočeno je da se najviše vitamina C nalazi u popuno zreom plodu šipurka, što je pokazano i u radu Skrypnik i sar. (2019).

Javanmard i sar. (2018) su za svježi šipurak dobili vrijednost sadržaja vitamina C u granicama od 518,30 do 1358 mg/100 g, dok su Murathan i sar. (2016) ispitivanjem zamrznutog svježeg ploda dobili vrijednost sadržaja vitamina C od 754,48 mg/100 g. Bosilj (2022) je za svježi šipurak dobila vrijednosti od 33,05 do 200,59 mg/100 g, a Stanić (2017) je za svježi šipurak dobila vrijednosti od 79,26 do 341,92 mg/100 g svježe supstance. Paunović i sar. (2014) su ispitivali sadržaj vitamina C u svježem i suvom plodu šipurku i dobili rezultate: od 52,80 do 200,64 mg/100 g svježeg ploda šipurka i od 73,59 do 395,19 mg/100 g suvog ploda šipurka, iz čega se može zaključiti da više vitamina C ima u osušenim plodovima.

Dakle, postoji veliki broj literaturnih podataka o ispitivanju vitamina C u uzorcima ploda šipurka.

S obzirom da mikro i makroelementi imaju značajnu ulogu kod biohemijskih procesa patoloških i normalnih stanja tkiva, a i da se plod šipurka mnogo koristi u narodnoj medicini, naučnici su pratili sadržaj mikro i makroelemenata u plodu šipurka, što je navedeno u tabeli 4.

Tabela 4. Sadržaj određenih mikro i makroelemenata u plodovima *Rosa canina* L.

<b>Element</b>	<b>Vrijednost</b>	<b>Jedinica mjere</b>	<b>Referenca</b>
Natrijum (Na)	0,236	mg/g	Saygi i sar., 2021
	540,17	ppm	Türkben i sar., 2010
	3,97-4,67	mg/kg	Demir i sar., 2000
	149	mg/kg	Kazaz i sar., 2009
	4	mg/100 g	Fan i sar., 2014
Kalcijum (Ca)	2,47	mg/g	Saygi i sar., 2021
	4908	ppm	Türkben i sar., 2010
	3234-5766	mg/kg	Javanmard i sar., 2018

	133,3-146,7 6301 18 169	ppm mg/kg mg/kg mg/100 g	Demir i sar., 2000 Kazaz i sar., 2009 Chrubasik i sar., 2008 Fan i sar., 2014
Magnezijum (Mg)	0,43 1796 806-1610 162,7-183,9 1909 69	mg/g ppm mg/kg ppm mg/kg mg/100 g	Saygi i sar., 2021 Türkben i sar., 2010 Javanmard i sar., 2018 Demir i sar., 2000 Chrubasik i sar., 2008 Fan i sar., 2014
Kalijum (K)	9140 890,5-1023,9 4458-7918 1473 p 11,71 429	mg/kg mg/kg mg/kg ppm mg/g mg/100 g	Kazaz i sar., 2009 Demir i sar., 2000 Javanmard i sar., 2018 Türkben i sar., 2010 Saygi i sar., 2021 Fan i sar., 2014
Fosfor (P)	2,56 863,88 1337-2305 1850-2200 1010 61	mg/g ppm mg/kg mg/kg mg/kg mg/100 g	Saygi i sar., 2021 Türkben i sar., 2010 Javanmard i sar., 2018 Demir i sar., 2000 Kazaz i sar., 2009 Fan i sar., 2014
Gvožđe (Fe)	267 17,52 29-48 59,4-72,9 27 14 1,06 59,4-72,9	mg/kg mg/kg mg/kg mg/kg mg/kg ppm mg/100 g mg/kg	Chrubasik i sar., 2008 Saygi i sar., 2021 Javanmard i sar., 2018 Demir i sar., 2000 Kazaz i sar., 2009 Özcan, 2002 Fan i sar., 2014 Demir i sar., 2020
Bakar (Cu)	5 6,67 8-16 5,07 0,113	mg/kg mg/kg mg/kg mg/kg mg/100 g	Chrubasik i sar., 2008 Saygi i sar., 2021 Javanmard i sar., 2018 Vural, 2015 Fan i sar., 2014
Mangan (Mn)	244 13,43 20-65 22,4-44,8 117,62-476,14 92 32 1,02	mg/kg mg/kg mg/kg mg/kg ppm mg/kg mg/kg mg/100 g	Chrubasik i sar., 2008 Saygi i sar., 2021 Javanmard i sar., 2018 Demir i sar., 2020 Özcan, 2002 Vural, 2015 Kazaz i sar., 2009 Fan i sar., 2014
Olovo (Pb)	0,3 0,385	mg/kg ppm	Chrubasik i sar., 2008 Vural, 2015
Nikl (Ni)	2,9 1,050	mg/kg mg/kg	Chrubasik i sar., 2008 Vural, 2015
Cink (Zn)	22	mg/kg	Chrubasik i sar., 2008

	9,78	mg/kg	Saygi i sar., 2021
	8-27	mg/kg	Javanmard i sar., 2018
	3,69-4,51	ppm	Demir i sar., 2020
	10	mg/kg	Kazaz i sar., 2009
	121,75-976,14	ppm	Özcan, 2002
	11,50	mg/kg	Vural, 2015
	0,25	mg/100 g	Fan i sar., 2014
Bor (B)	13	mg/kg	Kazaz i sar., 2009
Kadmijum (Cd)	0,1	mg/kg	Chrubasik i sar., 2008
Kobalt (Co)	0,4	mg/kg	Chrubasik i sar., 2008
Hrom (Cr)	0,9	mg/kg	Chrubasik i sar., 2008
Barijum (Ba)	47	mg/kg	Chrubasik i sar., 2008
Stroncijum (Sr)	59	mg/kg	Chrubasik i sar., 2008
Aluminijum (Al)	157	mg/kg	Chrubasik i sar., 2008
Selen (Se)	2,47	mg/kg	Saygi i sar., 2021

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4 može se uočiti da plod šipurka ima visok sadržaj kalcijuma, magnezijuma i kalijuma koji predstavljaju esencijalne elemente za ljudski orgnizam.

### 2.3. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je proces koji se koristi za dobijanje određenih jedinjenja iz različitih biljnih uzoraka. Ekstrakcija je često prvi korak prilikom određivanja bioaktivnih svojstava biljke (Fonmboh i sar., 2020; Rudraswamy i sar., 2021). Prilikom odvajanja i identifikacije različitih bioaktivnih materija iz biljaka važnu ulogu imaju metode ekstrakcije, koje utiču i na stabilnost i na kvalitet dobijenog ekstrakta (Gupta i sar., 2012). Za ekstrakciju fitohemikalija iz biljnog materijala najčešće se koriste metode kao što su ekstrakcija maceracijom, infuz ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, Sokslet (Soxhlet) ekstrakcija.

Naučnici su proučavali i analizirali uticaj različitih vrsta rastvarača, kao što su metanol, heksan i etanol, u svrhu ekstrakcije antioksidanata iz različitih djelova biljaka, kao npr. lišće, plod i sjeme. U cilju ekstrakcije različitih fenolnih jedinjenja iz biljaka sa visokim stepenom preciznosti, moraju se koristiti različiti rastvarači različitih polariteta. Na osnovu literaturnih podataka se zaključuje da su se u etanolnim ekstraktima biljaka, ekstrahovale veće koncentracije/količine fenola u poređenju sa acetonom, vodom i metanolom kao rastvaračima. Više različitih rastvarača se uobičajeno koristi za ekstrakciju fitohemikalija, a obično se za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja koristi sušeni prah biljaka čime se eliminiše uticaj vode iz biljnog materijala. Rastvarači koji se koriste za ekstrakciju biomolekula iz biljaka biraju se na osnovu polariteta. Polaritet, od najmanje polarnog do

najpolarnijeg, nekoliko uobičajenih rastvarača je sledeći: heksan < hloroform < etilacetat < aceton < metanol < voda (Altemimi i sar., 2017).

### **2.3.1. Maceracija**

Maceracija je vrlo jednostavan proces ekstrakcije koji se koristi od davnina, a sastoji se od potapanja, najčešće prethodno usitnjenog biljnog materijala, u rastvaraču tokom određenog vremena (Fonmboh i sar., 2020; Azahar i sar., 2020). Tokom ovog procesa ćelijski zid biljke omekšava i puca, prilikom čega dolazi do oslobađanja biološki aktivnih materija biljke (Fonmboh i sar., 2020). Efikasnost ekstrakcije zavisi od vremena i primijenjenog rastvarača. Izbor rastvarača u velikoj mjeri zavisi od njegove polarnosti i od vrste bioaktivne materije koju treba ekstrahovati. Najčešće korišćeni rastvarači prilikom maceracije su voda, etanol, metanol, heksan, etil-acetat, aceton i hloroform. Dodirna površina između biljnog materijala i rastvarača može biti povećana i miješanjem tokom procesa maceracije, čime se može povećati i ekstrakcija određenog jedinjenja. Povišena temperatura takođe može doprinijeti efikasnijoj ekstrakciji, jer je veliki broj jedinjenja rastvorljiviji na višim temperaturama. Vrijeme maceracije u najvećoj mjeri zavisi od jedinjenja koje se ekstrahuje, a najmanje je 3 dana (Azahar i sar., 2020; Fonmboh i sar., 2020).

### **2.3.2. Infuz ekstrakcija**

Infuz ekstrakcija je slična maceraciji po tome što se oba procesa sastoje od potapanja biljnog materijala u određenoj količini hladne ili vruće vode. Za infuz, trajanje ekstrakcije se smanjuje, a odnos rastvarača i uzorka je različit (Patel i sar., 2021; Rudraswamy i sar., 2021). Ova tehnika je korisna u ekstrakciji lako rastvorljivih bioaktivnih komponenti (Rudraswamy i sar., 2021). Infuzi se pripremaju od listova, cvjetova, nadzemnih djelova biljaka, plodova itd. Biološki aktivne materije se ekstrahuju vrućom vodom, tako što se osušeni i/ili usitnjeni biljni materijal prelje vrućom vodom i ostavi poklopljen određeni vremenski period. Zatim se talog odvaja od tečnosti (Dragović-Uzelac, 2016; Poljarec, 2017).



### **2.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija**

Ultrazvuk se koristi u laboratorijskoj praksi da olakša i/ili poboljša različite korake u analitičkom procesu. Ultrazvučna ekstrakcija se sastoji od prolaska ultrazvučne energije u obliku talasa kroz tečni rastvarač u kome se nalaze čvrste čestice uzorka. Vjeruje se da je brzo lokalizovano povećanje pritiska i temperature odgovorno za narušavanje ćelijskih membrana, čime se olakšava migracija rastvarača u ćelije i ekstrakcija željene komponente. Ultrazvučna ekstrakcija je popularno sredstvo za ekstrakciju jer je relativno jeftina u poređenju sa drugim metodama i ima male instrumentalne zahtjeve (ultrazvučno kupatilo) (Mussatto, 2015). Uzorak se prelije određenim rastvaračem i stavi u ultrazvučno kupatilo, a vrijeme i temperatura se kontrolišu (Altemimi i sar., 2017).

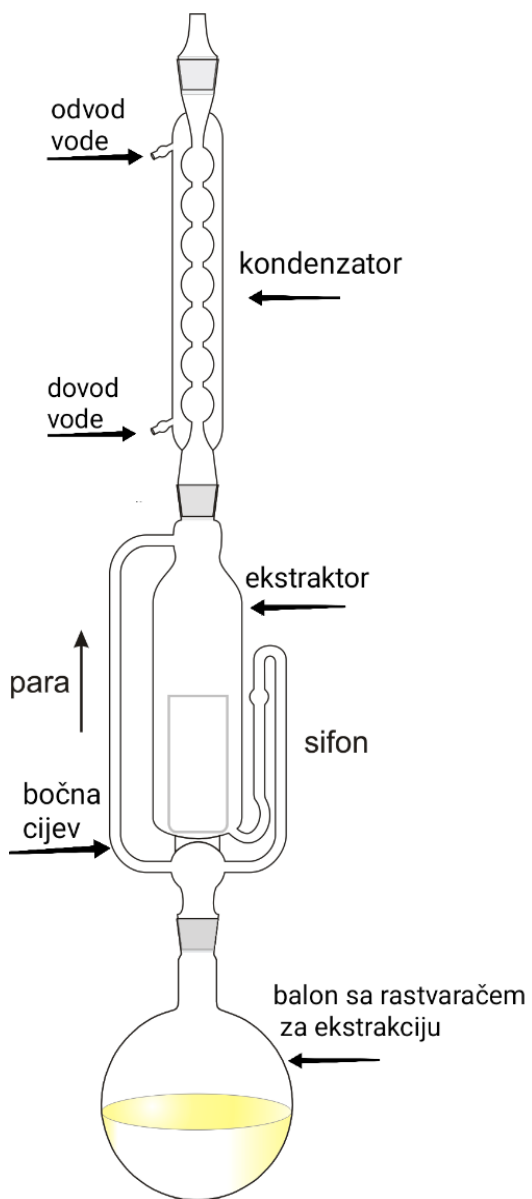
Tokom ultrazvučne ekstrakcije koristi se ultrazvučna energija i rastvarač za odvajanje određenih bioaktivnih materija iz biljaka. Ultrazvuk predstavlja mehanički talas čija se frekvencija kreće do 20 kHz. Ovi talasi se sastoje od niza ciklusa kompresije i razrjeđivanja koji se šire kroz medijum izazivajući pomicanje molekula sa njihovih prvobitnih pozicija. Kod zvučnog talasa visokog intenziteta, negativni pritisak tokom razrjeđivanja prekoračuje privlačnu silu koja spaja molekule i stvara kavitacione mjehure. Kavitacija je glavni mehanizam ultrazvučne ekstrakcije. Mjehurići kavitacije stvaraju udarne talase i ubrzani sudar između čestica koji uzrokuje rasparčavanje ćelijske strukture. Razaranjem ćelijske strukture biljke dolazi do solubilizacije bioaktivne komponente u rastvaraču zbog smanjenja veličine čestica, povećane površine i velike brzine prenosa mase u graničnom sloju čvrste matrice, zbog čega se povećava prinos ekstrakcije (Kumar i sar., 2021). Glavni uslovi koje treba kontrolisati za postizanje efikasne ekstrakcije su vrijeme ekstrakcije, količina i polaritet rastvarača, vrsta i količina uzorka. Prednost ove metode je što omogućava ekstrakciju termički labilnih komponenti. Nakon ekstrakcije, ekstrakt se mora odvojiti od uzorka filtracijom ili centrifugiranjem (Kim i sar., 2012).

### **2.3.4. Sokslet ekstrakcija**

Proces ekstrakcije po Soksletu je najviše korišćena tehnika ekstrakcije čvrsto-tečno u mnogim oblastima kao što su poljoprivreda, farmacija itd. Soksletov aparat omogućava kontinuirani tretman uzorka rastvaračem tokom perioda od nekoliko sati ili dana da bi se ekstrahovalo jedinjenje od interesa. Najčešće korišćeni rastvarači u Sokslet ekstrakcijama su heksan, hloroform, metanol, etanol i voda (Azahar i sar., 2020). Proces Sokslet ekstrakcije zasniva se na kretanju pare, stvorene ključanjem rastvarača, prema uzorku koji se nalazi unutar Sokslet ekstraktora. Temperaturu prilikom

ekstrakcije podešava analitičar, najčešće na temperaturu ključanja korišćenog rastvarača. U ovoj metodi, fino samljeven biljni materijal se stavlja na filter papir u obliku čaure, postavlja u Sokslet ekstraktor i uređaj sklopi. Rastvarač za ekstrakciju se nalazi u balonu koji se zagrijava. Nakon dostizanja temperature ključanja rastvarača, njegove pare prolaze kroz bočnu cijev do kondenzatora gdje se kondenzuje kada dođe u kontakt sa hladnom površinom. Kondenzovani rastvarač u obliku kapljica natapa biljni materijal i dolazi u kontakt sa njim. Kada površina rastvarača premaši maksimalnu visinu sifona, rastvarač koji sadrži ekstrakt se vraća sifonom u balon sa rastvaračem. Ovaj proces je kontinuiran i izvodi se sve dok se ne iscrpi biljni materijal (Azahar i sar., 2020, Patel i sar., 2021). Na slikama 2 i 3 je prikazana šema Sokslet aparature i Sokslet aparatura korišćena u ovom radu.

Prednost ove metode u odnosu na prethodno opisane metode je u tome što se mogu ekstrahovati veće količine biološki aktivnih komponenti, sa mnogo manjom količinom rastvarača, što je posebno značajno u pogledu ekonomičnosti. Međutim, Sokslet ekstrakcija traje dugo da bi se postigla visoka efikasnost ekstrakcije i nije pogodna za organska jedinjenja koja su termički nestabilna.



Slika 2. Sokslet aparaturna za ekstrakciju (Generalić, 2022)



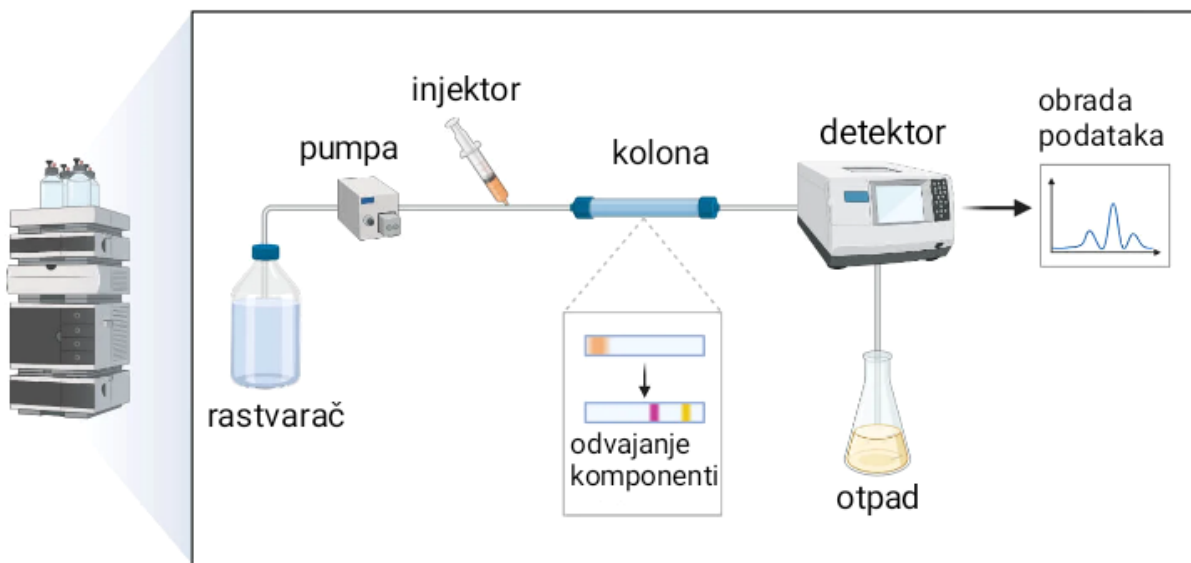
Slika 3. Sokslet ekstrakcija (Autor: Jovana Đurović)

## 2.4. TEČNA HROMATOHRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

HPLC je metoda visoke preciznosti, tačnosti, brzine, efikasnosti i veoma niskih granica detekcije. Tečna hromatografija visokih performansi je tehnika razdvajanja na koloni kojom se postiže razdvajanje komponenata iz uzoraka, pa čak i onih kompleksnijih. Osnovni cilj ove metode je visoka efikasnost u kratkom vremenskom periodu. Prednost ove metode je ta što analit ne mora da bude isparljiv. HPLC je samo jedna vrsta tečne hromatografije kod koje je mobilna faza tečnost. Kao mobilna faza mogu da se koriste smješe dva ili više rastvarača u koje se po potrebi može dodati i odgovarajući pufer ili druge pomoćne supstance koje utiču na brzinu i samu efikasnost razdvajanja. Mobilna faza je izložena djelovanju visokog pritiska, a taj visoki pritisak obezbjeđuje kontinuiran protok mobilne faze i dovodi do uspostavljanja ravnoteže (dinamičke) sa stacionarnom fazom pri čemu ta ravnoteža osigurava dobre i selektivne raspodjele komponenti u ispitivanom uzorku. Stacionarna faza je u koloni koja se obično izrađuje od nerđajućeg čelika (kako bi izdržale visok pritisak) i puni se česticama (veličine 3 do 5  $\mu\text{m}$ ) koje imaju veliku specifičnu površinu koja omogućava bolje razdvajanje komponenti (kao npr. silikagel, polietilen itd.) (Jovanov, 2014; Merkulov i sar., 2021; Ali, 2022).

Ubrizgava (injektuje) se mala zapremina uzorka u pokretni tok tečnosti (mobilna faza) koja prolazi kroz kolonu napunjenu česticama stacionarne faze. Razdvajanje smješe na komponente zavisi od različitog stepena zadržavanja svake komponente u koloni (odnosno različitoj raspodjeli između mobilne i stacionarne faze). Različito vrijeme zadržavanja je posledica različitih interakcija koje se javljaju između analita i stacionarne faze. Onaj analit koji ima najmanje interakcija sa stacionarnom fazom odnosno najviše interakcija sa mobilnom fazom će najbrže izaći iz kolone. Vrijeme zadržavanja (retenciono vrijeme-  $t_R$ ) je vrijeme od momenta injektovanja do momenta otkrivanja (Milošević, 2019).

HPLC instrumentacija obuhvata: rezervoar za rastvarač, pumpu, injektor, kolonu i detektor (slika 4).

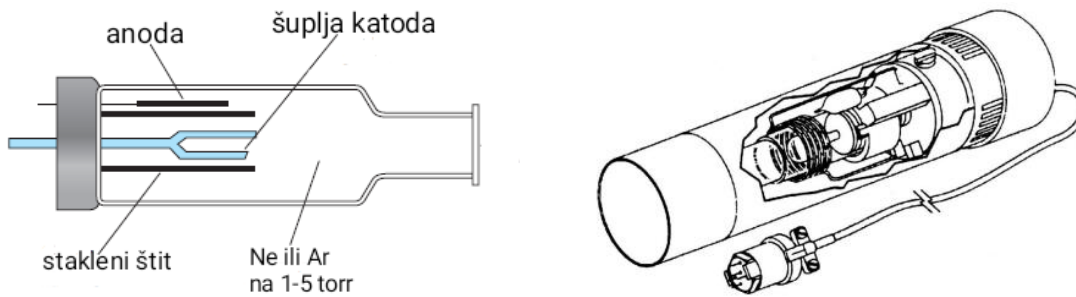


Slika 4. Tečni homatograf visokih performansi i njegovi djelovi (<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/#hplc-principle> )

## 2.5. ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROMETRIJA (AAS)

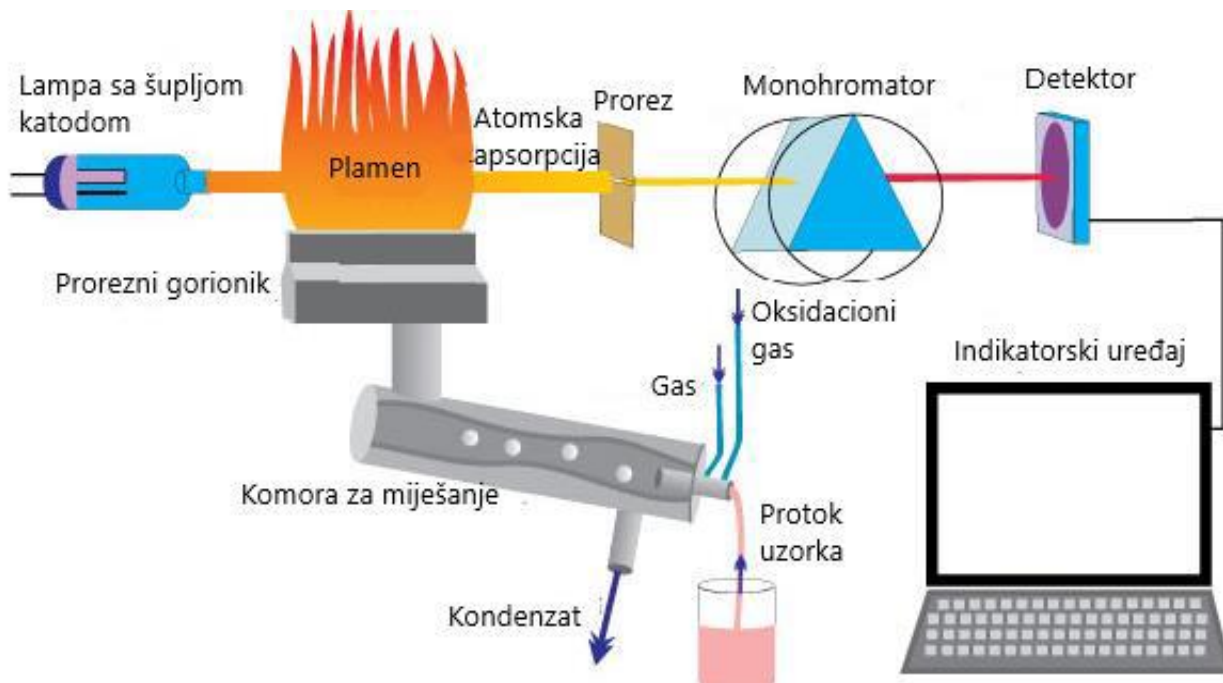
Atomska apsorpciona spektrometrija je apsorpciona metoda koja mjeri smanjenje intenziteta monohromatskog zračenja pri prolasku kroz atomsku paru uzorka. Kod ove metode uzorak se mora prevesti u atomsko stanje što se najčešće postiže sagorijevanjem ispitivanog uzorka u plamenu visoke temperature. Pri tome dolazi do disocijacije molekula na atome tj. dolazi do kidanja hemijske veze. Izborom odgovarajuće temperature postiže se da što veći broj atoma ostane u osnovnom (nepobuđenom) stanju, jer jedino atomi u takvom stanju imaju sposobnost da apsorbuju karakteristično zračenje. Atomi nekog elementa apsorbivaće samo onu energiju koja im omogućava prelaz sa nižeg na više energetske stanje. Najčešće korišćen izvor zračenja za atomsku apsorpcionu spektrometriju predstavlja lampa sa šupljom katodom, prikazana na slici 5. Sastoji se od volframove anode i cilindrične katode zapečaćene u staklenoj cijevi koja sadrži inertni gas, poput argona, pod pritiskom od 1 do 5 torr. Katoda je ili izrađena od metala analita ili služi kao oslonac za prevlaku tog metala (Đorđević i sar., 1982; Tomljanović, 2000; Holer i sar., 2013).

Prednosti ove metode su da omogućava direktno dobijanje rezultata, vremensko trajanje analize je kratko, velika specifičnost, da postoji mogućnost određivanja većeg broja elemenata iz jednog rastvora, postupak određivanja je relativno jednostavan.



Slika 5. Lampa sa šupljom katodom (Holer i sar., 2013)

Glavni dijelovi atomskog apsorpcionog spektrometra su: izvor zračenja, plamenik, monohromator i detektor (slika 6).



Slika 6. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektrometra (Chemistry, 2019)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ove master teze je urađen na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici, u laboratoriji za analitičku hemiju, laboratoriji za instrumentalne metode, laboratoriji za organsku hemijsku tehnologiju i u Institutu za proučavanje lekovitog bilja »dr Josif Pančić« u Beogradu. Kao materijal za analizu je korišćen plod šipurka (*Rosa canina* L.) koji je ubran u novembru 2022. godine u okolini Nikšića i Žabljaka. Plod šipurka i djelovi ploda (mesnati dio i sjemenke) su osušeni, samljevani i čuvani na sobnoj temperaturi na suvom mjestu. Na slici 7 je predstavljen svježi plod šipurka, odvojeni mesnati dio i sjemenke kao i izgled usitnjenog materijala nakon sušenja.



Slika 7. Šipurak: a) plod, b) mesnati dio i c) sjemenke šipurka prije sušenja i nakon sušenja usitnjeni

(Autor: Jovana Đurović)

### 3.1. HEMIKALIJE, INSTRUMENTI I APARATURE

Za ispitivanje fenolnog sadržaja šipurka, antioksidativnog kapaciteta i mikro i makroelemenata korišćeni su sledeći reagensi: acetatni pufer, hlorovodonična kiselina (35 %), 2,4,6-tripiridil-triazin (TPTZ; Alfa Aesar), gvožđe(III)-hlorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH; Aldrich Chemistry), natrijum-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , VWR Chemicals), glacijalna sirćetna kiselina (Zorka Šabac), Quercetin 95 % (Sigma Aldrich), galna kiselina (Merck, Darmstadt, Germany), Folin–Ciocalteu reagens (VWR chemicals), aluminijum(III)-hlorid heksahidrat ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , NRK Inženjering, Beograd), natrijum-karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Centrohem), pirogolol 99 % (ACROS organics i Thermo scientific), kožni prah (Sigma Aldrich), metanol, etanol 96 %, natrijum-nitrit  $\text{NaNO}_2$  (Centrohem), natrijum-hidroksid (NaOH, Centrohem), 30 % vodonik-peroksid (Centrohem).

Od instrumenata je korišćen BUCK Scientific 105 UV-VIS spektrofotometar, atomski apsorpcioni spektrometar Perkin Elmer (PinAAcle 900F), ultrazvučno kupatilo SONIC ViMS 4GT, HPLC Agilent Technologies 1200, aparatura za Sokslet ekstrakciju, sušnica.

### 3.2. PRIPREMA BILJNOG MATERIJALA

Osušeni plodovi, mesnati delovi i sjemenke šipurka (*Rosa canina* L.) iz okoline Nikšića i Žabljaka samljeveni su i čuvani na suvom mjestu do početka analize. Ekstrakcija je vršena sa cijelim plodom šipurka a korišćene su četiri metode ekstrakcije. Materijal je pripreman na sledeći način:

- 1) Za maceraciju: 10 g osušenih i samljevenih plodova je preliveno sa 200 mL 96,4 % etanola i ostavljeno na sobnoj temperaturi u zatvorenom erlenmajeru, zaštićeno od svetlosti. Maceracija je trajala pet dana uz svakodnevno miješanje 1-2 puta dnevno. Nakon toga je vršeno filtriranje, rastvarač je uparavan a ekstrakt je osušen do konstantne mase.
- 2) Za infuz ekstrakciju: 10 g osušenih i samljevenih plodova je preliveno sa 200 mL vruće vode i ostavljeno pokriveno da stoji 90 minuta na sobnoj temperaturi. Dobijeni infuz je profiltriran, uparavan i sušen do konstantne mase.
- 3) Za ultrazvučnu ekstrakciju: 10 g osušenih i samljevenih plodova je preliveno sa 200 mL 96,4 % etanola i stavljeno na ultrazvučno kupatilo u vremenu od 45 minuta na frekvenciji od 50 Hz i na sobnoj temperaturi. Nakon toga je vršeno filtriranje, a rastvarač je uparen i ekstrakt osušen do konstantne mase.



- 4) Za Sokslet ekstrakciju: 10 g osušenih i samljevenih plodova je stavljeno u čauru od filter papira i čaura ubačena u ekstraktor koji se sastavlja sa balonom i kondenzatorom. U balon je stavljeno 250 mL 96,4 % etanola, a cijela aparatura stavljena na grejno tijelo. Ekstrakcija je vršena na temperaturi ključanja rastvarača i odrađeno je 5 sifoniranja. Nakon toga je rastvarač uparen, a ekstrakt osušen do konstantne mase.

U tabeli 5 su dati prinosi ekstrakata suvih plodova šipurka iz okoline Nikšića i Žabljaka.

Tabela 5. Prinos ekstrakta (%) ploda šipurka dobijen različitim tehnikama ekstrakcije

<b>Metoda ekstrakcije</b>	<b>Nikšić</b>	<b>Žabljak</b>
Maceracija	17,540	18,898
Infuz ekstrakcija	31,349	32,774
Ultrazvučna ekstrakcija	13,294	14,446
Sokslet ekstrakcija	28,350	25,908

Prinos ekstrakata ploda šipurka se kretao od 13,294 % do 32,774 %. Primjećuje se da je najveći prinos dobijen korišćenjem infuz ekstrakcije za oba lokaliteta, a najmanji prinos korišćenjem ultrazvučne ekstrakcije.

### **3.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI, FENOLA, FLAVONOIDA, TANINA I ANTOCIJANA U PLODU, MESNATOM DIJELU, SJEMENKAMA I EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA**

#### **3.3.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti u plodu, mesnatom dijelu, sjemenkama i ekstraktima ploda šipurka**

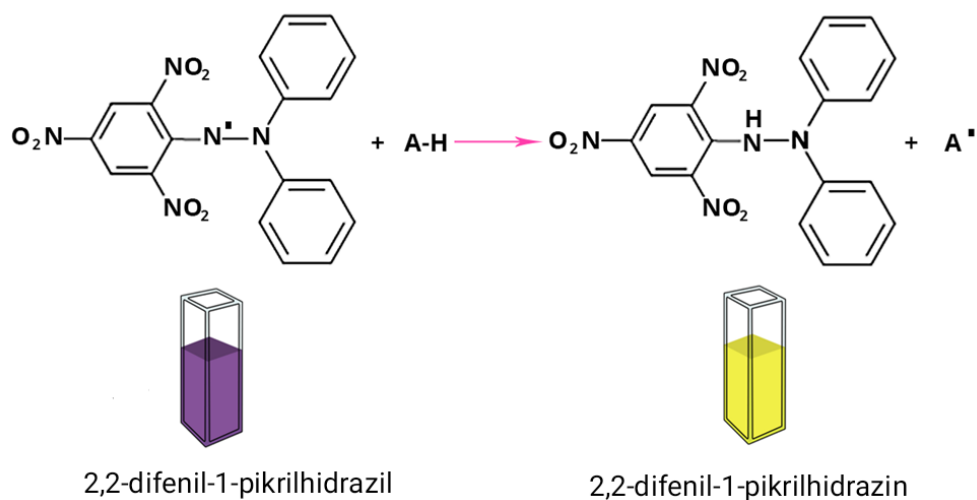
Značaj antioksidanata je povezan sa njihovom ulogom u smanjenju oštećenja ćelija tokom biološke oksidacije. Aktivnost antioksidanata u procesu uklanjanja slobodnih radikala pomažu u sprečavanju ili odlaganju oksidacije. Iako su slobodni radikali proizvodi ćelijskog metabolizma, prevelik broj slobodnih radikala u ćelijama dovodi do oksidativnog stresa, koji na kraju uzrokuje oštećenje biomakromolekula kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline (Perteši, 2014; Sabahi i sar., 2022).

Slobodni radikali su atomi, grupe atoma ili molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona na najudaljenijoj orbitali, pa su hemijski veoma reaktivni i imaju tendenciju da traže elektronske parove da bi mogli da se vezuju zbog postizanja stabilnosti. Slobodni radikali neprestano napadaju ćelije tijela uključujući normalne ćelije za dobijanje elektronskih parova. Slobodni radikali reaguju sa biološkim jedinjenjima u tijelu neprekidno a ako se ne zaustavi reakcija, mogu oštetiti tjelesne ćelije i imati štetan uticaj na zdravlje tijela. Da bi se zaustavilo negativno dejstvo slobodnih radikala potrebni su antioksidanti (sekundarna jedinjenja metabolita biljaka) kao što su fenolna jedinjenja koja predstavljaju prirodne antioksidante (Marjoni i sar., 2017). Postoje neka ograničenja za sintetičke antioksidante, kao što su teškoća njihove sinteze i neki toksični efekti. Uzimajući u obzir ova ograničenja, antioksidanti iz prirodnih izvora su korisniji (Sabahi i sar., 2022). Dalje, flavonoidi, fenolne kiseline, lignin, kumarin, tokoferoli, tanini, askorbinska kiselina se takođe smatraju dobrim antioksidantima (Marjoni i sar., 2017).

Antioksidativna aktivnost uzoraka korišćenih u ovom radu ispitana je uz korišćenje DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) testa.

## 1) DPPH TEST

DPPH test je test koji se zasniva na redukciji DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala do 2,2-difenil-1-pikrilhidrazina (slika 8). Aktivnost uklanjanja slobodnih radikala ili frakcija se određuje praćenjem inteziteta ljubičaste boje iz rasvora sa DPPH reagensom. DPPH<sup>•</sup> slobodni radikal reaguje sa antioksidantom. Antioksidant može donirati atom vodonika radikalumu DPPH (DPPH<sup>•</sup>) i na taj način smanjiti koncentraciju stabilnih slobodnih radikala (DPPH<sup>•</sup>), koji izazivaju promjenu boje od ljubičaste do žute (slika 9) (Veličković, 2013; Pregiban, 2017; Marjoni i sar., 2017).



Slika 8. Reakcija redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

(Izvor: <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>)



Slika 9. Promjena boje prilikom redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Autor: Jovana Đurović)

Procenat inhibicije DPPH je izračunat korišćenjem sledeće formule (Blois, 1958):

$$\% = 100 - \left[ (A_s - A_b) \cdot \frac{100}{A_c} \right]$$

gdje:

$A_s$  predstavlja apsorbancu etanolnih rastvora šipurka koji su prethodno tretirani DPPH rastvom (0,1 mM etanolni rastvor DPPH), mjerenu na  $\lambda=517$  nm,

$A_b$  predstavlja apsorbancu etanolnih rastvora šipurka koji nijesu prethodno tretirani DPPH rastvorom, mjerenu na  $\lambda=517$  nm,

$A_c$  predstavlja apsorbancu 0,1 mM etanolnog rastvora DPPH, mjerenu na  $\lambda=517$  nm.

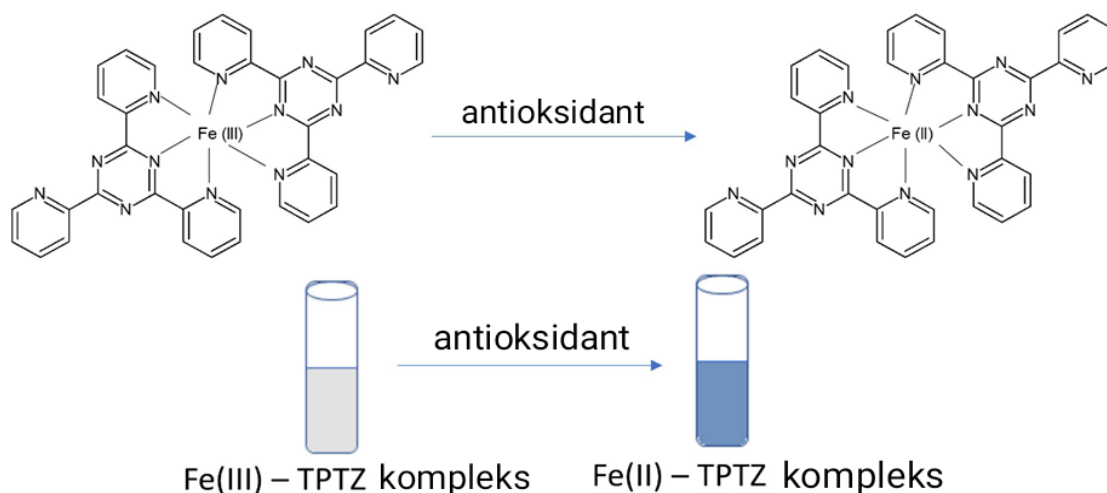
Dobijeni rezultati korišćenjem DPPH metode su izraženi kao IC<sub>50</sub> vrijednosti koje predstavljaju koncentraciju uzorka koji dovodi do 50% neutralizacije DPPH. Ta koncentracija se dobija pravljenjem zavisnosti između IC<sub>50</sub> vrijednosti i koncentracije uzorka (Rivero-Cruz i sar., 2020).

Dakle, vrši se spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti tako što se u 300 μL etanolnih rastvora uzoraka šipurka (različitih koncentracija) doda po 2700 μL 0,1 mM rastvora DPPH, i nakon pola sata čuvanja na tamnom mjestu izmjeri apsorbancu na λ=517 nm, koristeći 70 % etanol kao slijepu probu.

## 2) FRAP TEST

FRAP reagens sadrži različite rastvore, uključujući TPTZ (tripiridil-triazin) rastvor, 40 mM HCl, FeCl<sub>3</sub> i acetatni pufer. Svježi FRAP reagens (koji se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ rastvora u 40 mM HCl, 2,5 mL 20 mmol/L rastvora FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) je pripremljen i inkubiran na 37 °C u sušnici u vremenu od 30 minuta. Istovremeno u 100 μL etanolnih rastvora uzoraka šipurka (različite koncentracije) je dodato 3 mL svježe pripremljenog FRAP rastvora. Nakon pola sata stajanja u sušnici na 37 °C mjerena je apsorbancu na λ=593 nm, uz slijepu probu za koju se koristi smješa od 100 μL 70 % etanola i 3 mL FRAP rastvora.

Feri-TPTZ (feri-2,4,6-tripiridil-s-triazina) kompleks se uz pomoć antioksidanta redukuje u fero-TPTZ kompleks (gdje se dešava transfer elektrona). Stepenn redukcije se mjeri povećanjem inteziteta plave boje sa maksimumom apsorbpcije na λ=593 nm (Pavlović, 2012). Na slici 10 je prikazana reakcija redukcije ferri-TPTZ kompleksa.



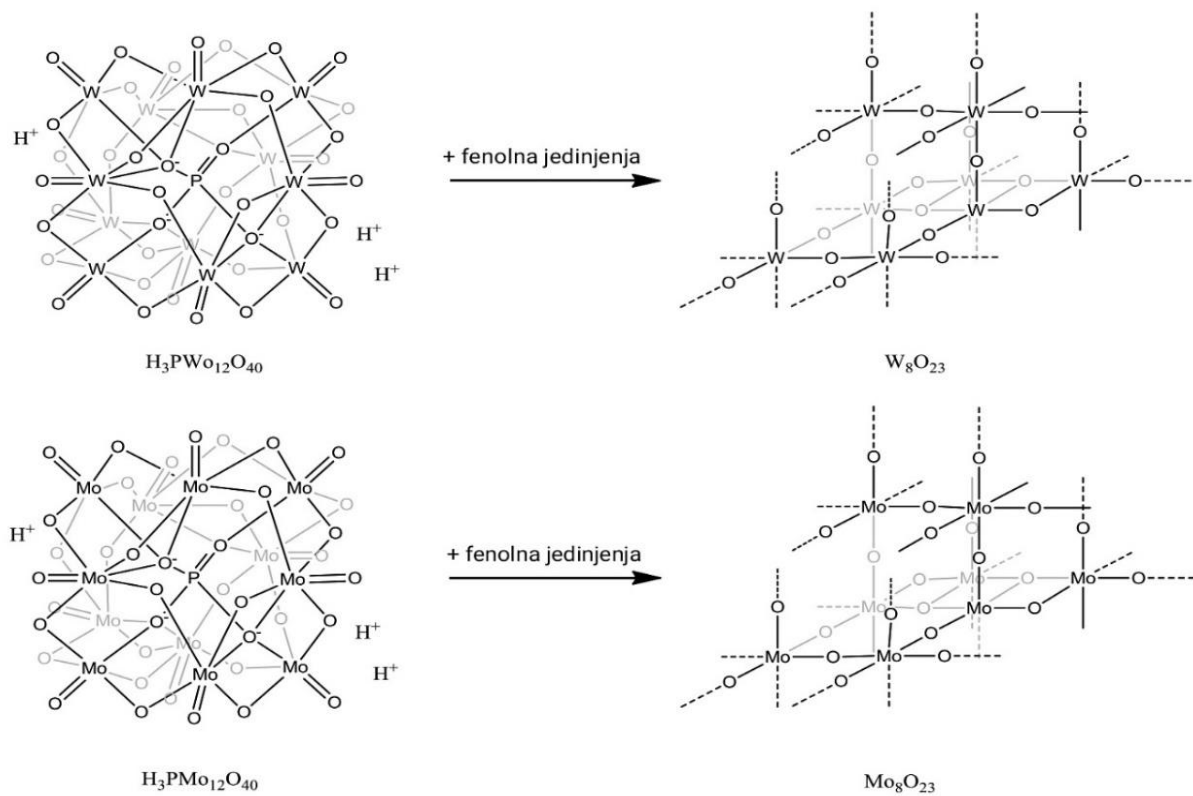
Slika 10. Reakcija redukcije Fe (III)-TPTZ kompleksa (Wojtunik-Kulesza, 2020)

Serijski standardni rastvori gvožđa su pravljena od  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  u FRAP reagensu u opsegu koncentracija 100-1000  $\mu\text{mol/L}$  i korišćena za konstrukciju kalibracione krive. Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  (Benzie i Strain, 1999).

### **3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u plodu, mesnatom dijelu, sjemenkama i ekstraktima ploda šipurka**

Sadržaj ukupnih fenola je određivan pomoću Folin-Ciocalteu (FC) metode koja se zasniva na redukciji Folin-Ciocalteu reagensa koji predstavlja smjesu fosfomolibdenske ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) i fosfovolframove kiseline ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) koje su žute boje. FC test se oslanja na transfer elektrona u alkalnoj sredini, od fenolnih jedinjenja do kompleksa fosfomolibdenske/fosfovolframne kiseline. Ovaj reagens (Folin-Ciocalteu) se redukuje u smjesu volfram-oksida ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) i molibden-oksida ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) dok oksiduje fenolna jedinjenja, nakon čega rastvor postaje plav (slika 12), a intenzitet boje je proporcionalan sadržaju fenolnih jedinjenja u uzorku (odnosno, fenolna jedinjenja rastvorena u vodi i drugim organskim rastvaračima formiraju obojeni-plavi kompleks sa Folin Ciocalteu reagensom u alkalnoj sredini) i određuje se spektrofotometrijski (Bancuta i sar., 2016; Ford i sar., 2019). Fenolna jedinjenja imaju odbrambenu ulogu u biljci i pomažu u prilagođavanju i preživljavanju u nepovoljnim uslovima, a njihova sinteza je povećana u uslovima kada je biljka izložena stresu (Lovrić, 2014). Na slici 11 je prikazana specifična reakcija Folin-Ciocalteu reagensa sa fenolnim jedinjenjima.

Rastvori koji su korišćeni za određivanje fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima u ovom spektrofotometrijskom testu jesu: 7,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i Folin-Ciocalteu reagens, pri čemu je kao slijepa proba upotrijebljena smjesa destilovane vode, FC reagens i 7,5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Apsorbanca je mjerena na  $\lambda=740$  nm.

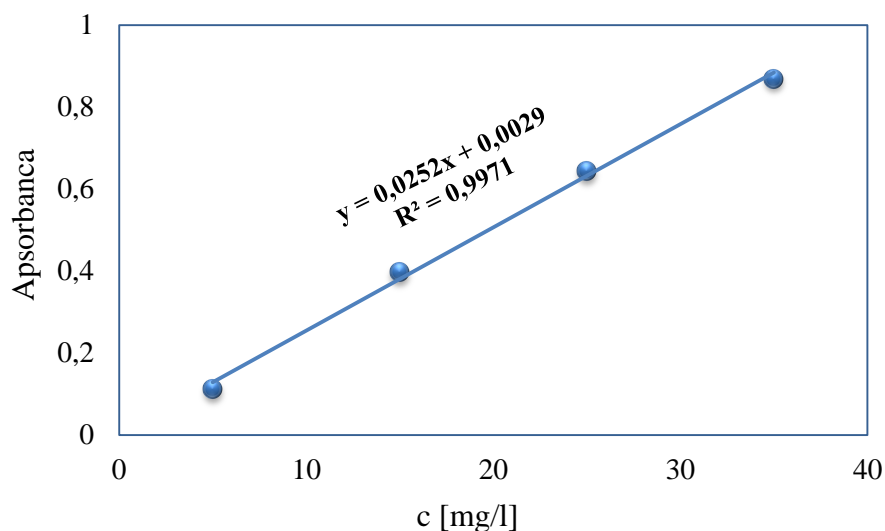


Slika 11. Specifična reakcija Folin-Ciocalteu reagensa sa fenolnim jedinjenjima (Bancuta i sar., 2016)



Slika 12. Plavo obojenje prilikom određivanja sadržaja ukupnih fenola (Autor: Jovana Đurović)

Za izradu kalibracione krive korišćena je galna kiselina. Pravljena je serija standardnih rastvora u opsegu koncentracija 0-40 mg/L i očitana apsorbanca na  $\lambda=740$  nm. Na slici 13 je prikazana je kalibraciona kriva koja je korišćena za određivanje sadržaja fenola.

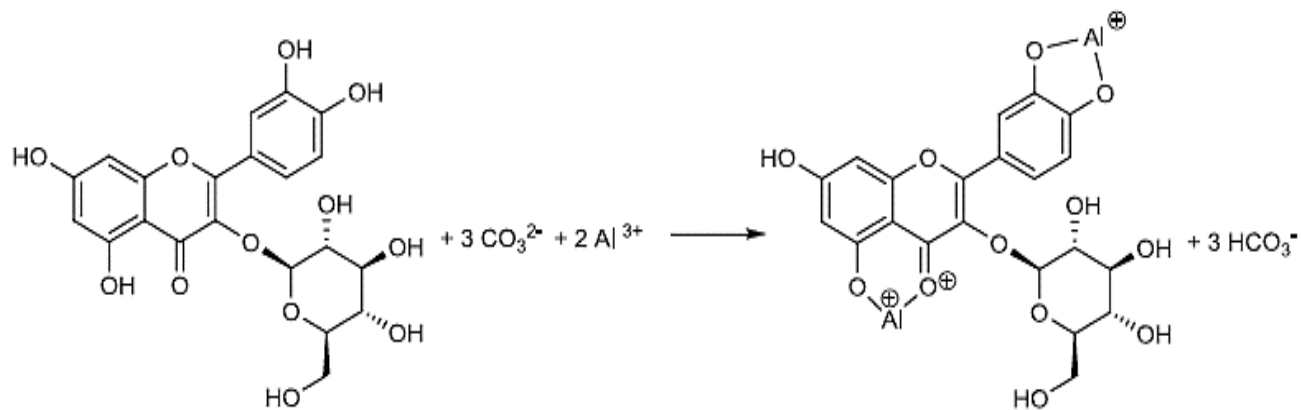


Slika 13. Kalibraciona kriva za određivanje fenola

Na osnovu izmjerenih apsorbanci, iz kalibracione krive se određuje koncentracija fenolnih jedinjenja korišćenjem jednačine prave:  $y=0,0252x+0,0029$ , a ukupan sadržaj fenola u ispitivanim uzorcima u ovom radu je izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline na 100 g osušenog biljnog materijala/suvog ekstrakta (mg GAE/100 g  $\pm$  standardna devijacija).

### 3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Za određivanje flavonoida korišćen je spektrofotometrijski test, koji se zasniva na formiranju kompleksa između aluminijum jona i karbonilnih i karboksilnih grupa flavonoida (Roman i sar., 2013). Na slici 14 je prikazana reakcija između  $Al^{3+}$  i izokvercetina.

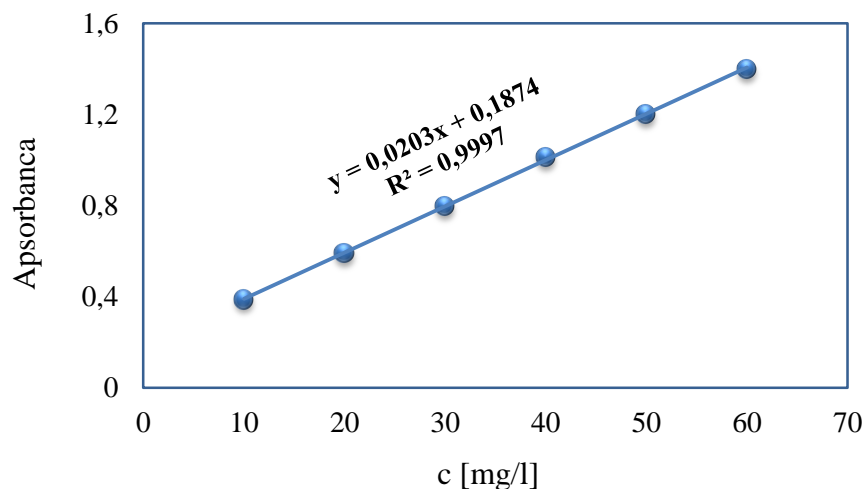


Slika 14. Reakcija  $Al^{3+}$  sa izokvercetinom (molekuli vode u kompleksu sa  $Al^{3+}$  su izostavljeni)

(Krstić, 2017)

Za određivanje sadržaja flavonoida korišćena je metoda koja je opisana u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0 (Council of Europe, 2016). Sadržaj flavonoida određivan je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum-hloridom uz određene modifikacije (Brašanac-Vukanović i sar., 2018). Rastvori koji su korišćeni prilikom ovog određivanja su: 1 %  $\text{AlCl}_3$ , 5 %  $\text{NaNO}_2$  i  $1 \text{ mol/dm}^3$   $\text{NaOH}$ . Nakon pripreme uzoraka očitane su vrijednosti apsorbanci na  $\lambda = 415 \text{ nm}$ , korišćenjem destilovane vode kao slijepe probe.

Za izradu kalibracione krive korišćen je kvercetin, pravljena je serija standardnih rastvora (opseg koncentracija 10-80 mg/L) i očitana apsorbance na  $\lambda = 415 \text{ nm}$ , koristeći destilovanu vodu kao slijepu probu. Na slici 15 je prikazana kalibraciona kriva koja je korišćena za određivanje sadržaja flavonoida.



Slika 15. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja flavonoida

Na osnovu izmjerenih apsorbanci, iz kalibracione krive određuje se koncentracija flavonoida korišćenjem jednačine prave:  $y = 0,0203x + 0,1874$ , a sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima ispitivanim u ovom radu je izražen kao mg ekvivalenta kvercetina na 1 g osušenog biljnog materijala/suvog ekstrakta ( $\text{mg Qc/g} \pm$  standardna devijacija).

### 3.3.4. Određivanje sadržaja tanina

Tanini su polifenolna jedinjenja rastvorljiva u vodi koja se između ostalog nalaze u određenoj mjeri i u šipurku. Mogu se grubo podijeliti na hidrolizujuće, složene i kondenzovane tanine. Hidrolizujući tanini se hidrolizuju zagrijavanjem sa razblaženom kiselinom ili enzimima, kao što je tanaza, da bi se



proizveli jednostavni molekuli, kao što su galna kiselina, elaginska kiselina i pirogalol. Mogu se klasifikovati na galotanine i elagitanine. Kondenzovani tanini se biosintetišu iz katehina i antocijanidina. Procijanidin B<sub>2</sub>, proantocijanidin A<sub>1</sub> i proantocijanidin C<sub>1</sub> su primjeri kondenzovanih tanina. Kondenzovani tanini, poznati kao proantocijanidini, široko su rasprostranjeni u biljkama i snažno utiču na kvalitet hrane. Oni su polimeri od 2–50 (ili više) flavonoidnih jedinica, koji nijesu podložni hidrolizi. Neki veoma veliki kondenzovani tanini su nerastvorljivi, dok su tanini koji se hidrolizuju i većina kondenzovanih tanina rastvorljivi u vodi. Sva fenolna jedinjenja su veoma nestabilna i brzo se transformišu u različite produkte reakcije kada se biljne ćelije oštete. Tanini u ustima izazivaju snažan osećaj oporosti (ili oporog ukusa). Smatra se da se tanini vezuju za proteine u jeziku i sluzokoži u usnoj duplji i potom izazivaju njihovu denaturaciju. Ovakav tip denaturacije proteina u oralnoj sluzokoži taninima naziva se efekat skupljanja. Smatra se da je oporost usko povezana sa bolom i taktilnim osjećajem koji nastaje denaturacijom proteina. Da bi se osjetio adstringentni efekat tanina, oni moraju biti rastvoreni u pljuvački. Shodno tome, povećanje molekulske težine polimerizacijom uzrokuje nedostatak oporosti zbog nerastvorljivosti tanina. Kondenzovani tanini se sastoje od polimera visoke molekulske mase (~15 000) formiranog od katehina (Izawa i sar., 2010, Mukherjee, 2019).

Za određivanje sadržaja tanina koristili su se Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (290 g/L), FC reagens, pirogalol, kožni prah. Pripremaju se tri vrste rastvora: za ukupne polifenole, za polifenole koji se ne apsorbuju na kožni prah i standard. Nakon pripreme i određenog vremena stajanja na sobnoj temperaturi očita se apsorbancu na λ=760 nm, koristeći destilovanu vodu kao slijepu probu. Nakon toga se po formuli računa procenat tanina u uzorcima.

Metoda određivanja sadržaja tanina je opisana u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. (Council of Europe, 2016).

Sadržaj tanina izražen kao procenat pirogalola, izračunat je pomoću formule:

$$\% TAN = \frac{62,5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

gdje:

A<sub>1</sub> predstavlja apsorbancu ukupnih polifenola u uzorcima mjerenu na λ=760 nm,

A<sub>2</sub> predstavlja apsorbancu polifenola koji se ne apsorbuju na kožni prah mjerenu na λ=760 nm,

A<sub>3</sub> predstavlja apsorbancu pirogalola mjerenu na λ=760 nm,

$m_1$  predstavlja masu ispitivanih uzoraka sjemenki, mesnatih djelova i plodova, kao i masu suvog ekstrakta u gramima,

$m_2$  predstavlja masu pirogalola u gramima.

### 3.3.5. Određivanje sadržaja antocijana

Antocijani čine važnu grupu biljnih pigmenata. Oni su rastvorljivi u vodi i pripadaju porodici flavonoida. Postoji više od 500 različitih antocijana. Ovi pigmenti daju biljkama, cvijeću i voću, boje u rasponu od ružičaste preko grimizne (ljubičastocrvene), ljubičaste i plave. Antocijanini se posebno nalaze u voću kao što su grožđe, crne bobice, jagode i maline. U kiselom stanju, antocijanin se pojavljuje kao crveni pigment, dok plavi pigment antocijanin postoji u alkalnim uslovima. Takođe se zove flavilijum (2-fenilhromnilijum) jon. Stabilnost antocijanina zavisi od pH vrijednosti, svjetlosti, temperature i njegove strukture. Pored toga što su moćni antioksidansi, antocijanini takođe posjeduju antiinflamatorna, antimikrobna i antikancerogena svojstva. Antocijani su poznati kao prirodni antioksidansi zbog svoje sposobnosti da doniraju protone visoko reaktivnim slobodnim radikalima. Antocijani se mogu koristiti za prevenciju nekoliko bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, dijabetes, neke metaboličke bolesti i mikrobne infekcije (Sudhakar i sar., 2016; Khoo i sar., 2017; Varelis i sar., 2018).

Sadržaj antocijana u šipurku je vrlo nizak i u slučaju šipurka boja potiče od pigmenata karotenoida. Ukupan sadržaj antocijana u ispitivanim uzorcima u ovom radu je određen smješom MeOH/HCl, po metodi koja je opisana u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. (Council of Europe, 2016). Intenzitet apsorbcije je izmjeren na talasnoj dužini od 528 nm.

Procenat antocijana izražen preko cijanidin-3-glukozid hlorida, izračunat je pomoću sledeće formule:

$$\% \text{ ANT} = \frac{A \cdot 5000}{718 \cdot m}$$

gdje:

$A$  predstavlja apsorbciju uzorka snimljenu na  $\lambda=528$  nm, a

$m$  predstavlja masu uzorka sjemenki, mesnatog dijela ili ploda šipurka.

### **3.4. ODREĐIVANJE METALA U PLODU, MESNATOM DIJELU, SJEMENKAMA I EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA**

Atomska apsorpciona spektrometrija je idealna metoda kontrole niskih koncentracija (tragova) metala u biološkim materijalima. Metali kao što su Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu, Cr, Co i Mn su pri određenim koncentracijama esencijalni, dok su Pb, As, Cd, Ni i Hg toksični čak i pri vrlo niskim koncentracijama. Metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS) se određuje nepoznata koncentracija metala na osnovu mjerenja apsorpcije monohromatskog zračenja određene talasne dužine od strane slobodnih atoma ispitivanog elementa. Danas se AAS koristi za određivanje velikog broja elemenata, kako u rastvorima (što je najčešći primjer) tako i u čvrstim uzorcima različite prirode, u koncentracionom opsegu od  $\mu\text{g/mL}$  do  $\mu\text{g/L}$  i nižem (Kunno i sar., 2009).

Određivanje nepoznate koncentracije metala zasniva se na pravljenju kalibracione krive (zavisnost apsorbanca od koncentracije) iz koje se može očitati vrijednost nepoznate koncentracije.

Postupak pripreme koji je korišćen za određivanje bakra, cinka, gvožđa, mangana, olova i nikla, u uzorcima koji su ispitivani u ovom radu, jeste mokra digestija. Izmjeren je 1,0 g ispitivanog uzorka i dodato 8 mL  $\text{HNO}_3$  c.c., poklopljeno sahatnim staklom i ostavljeno 24 h. Nakon toga je dodato 1-2 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  i zagrijavano na temperaturi na kojoj smješa ne ključa. Zatim je profiltrirano u normalni sud od 25 mL i dopunjeno destilovanom vodom do crte. Na ovaj način su pripremljeni uzorci za ispitivanje spremni (Wei i sar., 2005).

Za svaki određivani metal napravljena je serija standardnih rastvora određene koncentracije, nacrtana baždarna kriva iz koje su određivane koncentracije metala u uzorcima. Za analizu je korišćen atomski apsorpcioni spektrometar Perkin Elmer (PinAAcle 900F).

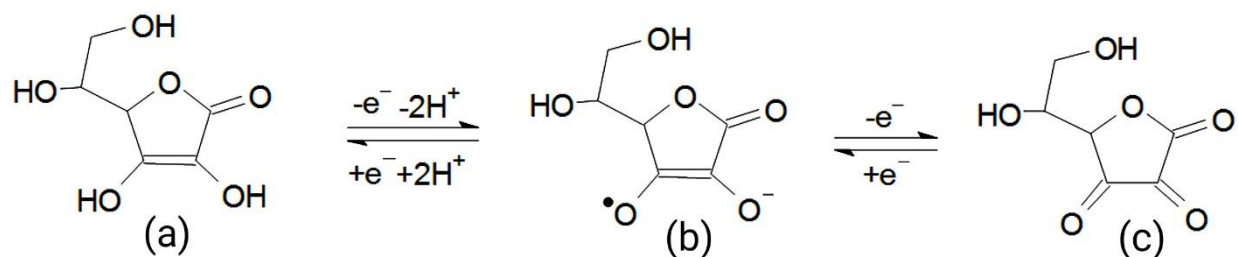
### **3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VITAMINA C U EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA DOBIJENIM RAZLIČITIM PROCESIMA EKSTRAKCIJE**

Većina metoda za određivanje vitamina C se zasniva na primjeni spektrofotometrijskih, fluorimetrijskih i hromatografskih tehnika koje odgovaraju zahtjevima određene analize. Do danas su poznate sledeće metode:

- spektrofotometrijske,
- fluorimetrijske,

- fotometrijske,
- kolorimetrijske,
- titrimetrijske,
- maseno-spektrometrijske,
- hromatografske (HPLC sa elektrohemijским detektorom, sa ultraljubičastim detektorom),
- enzimske,
- hemiluminiscentne i fluorescentne,
- AOAC metoda (Association of Official Analytical Chemist method) (Arya i sar., 1998; Washko i sar., 1992; Zaporozhets i sar., 2002; Erenturk i sar., 2005; Sheraz i sar., 2007; Nojavan i sar., 2008; Adamczak i sar., 2012; Tumbaš i sar., 2012; Paunović i sar., 2014; Czyzowska i sar., 2014; Nađpal i sar., 2016; Seifi i sar., 2017; Stanić, 2017; Sabahi i sar., 2022; Bosilj, 2022).

Vitamin C je redukciono sredstvo koje se može odrediti i postupkom direktne titracije standardnim rastvorom joda. Jodimetrijska metoda se zasniva na oksido-redukciji askorbinske kiseline (slika 16). Indikator koji je korišćen u ovom procesu jeste skrob (1 % rastvor skroba) koji sa jodom gradi intenzivno plavo obojen rastvor. Pošto molekul L-askorbinske kiseline gubi dva elektrona onda je molski odnos sa jodom 1:1 (Jelikić-Stankov i sar., 2010).



Slika 16. Askorbinska kiselina i njeni oksidacioni proizvodi: a) L-askorbinska kiselina, b) askorbatni radikal, c) dehidroaskorbinska kiselina (Truffault i sar., 2014)

### **3.6. IDENTIFIKACIJA FENOLNIH JEDINJENJA HPLC METODOM**

Hromatogrami ispitivanih uzoraka kao i kvantifikacija identifikovanih sastojaka urađena je na aparatu HPLC Agilent Technologies 1200. Detekcija je vršena uz pomoć DAD (detektor sa nizom dioda). Separacija komponenti postignuta je pomoću LiChrospher 100 RP 18e (5 µm), 250x4 mm kolona sa protokom 1 mL/min i mobilnim fazama A [500 mL H<sub>2</sub>O plus 9,8 mL 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (w/w)], B (MeCN). Uzorci određenih koncentracija su filtrirani kroz PTFE filter prije HPLC analize. Injektovana zapremina uzorka je bila 4 µL. Standardni rastvori individualnih fenolnih jedinjenja pripremani su u etanolu. Injektovana zapremina je bila ista kao i zapremina ispitivanih ekstrakata. Identifikacija je vršena na osnovu retencionih vremena i poklapanja spektara. Kvantifikacija je vršena metodom eksternog standarda.

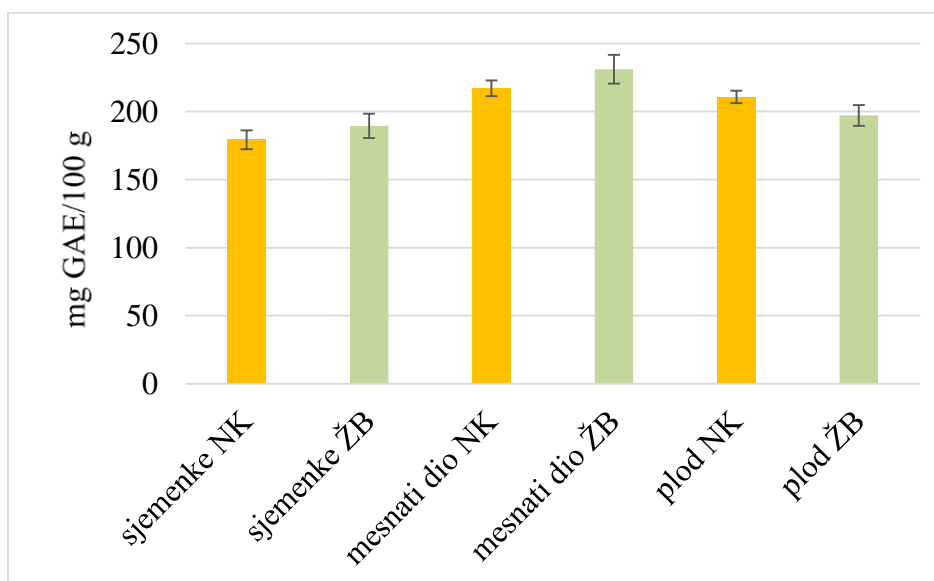
### **3.7. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Prilikom određivanja mikroelemenata u ispitivanim uzorcima osušenog ploda šipurka i ekstrakata ploda šipurka, 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 osušenog ploda šipurka i ekstrakata ploda šipurka je izvršena pomoću programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODOVA I RAZLIČITIH EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA

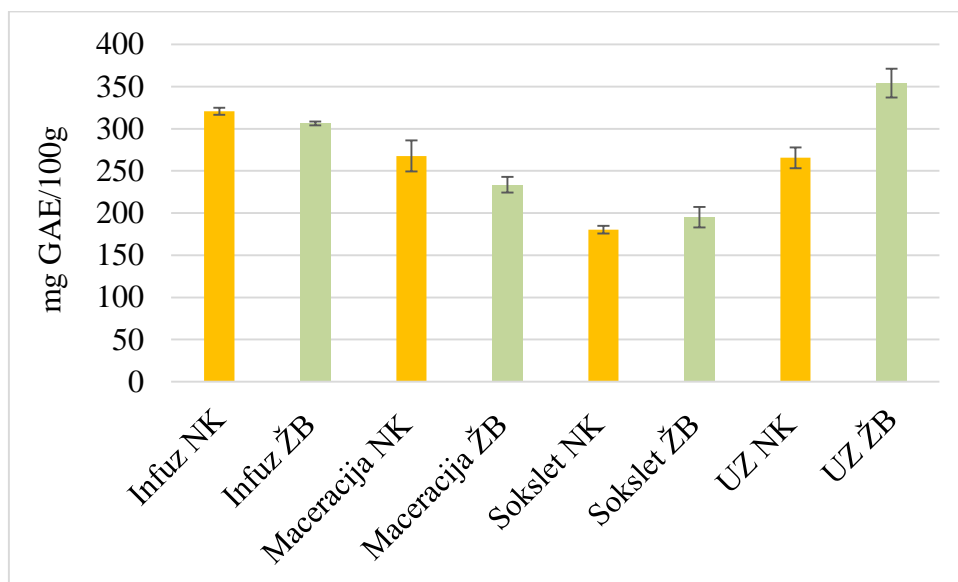
U ovom master radu sadržaj ukupnih fenola je određen iz suvih sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka kao i iz ekstrakata ploda šipurka dobijenih maceracijom, infuz, ultrazvučnom i Sokslet ekstrakcijom. Rezultati ukupnih fenola su izraženi u mg GAE/100 g biljke (ploda, sjemenki ili mesnatog dijela), odnosno u mg GAE/100 g suvog ekstrakta (kada su u pitanju ekstrakti). Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti±standardna devijacija, a sva mjerenja su rađena tri puta. Sadržaj ukupnih fenola je prikazan na grafikonima 1 i 2.



Grafikon 1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB)

Na osnovu podataka iz grafikona 1, kada su u pitanju suvi uzorci ploda, mesnati djelovi i sjemenke šipurka, uočava se da najviše fenola ima mesnati dio šipurka (za ŽB: 231,08±10,58 mg GAE/100 g, zatim mesnati dio NK: 217,08±5,73 mg GAE/100 g), a da najmanje fenola ima u sjemenkama šipurka (ŽB: 189,46±8,91 mg GAE/100 g, NK: 179,39±6,96 mg GAE/100 g). Međutim, ta razlika nije velika

(oko 1,2 puta ima više ukupnih fenolnih jedinjenja u mesnatom dijelu nego u sjemenkama, u oba uzorka), i sjemenke šipurka imaju značajan sadržaj ovih jedinjenja.



Grafikon 2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima ploda šipurka

Iz priloženih rezultata (grafikon 2) se uočava da se najviše fenola ekstrahovalo ultrazvučnom ekstrakcijom kada je u pitanju uzorak sa Žabljaka (354,11±16,98 mg GAE/100 g s.e.), a infuzom kada se radi o uzorku iz Nikšića (320,63± 4,25 mg GAE/100 g s.e.). Najmanji sadržaj fenola je dobijen ekstrakcijom po Soksletu, za NK: 180,40±4,53 mg GAE/100 g s.e., ŽB: 195,02±12,07 mg GAE/100 g s.e.

U radu Polumackanycz i sar. (2020) se sadržaj fenola u vodenom ekstraktu šipurka kretao od 33,63 do 177,05 mg GAE/g, a u hidrometanolnom ekstraktu od 21,4 do 48,97 mg GAE/g za uzorke sa teritorije Poljske. U poređenju sa rezultatima iz ovog master rada uočava se da su Polumackanycz i sar. dobili mnogo više vrijednosti. Takođe, u radu Rovná i sar. (2020) je pokazano da se sadržaj fenola u plodu šipurka iz Slovačke kreće od 2,61 do 6,33 mg GAE/g, što je značajno veći sadržaj nego kada su u pitanju uzorci iz ovog master rada.

Latinović i sar. (2020) su vršili određivanja sadržaja fenola iz suvog i svježeg šipurka sa teritorije Bosne i Hercegovine i dobili sledeće rezultate: za suvi šipurak 22,01 mg GAE/g a za svježi 8,75 mg GAE/g, što ukazuje da se veći sadržaj fenola nalazi u osušenom šipurku, a u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom master radu za plod iz NK 210,8 mg GAE/100 g i ŽB 197,2 mg GAE/100 g sa rezultatima iz rada Latinović i sar. (2020) za suvi šipurak 22,01 mg GAE/g uočava se da je veći sadržaj fenola određen u uzorcima iz Bosne i Hercegovine. Anđelković (2016) je ispitivanjem ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.) na sadržaj ukupnih fenola dobila vrijednost 218,18 i 1223,94

mg GAE/kg, respektivno. Bajić-Ljubičić (2018) je ispitivanjem različitih uzoraka šipurka sa teritorije Srbije na sadržaj fenola došla do rezultata koji su se kretali u granicama od 5,11 do 6,11 mg GAE/g, što je za skoro tri puta više od vrijednosti sadržaja fenola dobijenih u ovom master radu.

Za ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom (korišćenjem vode, etanola, metanola kao rastvarača) İlbay i sar. (2013) su dobili rezultate za sadržaj fenola od 2,25 do 7,54 mg GAE/g, što ukazuje da se rezultati iz ove master teze slažu sa rezultatima navedenim u ovom naučnom radu (UZ NK: 265,58 mg GAE/100 g s.e. i UZ ŽB: 354,11 GAE/100 g s.e.). I Tahirović i sar. (2017) su određivali sadržaj fenola u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom uz korišćenje različitih rastvarača: voda, 50 % etanol, 80 % etanol, 50 % metanol, 80 % metanol i dobili su sadržaj fenola 69,05; 72,69; 35,89; 78,83; 51,19 mg GAE/g, respektivno. Uočava se da je sadržaj fenola koji su prijavili Tahirović i sar. (2017) značajno veći od sadržaja fenola za ultrazvučne ekstrakte plodova šipurka iz Nikšića i sa Žabljaka koji su iznosili  $265,58 \pm 12,29$  i  $354,11 \pm 16,98$  mg GAE/100 g s.e., redom. Ispitivanjem ekstrakta dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom bavili su se i Koraqi i sar. (2022), pri čemu su mijenjali vrijeme ekstrakcije i zapreminu 40 % etanola kao rastvarača. Vrijeme ultrazvučne ekstrakcije ima dominantan uticaj na ekstrakciju fenola iz šipurka. Povećanje vremena dovodi do poboljšanja ekstrakcije ukupnih fenola, gdje dolazi do brzog razaranja ćelija zbog porasta temperature. Što se tiče uticaja količine rastvarača za ekstrakciju iz biljke, primijećeno je da povećanje količine rastvarača blago utiče na povećanje prinosa fenola. Sadržaj fenola u ovim uzorcima se kretao od 92,94 do 106,72 mg GAE/g (uzorci šipurka sa teritorije Kosova), što predstavlja oko tri puta manju vrijednost od vrijednosti dobijene u ovoj master tezi.

İlbay i sar. (2013) su vršili određivanje sadržaja fenola u ekstraktima šipurka sa teritorije Turske koji su dobijeni Sokslet ekstrakcijom. Koristili su 100 % etil-akohol kao rastvarač i našli u ekstraktima 14,46 mg GAE/g, što je značajno veće u poređenju sa rezultatima u ovom radu prikazanim na grafikonu 2, Sokslet NK: 180,40 mg GAE/100 g s.e., Sokslet ŽB: 195,02 mg GAE/100 g s.e.

Mihaylova i sar. (2015) su određivali sadržaj fenola (u uzorcima sa teritorije Bugarske) u infuz ekstraktima i dekoktima, dobijeni su rezultati u granicama 12,07-18,93 mg GAE/g suvog ekstrakta (za infuz ekstrakte) i 25,64-37,17 mg GAE/g suvog ekstrakta (za dekokte). U ovom master radu su dobijeni rezultati za infuz ekstrakte u vrijednosti 320,63 (NK) i 306,31 mg GAE/100 g s.e. (ŽB), dok su Montazeri i sar. (2011) vodenom ekstrakcijom (uzorci ploda šipurka sa teritorije Irana) dobili rezultat od 220,2 mg GAE/g ekstrakta, što je približno rezultatima iz ovog master rada. Nađpal (2017) je ispitala sadržaj fenola u metanolnom ekstraktu svježeg ploda sa područja Srbije, metanolnom ekstraktu suvog ploda, vodenom ekstraktu svježeg ploda, vodenom ekstraktu suvog ploda, ekstraktu

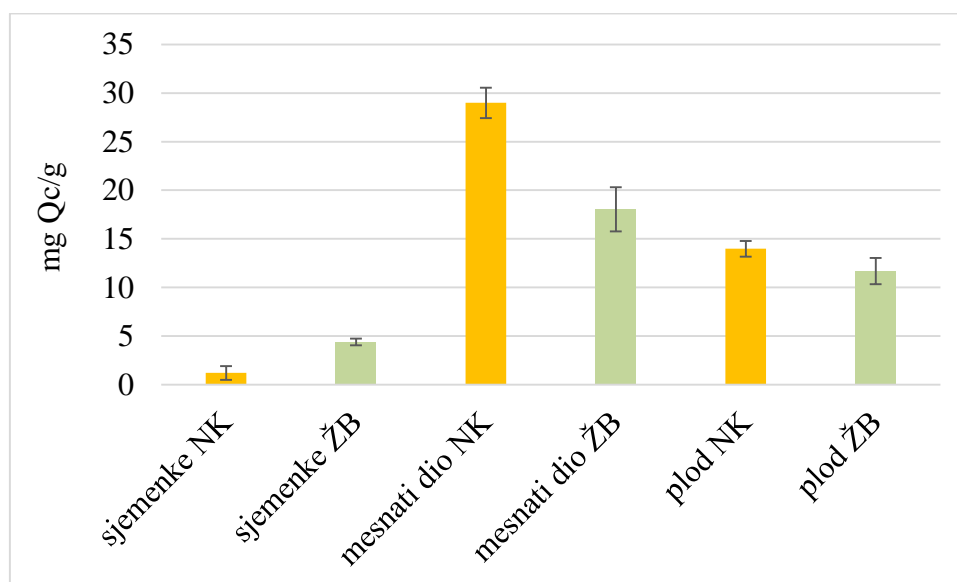


voćne kaše; rezultati su se kretali od 11,9 do 96,2 mg GAE/g s.e, što je značajno više od rezultata dobijenih u ovom master radu.

Pregledom dostupne literature nijesu nađeni podaci o ispitivanju ukupnih fenola u sjemenkama i mesnatom dijelu ploda šipurka, tako da nije bilo moguće porediti rezultate dobijene u ovom radu sa literaturnim podacima.

#### 4.2. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I RAZLIČITIH EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA

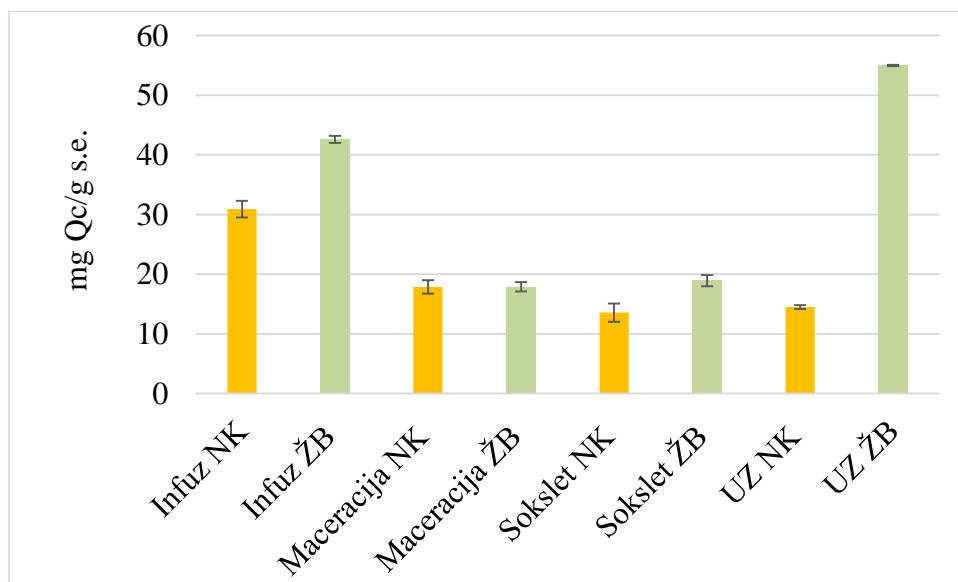
Sadržaj ukupnih flavonoida je određen u suvim sjemenkama, mesnatom dijelu i plodu šipurka iz Nikšića i sa Žabljaka kao i u ekstraktima dobijenim maceracijom, infuz, ultrazvučnom i Sokslet ekstrakcijom plodova šipurka. Rezultati ukupnih flavonoida su izraženi u mg Qc (kvercetina) po 1 g biljke odnosno u mg Qc/g suvog ekstakta (kada su u pitanju ekstrakti). Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti±standardna devijacija, a sva mjerenja su rađena tri puta. Sadržaj ukupnih flavonoida je prikazan na grafikonima 3 i 4.



Grafikon 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB)

Kada se uporede rezultati dobijeni za sadržaj flavonoida iz suvih čvrstih uzoraka šipurka (grafikon 3) uočava se da je najviši sadržaj flavonoida nađen u mesnatom dijelu (sa oba lokaliteta: NK 28,99±1,57 mg Qc/g i ŽB 18,05±2,27 mg Qc/g), zatim u samom plodu, a najmanje u sjemenkama (NK 1,21±0,71 mg Qc/g i ŽB 4,40±0,35 mg Qc/g). Uočava se da u mesnatom dijelu šipurka iz Nikšića ima oko 1,5 puta više flavonoida nego u mesnatom dijelu šipurka sa Žabljaka. Takođe, je uočeno da je mnogo veća razlika u sadržaju flavonoida između mesnatog dijela i sjemenki u šipurku iz Nikšića (oko 24 puta) nego u uzorku sa Žabljaka (oko 4 puta).

Latinović i sar. (2020) su vršili određivanja sadržaja flavonoida iz suvog i svježeg šipurka sa teritorije Bosne i Hercegovine i dobili sledeće rezultate: za suvi šipurak 2,71 mg Qc/g a za svježi 1,08 mg Qc/g što ukazuje da se više ukupnih flavonoida nalazi u osušenom šipurku. Kada se uporede rezultati koji su dobijeni u ovom radu: za plod iz NK 13,98 i ŽB 11,69 mg Qc/g sa rezultatima iz rada Latinović i sar. (2020) za suvi šipurak 2,71 mg Qc/g uočava se da je veći sadržaj flavonoida određen u uzorcima iz Crne Gore. Ghendov-Mosanu i sar. (2020) su otkrili sadržaj flavonoida u suvom šipuku iz Moldavije 2130 mg QE/100 g, što je približno rezultatu za uzorke NK 13,98 i ŽB 11,69 mg Qc/g iz ovog istraživanja. Skrypnik i sar. su utvrdili da faza sazrijevanja ima značajan uticaj na sadržaj flavonoida u šipurku. Najveći sadržaj flavonoida su otkrili u poluzrelim plodovima, a u nezrelim i potpuno zrelih plodovima nije bilo značajne razlike. Sadržaj flavonoida u prikupljenim uzorcima šipurka sa raznih lokacija je bio različit, u prosjeku oko 3,23 mg QE/g (Skrypnik i sar., 2019).



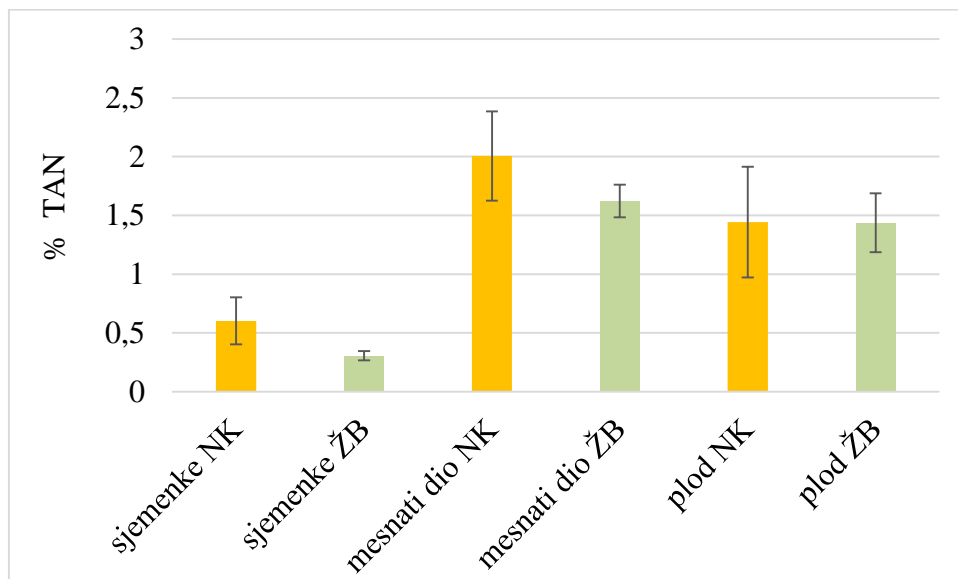
Grafikon 4. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima ploda šipurka

Iz prikazanih rezultata na grafikonu 4, se uočava da se najviše flavonoida u ovom slučaju ekstrahovalo ultrazvučnom ekstrakcijom,  $54,96 \pm 0,1$  mg Qc/g (s.e) kada se radi o uzorku sa Žabljaka (isto kao i kod fenola), i infuz ekstrakcijom kada se radi o uzorku iz Nikšića (isto kao i kod fenola). Na osnovu dobijenih rezultata za sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda šipurka kao najslabije metode za izolovanje flavonoida za uzorak iz Nikšića su se pokazale Sokslet i ultrazvučna ekstrakcija, a za uzorak sa Žabljaka maceracija i Sokslet ekstrakcija. Infuz ekstrakcijom ploda šipurka iz Nikšića se dobiju vrijednosti za sadržaj flavonoida oko 2 puta veće u odnosu na vrijednosti dobijene Sokslet ekstrakcijom, a ultrazvučnom ekstrakcijom ploda šipurka sa Žabljaka se dobiju 3 puta veće vrijednosti nego maceracijom.

Kad su u pitanju određivanja flavonoida, u literaturi se mogu naći podaci koji se odnose na određivanje sadržaja flavonoida u ekstraktima dobijenim različitim metodama ekstrakcije i u različitim rastvaračima. Tako su Tahirović i sar. (2017) određivali sadržaj flavonoida u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom uz korišćenje različitih rastvarača: voda, 50 % etanol, 80 % etanol, 50 % metanol, 80 % metanol, i dobili su sadržaj flavonoida 0,214; 0,675; 0,350; 0,611; 0,385 mg QE/g, respektivno, što je značajno manje od rezultata dobijenih u ovom master radu. Nađpal (2017) je ispitivala metanolni ekstrakt svježeg ploda šipurka (*Rosa canina* L.), metanolni ekstrakt suvog ploda, vodeni ekstrakt svježeg ploda, vodeni ekstrakt suvog ploda, vodeni ekstrakt voćne kaše i džem na sadržaj flavonoida; rezultati su se kretali od 0,61 do 2,94 mg kvercetina/g s.e. Za vodeni ekstrakt suvog ploda Nađpal (2017) je dobila vrijednost 1,22 mg kvercetina/g s.e., što je mnogo manja vrijednost od vrijednosti dobijene za uzorke iz Crne Gore iz ovog master rada (NK30,91 i ŽB 42,59 mg Qc/ g s.e.). Anđelković (2016) je ispitivanjem ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.) na sadržaj flavonola dobila vrijednost 51,87 i 740,25 mg QE/kg, respektivno. Sadržaj flavonoida u ekstraktima, sa oba područja iz ovog master rada, je mnogo veći od vrijednosti koje je dobila Anđelković.

### 4.3. SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I RAZLIČITIH EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA

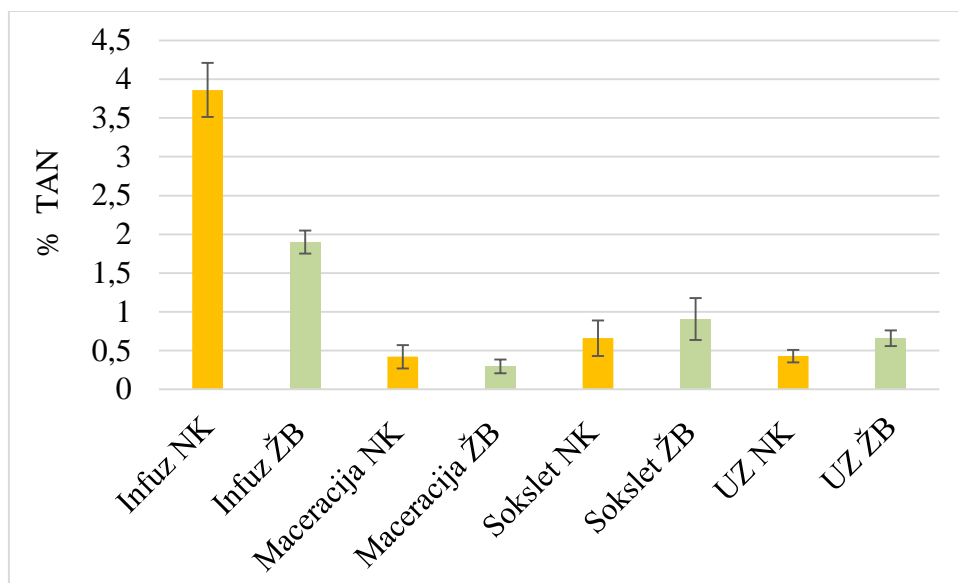
Rezultati određivanja ukupnih tanina u ispitivanim uzorcima u ovom master radu su izraženi kao procentni sadržaj ukupnih tanina (% TAN) i predstavljeni su na grafikonima 5 i 6, kao srednje vrijednosti dobijenih rezultata prilikom tri mjerenja $\pm$ SD.



Grafikon 5. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB)

Kao što se primjećuje najveći procentni sadržaj tanina, u oba uzorka i iz Nikšića i sa Žabljaka, je određen u mesnatom dijelu ploda šipurka ( $2,01\pm 0,38$  % i  $1,62\pm 0,14$  %, respektivno) a najmanje u sjemenkama ( $0,60\pm 0,20$  % i  $0,31\pm 0,04$  %, respektivno) (grafikon 5). Sadržaj tanina u mesnatom dijelu ploda šipurka iz Nikšića je oko 3 puta veći od sadržaja tanina u sjemenkama, dok je sadržaj tanina u mesnatom dijelu ploda šipurka sa Žabljaka oko 5 puta veći nego u sjemenkama.

Pregledom dostupne literature nijesu nađeni podaci o sadržaju tanina u plodu šipurka pa nije bilo moguće porediti dobijene rezultate u ovom radu sa literaturnim podacima.



Grafikon 6. Sadržaj ukupnih tanina (%) u ekstraktima ploda šipurka

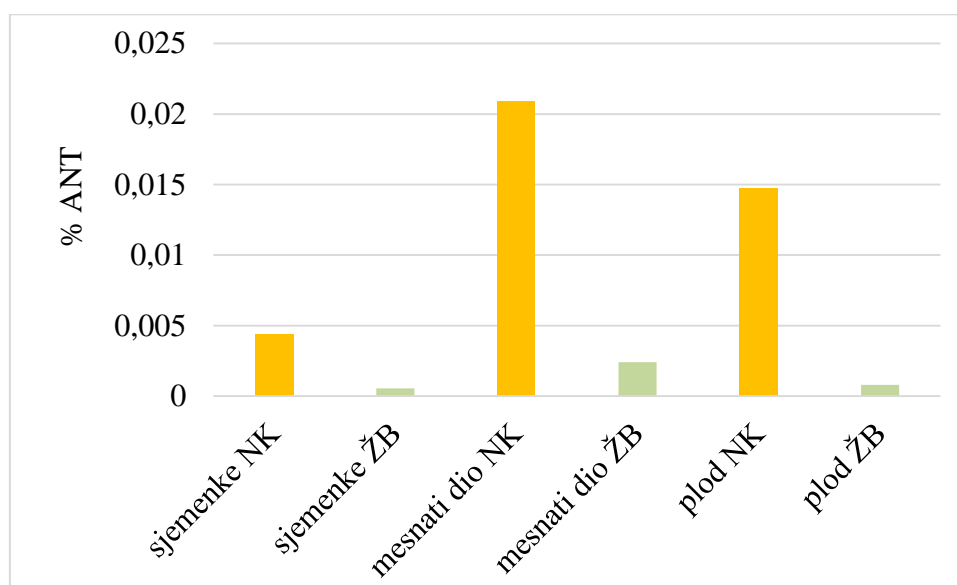
Dalje, sa grafikona 6 se primjećuje da se najviše tanina ekstrahuje iz ploda šipurka metodom infuz ekstrakcije i za uzorke iz Nikšića ( $3,86 \pm 0,35$  %) i za uzorke sa Žabljaka ( $1,90 \pm 0,15$  %), a najmanje tanina se ekstrahuje metodom maceracije. Sadržaj tanina u infuzu ploda šipurka iz Nikšića je oko 9 puta veći od sadržaja tanina u maceratu, dok je sadržaj tanina u infuzu ploda šipurka sa Žabljaka oko 6 puta veći od sadržaja tanina u maceratu.

U dostupnoj literaturi je nađeno vrlo malo podataka o analizama ekstrakata ploda šipurka na sadržaj tanina što je dovelo do poteškoća u poređenju literaturnih podataka i podataka koji su dobijeni u ovom istraživanju.

Taneva i sar. (2016) su određivali sadržaj tanina u maceratima (koji su napravljeni potapanjem osušenih uzoraka šipurka iz Bugarske) korišćenjem vode, 50 % i 70 % etanola kao rastvarača i dobili vrijednosti od 3,86; 3,76 i 1,46 g/100 g, respektivno. Za ekstrakte dobijene maceracijom u ovom master radu su dobijeni rezultati za NK 0,42 % i ŽB 0,296 %, što je znatno manje u poređenju sa podacima dobijenim u radu Taneva i sar. (2016).

#### 4.4. SADRŽAJ ANTOCIJANA U UZORCIMA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA I PLODA ŠIPURKA

Procentni sadržaj antocijana u uzorcima sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka iz Nikšića i sa Žabljaka je predstavljen na grafikonu 7.



Grafikon 7. Sadržaj ukupnih antocijana u uzorcima sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB)

Na osnovu podataka prikazanih na grafikonu 7 uočava se da uzorci iz Nikšića sadrže više antocijana od uzoraka sa Žabljaka i u sjemenkama i u mesnatom dijelu i u plodu. Najveći sadržaj antocijana ustanovljen je u mesnatom dijelu ploda iz Nikšića (0,0209 %), zatim u samom plodu NK (0,0147 %), a najmanje u sjemenkama (0,0044 %). Što se tiče uzoraka sa Žabljaka takođe se uočava da je najveći procenat antocijana nađen u mesnatom dijelu (0,0087 %), pa plodu (0,00298 %), a najmanje u sjemenkama (0,00198 %). Ako se uporede vrijednosti dobijene za antocijane za plod šipurka iz Nikšića i plod šipurka sa Žabljaka uočava se da su za oko 4 puta veće vrijednosti za plod iz Nikšića a u mesnatom dijelu ploda šipurka iz Nikšića sadržaj antocijana je oko 2,5 puta veći nego u mesnatom dijelu ploda šipurka sa Žabljaka.

Rezultati određivanja antocijana u uzorcima ploda šipurka iz Nikšića se približno slažu sa rezultatima koje su dobili Sabahi i sar. (2022), koji su u perkolatu dobili za antocijane vrijednost od 0,11 mg/g.

Vrijednosti za antocijane u uzorcima šipurka koji su ispitivani u ovom master radu su bile vrlo niske, što je u skladu sa literaturnim podacima. Tahirović i sar. (2017) su određivali sadržaj anocijana u različitim ekstraktima i dobili niske vrijednosti od 0,011 do 0,139 mg CGE/g (mg cijanidin-3-O-glukozida po gramu suvog uzorka šipurka) dok su Tumbaš i sar. (2012) odredili sadržaj u maceratu i dobili vrijednost 39,75 mg cijanidin-3-glukozida/g suvog ekstrakta, a Koraqi i sar. (2022) su ispitivali ekstrakte dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom pri čemu su mijenjali vrijeme ekstrakcije, zapreminu 40 % etanola kao rastvarača i dobili vrijednosti u granicama od 0,84 do 3,25 mg C3G/100 g.

#### **4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA**

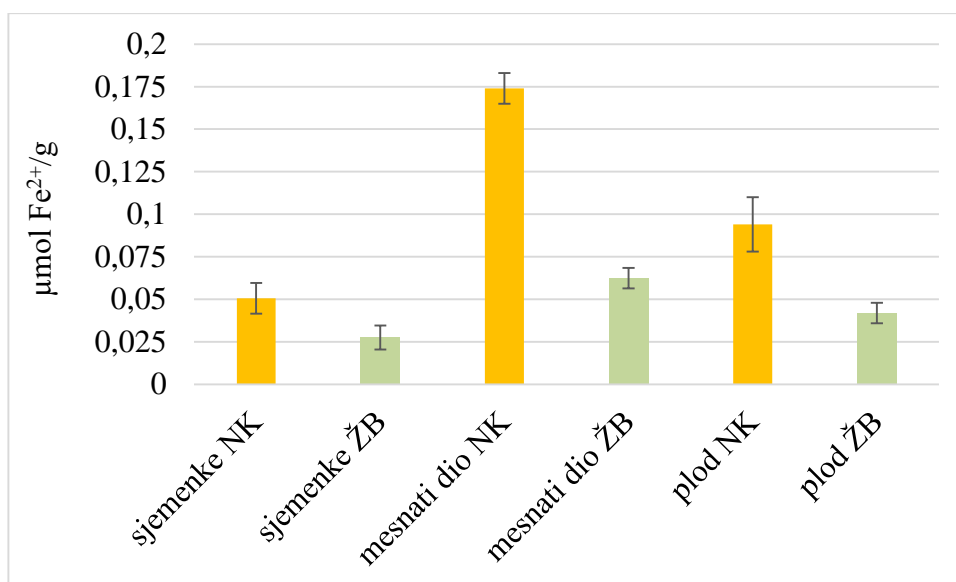
Za mjerenje antioksidativne aktivnosti postoji mnogo metoda:

- spektrofotometrijske metode: DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), FRAP (ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorption capacity), HORAC (hydroxyl radical averting capacity), TRAP (total peroxy radical trapping antioxidant parameter), PERAP (potassium ferricyanide reducing power) i CUPRAC (cupric reducing antioxidant power), Hydrogen peroxide scavenging assay, Nitric Oxide Radical Scavenging Assay;
- elektrohemijske metode (ciklična voltometrija, amperometrijska metoda, biamperometrijska metoda);
- hromatografske metode (gasna hromatografija, HPLC);
- biosenzorske metode;
- fluorimetrija;
- elektronska paramagnetna rezonancija (Pregiban, 2017).

Pregledom literature uočeno je da se za određivanje antioksidativne aktivnosti šipurka najčešće koristi DPPH metod, zatim FRAP, ABTS, a u mnogo manjoj mjeri CUPRAC, ORAC, TEAC (Serteser i sar. 2008; Wenzig i sar. 2008; Mihaylova i sar. 2015; Murathan i sar. 2016; Anđelković 2016; Taneva i sar. 2016; Nađpal 2017; Tahirović i sar. 2017; Jemaa i sar. 2017; Skrypnik i sar. 2019; Latinović i sar. 2020; Polumackanyecz i sar. 2020; Moldovan i sar. 2021; Liaudanskas i sar. 2021; Sabahi i sar. 2022).

#### 4.5.1. FRAP test

Dobijeni rezultati FRAP testom, u ovom master radu za antioksidativnu aktivnost su izraženi u  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  suvog uzorka (sjemenke, mesnati dio i plod) i  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  suvog ekstrakta (s.e.) (kada se radi o ekstraktima). Na grafikonima 8 i 9 su predstavljene rezultati antioksidativne aktivnosti korišćenjem FRAP testa. Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, a sva mjerenja su rađena tri puta. Najveću antioksidativnu aktivnost ima onaj uzorak čija je vrijednost  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  odn.  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  s.e. najveća.



Grafikon 8. Antioksidativna aktivnost uzoraka sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB) dobijena FRAP testom

Kada se uporede sjemenke, mesnati dio i plod za pojedinačne uzorke iz Nikšića i sa Žabljaka uočava se da najveću antioksidativnu aktivnost ima mesnati dio ploda (NK  $0,174 \pm 0,009 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ , ŽB  $0,062 \pm 0,006 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ), a najmanju sjemenke (NK  $0,05 \pm 0,009 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ , ŽB  $0,027 \pm 0,007 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ). Kada se uporede plodovi iz Nikšića i sa Žabljaka primjećuje se da bolji antioksidativni potencijal posjeduje plod iz Nikšića. Odnosno, mesnati dio ploda šipurka i plod šipurka iz Nikšića imaju za oko 2,5 puta veći antioksidativni potencijal određen FRAP testom od istih sa Žabljaka.

Murathan i sar. (2016) su određivali koliki je antioksidativni kapacitet suvih plodova šipurka sa teritorije Turske (korišćenjem FRAP metode) i dobili vrijednost  $97,95 \text{ mmol TE}/\text{g}$  (TE-Trolox ekvivalent). Skrypnik i sar. (2019) su određivali totalni antioksidativni kapacitet u nezrelom,

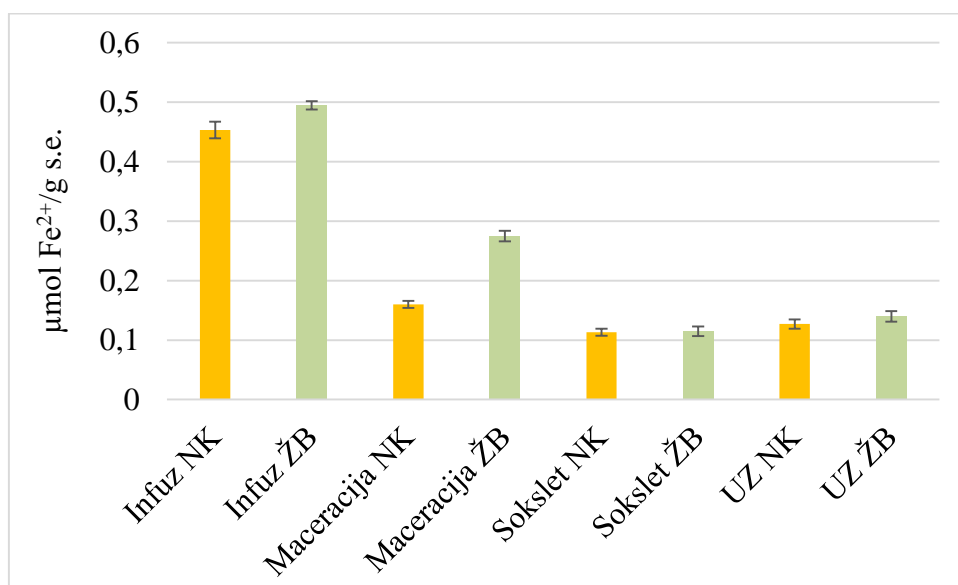


poluzrelom i potpuno zreom plodu šipurka sa sledećih lokaliteta sa područja Baltičkog mora: Curonian Spit, Sambia peninsula, Vistula Spit i dobili sledeće vrijednosti navedene u tabeli 6.

Tabela 6. Antioksidativni kapacitet nezrelih, poluzrelih i potpuno zrelih plodova *Rosa canina* L. sa područja Baltičkog mora Skrypnik i sar. (2019) određivan FRAP metodom

Lokalitet	nezreo plod	poluzreo plod	potpuno zreo plod
Curonian Spit	512,1 $\mu\text{mol TE/g}$	531,1 $\mu\text{mol TE/g}$	574,1 $\mu\text{mol TE/g}$
Sambia peninsula	498,7 $\mu\text{mol TE/g}$	568,1 $\mu\text{mol TE/g}$	589,7 $\mu\text{mol TE/g}$
Vistula Spit	468,9 $\mu\text{mol TE/g}$	512,3 $\mu\text{mol TE/g}$	541,4 $\mu\text{mol TE/g}$

Uočava se da je najbolji potpuno zreo plod u pogledu antioksidativnog kapaciteta i da su ove vrijednosti znatno veće od vrijednosti dobijenih u ovom master radu.



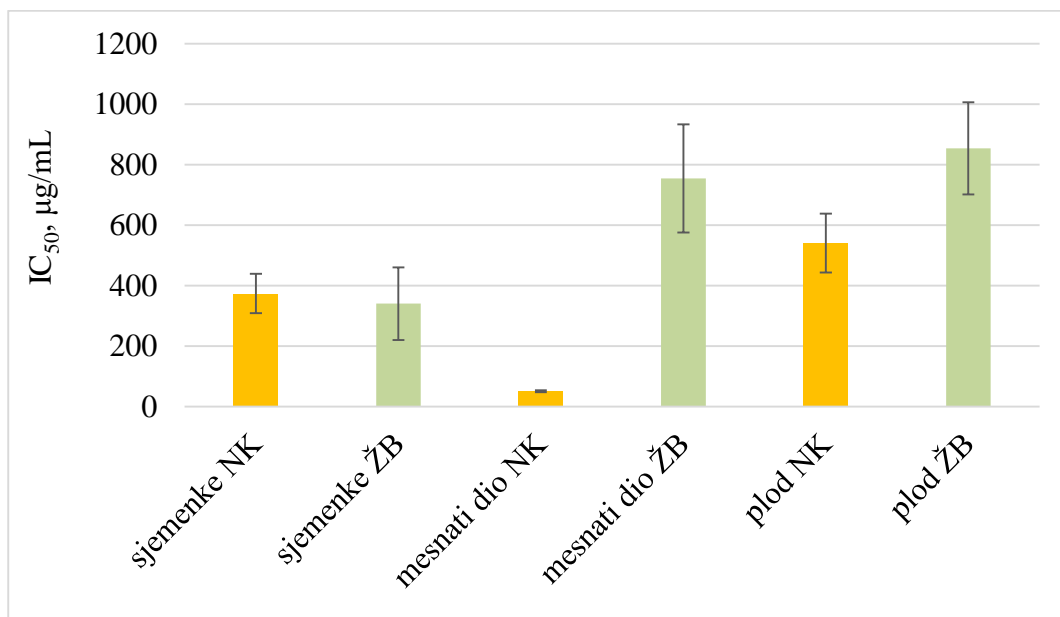
Grafikon 9. Antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata ploda šipurka iz Nikšića i sa Žabljaka, dobijena FRAP testom

Infuz dobijen iz oba uzorka ploda šipurka, se pokazao kao ekstrakt sa najvećom antioksidativnom aktivnošću (NK  $0,453 \pm 0,014 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.e.}$ , ŽB  $0,494 \pm 0,007 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.e.}$ ), dok ekstrakti dobijeni Sokslet ekstrakcijom oba uzorka pokazuju najslabiju antioksidativnu aktivnost (NK  $0,113 \pm 0,006 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.e.}$ , ŽB  $0,115 \pm 0,008 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.e.}$ ).

Tahirović i sar. (2017) su određivali antioksidativni potencijal FRAP testom za ekstrakte dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom korišćenjem različitih rastvarača (voda, 50 % metanol, 80 % metanol, 50 % etanol i 80 % etanol). Dobijene vrijednosti antioksidativnog potencijala za uzorke iz Bosne i Hercegovine su se kretale od 349,33 do 690,37  $\mu\text{mol TE/g}$ . Vrijednosti koje su dobili Tahirović i sar. u poređenju sa rezultatima iz ovog master rada su znatno veće. Polumackanycz i sar. (2020) su ispitivali antioksidativni potencijal vodenih i hidrometanolnih ekstrakata (šipurak iz Poljske) i prijavili rezultate koji su se kretali od 27,75 do 168,07  $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$  za vodene ekstrakte i od 18,41 do 81,50  $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$  za hidrometanolne ekstrakte. Vrijednosti dobijene u istraživanju Polumackanycz i sar. su znatno veće od vrijednosti koje su dobijene u ovom master radu.

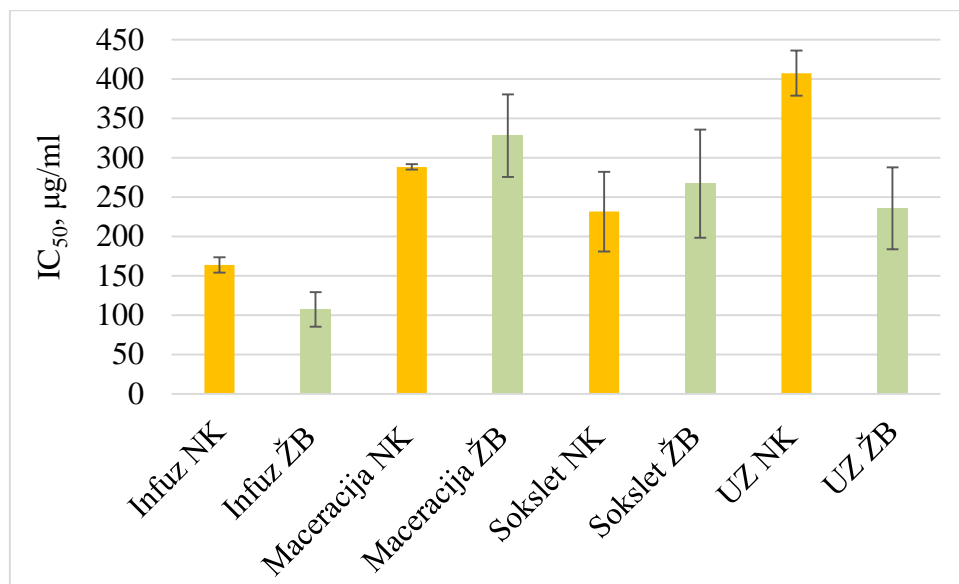
#### 4.5.2. DPPH test

U ovom radu, antioksidativna aktivnost sjemenki, mesnatog dijela, ploda i različitih ekstrakata ploda šipurka je ispitivana i DPPH testom. Dobijeni rezultati antioksidativne aktivnosti su izraženi kao  $\text{IC}_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ . Na grafikonima 10 i 11 su predstavljeni rezultati antioksidativne aktivnosti dobijeni korišćenjem DPPH testa. Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, a sva mjerenja su rađena tri puta.



Grafikon 10. Antioksidativna aktivnost uzoraka sjemenki, mesnatog dijela i ploda šipurka iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB), dobijena DPPH testom

Najveću antioksidativnu aktivnost ima onaj uzorak čija je vrijednost  $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$  najmanja. Što znači da najveću antioksidativnu aktivnost iz priloženih rezultata posjeduje mesnati dio ploda iz Nikšića, što se slaže sa rezultatima dobijenim FRAP testom. Kada se uporede plodovi iz Nikšića i sa Žabljaka primjećuje se da bolji antioksidativni potencijal posjeduje plod iz Nikšića (što potvrđuju i rezultati korišćenjem FRAP testa).



Grafikon 11. Antioksidativni aktivnost raznih ekstrakata ploda šipurka iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB), dobijena DPPH testom

Infuz se pokazao kao ekstrakt sa najvećom antioksidativnom aktivnošću (infuz NK:  $163,77 \pm 9,81 \mu\text{g/mL}$ , infuz ŽB:  $107,25 \pm 21,79 \mu\text{g/mL}$ ), što se, takođe, slaže sa rezultatima dobijenim FRAP testom. Primjećuje se da je mnogo veća antioksidativna aktivnost infuza (NK  $163,77 \pm 9,81 \mu\text{g/mL}$ , ŽB  $107,25 \pm 21,79 \mu\text{g/mL}$ ) nego samog suvog ploda (NK  $373,88 \pm 65,03 \mu\text{g/mL}$ , ŽB  $340,59 \pm 120,02 \mu\text{g/mL}$ ) što ukazuje na to zašto se šipurak ne konzumira u vidu suvih plodova nego u vidu čaja.

Sabahi i sar. (2022) su korišćenjem ove metode (DPPH) odredili antioksidativni kapacitet uzorka ekstrakata (perkolata; uzorka šipurka iz Irana) koji je iznosio 476 ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g/mL}$ ) što pokazuje znatno manji antioksidativni kapacitet u odnosu na uzorke ispitivane u ovom radu istom metodom. Latinović i sar. (2020) su određivali antioksidativni potencijal ultrazvučnog etanolnog ekstrakta ploda *Rosa canina* L. (iz Bosne i Hercegovine) i utvrdili vrijednost  $995,99 \mu\text{g/mL}$ , što je mnogo veća vrijednost od vrijednosti dobijene u ovom radu, tj. mnogo lošija antioksidativna aktivnost od uzorka ploda šipurka iz Nikšića i sa Žabljaka. Tahirović i sar. (2017) su takođe ispitali ultrazvučne ekstrakte uz

korišćenje različitih rastvarača: voda, 50 % etanol, 80 % etanol, 50 % metanol i 80 % metanol, na antioksidativnu aktivnost i rezultati su: 382,3; 359,44; 255,62; 407,82; 278,34  $\mu\text{mol TE/g}$ , respektivno. Kada se rezultat za ultrazvučni ekstrakt iz ovog master rada za NK 407,52 $\pm$ 28,77 i ŽB 235,78 $\pm$ 52,14  $\mu\text{g/mL}$  uporedi sa vrijednošću koju su dobili Tahirović i sar. uočava se slaganje rezultata. Nađpal (2017) je ispitivala antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta svježeg ploda šipurka (*Rosa canina* L.), metanolnog ekstrakta suvog ploda, vodenog ekstrakta svježeg ploda, vodenog ekstrakta suvog ploda, vodenog ekstrakta voćne kaše i džema korišćenjem DPPH testa; rezultati u ovom istraživanju su se kretali od 11,8 do 81,1  $\mu\text{g/mL}$  ( $\text{IC}_{50}$ ). Vrijednosti dobijene za antioksidativnu aktivnost primjenom DPPH testa u ovom master radu su za infuz NK 163,77 $\pm$ 9,81  $\mu\text{g/mL}$ , infuz ŽB 107,25 $\pm$ 21,79  $\mu\text{g/mL}$ , dok je Nađpal za vodeni ekstrakt suvog ploda dobila vrijednost od 35 $\pm$ 0,86  $\mu\text{g/mL}$ , što ukazuje da vodeni ekstrakti suvog ploda šipurka, koje je ispitivala Nađpal, imaju veću antioksidativnu aktivnost od vrijednosti dobijenih u ovom master radu.

Anđelković (2016) je odredila antioksidativnu aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista šipurka DPPH testom i dobila  $\text{EC}_{50}$  ( $\text{mg/mL}$ ): 1,87 za plod i 0,94 za list. Vrijednosti za plodove: NK 373,88 $\pm$ 65,03  $\mu\text{g/mL}$ , ŽB 340,59 $\pm$ 120,02  $\mu\text{g/mL}$  predstavljaju mnogo manje vrijednosti odnosno mnogo bolju antioksidativnu aktivnost nego što je to odredila Anđelković (2016) za plod sa teritorije Srbije.

Serteser i sar. (2008) su odredili vrijednost  $\text{EC}_{50}$  (za uzorak iz Turske), koeficijent efikasnosti ( $\text{mg}$  uzorak/ $\text{mg}$  DPPH slobodnih radikala) odnosno količinu uzorka potrebnu da se smanji 50% koncentracija DPPH na početku i ta vrijednost iznosi 0,950. Odredili su i antiradikalnu aktivnost ( $1/\text{EC}_{50}$ )=1,052. Vrijednost  $\text{IC}_{50}$  u ovom master radu za plod NK iznosi 541,33 $\pm$ 97,42 a za plod ŽB 854,6 $\pm$ 152,63  $\mu\text{g/mL}$ , što je približno rezultatu koji su dobili Serteser i sar.

#### **4.6. MINERALNI SASTAV UZORAKA SJEMENKI, MESNATOG DIJELA, PLODA I EKSTRAKATA PLODA ŠIPURKA**

Šipurak (*Rosa canina* L.) je veoma bogat kako mikroelementima tako i makroelementima. U šipurku najviše ima kalcijuma, kalijuma, fosfora i magnezijuma, a pored njih šipurak sadrži u određenoj količini i bakar, aluminijum, natrijum, stroncijum, barijum, selen, bor, cink itd. Makroelementi (kalcijum, magnezijum, kalijum, natrijum) djeluju direktno na mišiće i nervni sistem, a mikroelementi

(bakar, gvožđe, cink, selen, mangan) su važni za biohemijske reakcije koje se odvijaju u ljudskom organizmu (Grgurić-Šipka, 2014).

Za određivanje kvaliteta plodova šipurka veoma je važno ispitati prisustvo i koncentraciju metala u plodu, jer su neki esencijalni i utiču na nutritivnu vrijednost ploda, a neki su toksični, a mogu dospjeti u biljku iz zemljišta, vode i vazduha itd.

U tabeli 7 je predstavljen sadržaj bakra, mangana, olova, gvožđa, nikla i cinka u ispitivanim uzorcima (sjemenke, mesnati dio, plod i ekstrakti ploda šipurka iz Nikšića i sa Žabljaka). Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, a sva mjerenja su rađena tri puta.

Tabela 7. Mineralni sastav uzorka šipurka (plod, mesnati dio i sjemenke) i ekstrakata ploda šipurka

Uzorak	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)
<b>sjemenke NK</b>	48,555 $\pm$ 3,62	16,551 $\pm$ 1,25	1,669 $\pm$ 0,34	23,037 $\pm$ 2,78	0,811 $\pm$ 0,07	18,673 $\pm$ 1,5
<b>sjemenke ŽB</b>	44,603 $\pm$ 3,58	13,226 $\pm$ 1,07	2,354 $\pm$ 0,45	19,850 $\pm$ 1,93	0,631 $\pm$ 0,04	17,909 $\pm$ 1,53
<b>mesnati dio NK</b>	32,702 $\pm$ 2,91	20,009 $\pm$ 2,35	2,653 $\pm$ 0,57	15,395 $\pm$ 1,12	1,291 $\pm$ 0,21	9,609 $\pm$ 1,31
<b>mesnati dio ŽB</b>	22,920 $\pm$ 2,09	18,306 $\pm$ 1,76	0,666 $\pm$ 0,04	9,869 $\pm$ 1,62	0,889 $\pm$ 0,06	3,331 $\pm$ 0,86
<b>plod NK</b>	23,102 $\pm$ 2,12	11,889 $\pm$ 0,88	1,616 $\pm$ 0,26	18,376 $\pm$ 1,42	1,013 $\pm$ 0,19	15,651 $\pm$ 1,42
<b>plod ŽB</b>	8,279 $\pm$ 1,54	6,809 $\pm$ 0,96	0,318 $\pm$ 0,00	5,438 $\pm$ 0,96	0,514 $\pm$ 0,03	4,409 $\pm$ 0,98
<b>Infuz NK</b>	24,057 $\pm$ 2,36	9,361 $\pm$ 1,01	0,307 $\pm$ 0,00	3,530 $\pm$ 0,75	0,748 $\pm$ 0,05	9,401 $\pm$ 1,29
<b>Infuz ŽB</b>	22,527 $\pm$ 2,24	18,249 $\pm$ 1,64	0,274 $\pm$ 0,00	5,425 $\pm$ 0,97	0,752 $\pm$ 0,04	12,521 $\pm$ 1,45
<b>UZ NK</b>	18,514 $\pm$ 1,98	0,823 $\pm$ 0,02	0,751 $\pm$ 0,05	17,014 $\pm$ 1,34	0,659 $\pm$ 0,04	6,695 $\pm$ 0,85
<b>UZ ŽB</b>	7,514 $\pm$ 1,12	0,663 $\pm$ 0,02	0,340 $\pm$ 0,01	7,242 $\pm$ 1,02	0,493 $\pm$ 0,03	5,525 $\pm$ 0,75
<b>Sokslet NK</b>	18,944 $\pm$ 2,03	0,333 $\pm$ 0,00	0,351 $\pm$ 0,01	2,507 $\pm$ 0,88	0,368 $\pm$ 0,02	1,902 $\pm$ 0,56
<b>Sokslet ŽB</b>	4,444 $\pm$ 0,99	1,024 $\pm$ 0,23	0,335 $\pm$ 0,01	11,466 $\pm$ 2,01	2,248 $\pm$ 0,68	6,931 $\pm$ 0,87
<b>Maceracija NK</b>	7,962 $\pm$ 1,14	0,889 $\pm$ 0,05	0,522 $\pm$ 0,02	13,043 $\pm$ 1,85	0,479 $\pm$ 0,04	4,545 $\pm$ 0,86
<b>Maceracija ŽB</b>	7,842 $\pm$ 1,24	0,618 $\pm$ 0,03	1,250 $\pm$ 0,34	9,974 $\pm$ 1,02	0	5,895 $\pm$ 0,76

Veoma je važno da plodovi imaju što manje teških metala poput olova, žive, nikla, kadmijuma itd. Iz tabele 7 se uočava da je koncentracija olova veoma niska. Upoređivanjem plodova iz Nikšića i sa Žabljaka uočava se da je sadržaj olova veći u uzorku iz Nikšića za 1,298 mg/kg. Dalje, plodovi iz Nikšića sadrže takođe i više gvožđa, mangana, cinka, bakra i nikla. Najveći sadržaj bakra je nađen u uzorcima sjemenki NK i to 44,555 mg/kg; gvožđa u sjemenkama iz Nikšića i to 23,037 mg/kg;

mangana u uzorcima mesnatog dijela iz Nikšića; cinka i nikla takođe u sjemenkama i olova u mesnatom dijelu ploda.

Određivanjem sadržaja metala u ekstraktima ustanovljeno je da je najveća vrijednost sadržaja bakra nađena u infuzu koji je dobijen iz plodova šipurka sa oba područja, gvožđa u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom iz ploda šipurka iz Nikšića i Sokslet ekstraktu ploda šipurka sa Žabljaka. Za izolovanje mangana i cinka pokazalo se da je daleko najbolja infuz ekstrakcija, za plodove sa oba područja.

Pregledom literature nađeno je da je više istraživača vršilo ispitivanje mineralnog sastava ploda šipurka. Tako su za određivanje bakra Chrubasik i sar. (2008) dobili vrijednost od 5 mg/kg, Saygi i sar. (2021) 6,67 mg/kg, u istraživanju Javanmard i sar. (2018) sadržaj bakra se kretao od 8 do 16 mg/kg, Vural (2015) je dobio 5,07 mg/kg, Fan i sar. (2014) 0,113 mg/100 g. Kazaz i sar. (2009) su za sadržaj bakra u plodu dobili 4 mg/kg, za mesnati dio 3 mg/kg i za sjemenke 6 mg/kg. Ovi rezultati su približni rezultatima iz ovog master rada gdje je za plod iz NK dobijeno 23,102 a za plod ŽB 8,279 mg/kg bakra.

Isti istraživaču su određivali i sadržaj mangana: Chrubasik i sar. (2008) su za sadržaj mangana dobili vrijednost od 244 mg/kg, Saygi i sar. (2021) 13,43 mg/kg, rezultati koje su dobili Javanmard i sar. (2018) su se kretali od 20 do 65 mg/kg, Vural (2015) 92 mg/kg, Fan i sar. (2014) 1,02 mg/100 g. Kazaz i sar. (2009) su za sadržaj mangana u plodu dobili 32 mg/kg, za mesnati dio 43 mg/kg i za sjemenke 19 mg/kg. Određivanje mangana su vršili i Demir i sar. (2000) i utvrdili da je sadržaj mangana u uzorcima u granicama od 22,4 do 44,8 mg/kg, a Özcan (2002) je dobio sadržaj mangana u granicama od 117,62 do 479,14 ppm. Pregledom ovih literaturnih podataka primjećuje se velika razlika između rezultata dobijenih za sadržaj mangana. Rezultati za sadržaj mangana iz ovog master rada (tabela 7) za plod su najpribližniji rezultatima iz rada Saygi i sar. (2021), a za sjemenke najpribližniji rezultatu iz rada Fan i sar. (2014).

Kada je u pitanju sadržaj olova: Chrubasik i sar. (2008) su za sadržaj olova u plodovima šipurka dobili rezultat 0,3 mg/kg, a Vural (2015) 0,385 ppm. Rezultati su slični kao i za plod ŽB čija je vrijednost sadržaja olova iznosila 0,318 mg/kg (tabela 7).

Chrubasik i sar. (2008) su za sadržaj gvožđa u sprasenom plodu šipurka dobili vrijednost od 267 mg/kg, Saygi i sar. (2021) 17,52 mg/kg, Javanmard i sar. (2018) od 29 do 48 mg/kg, Fan i sar. (2014) 1,06 mg/100g. Kazaz i sar. (2009) su za sadržaj gvožđa u plodu dobili 27 mg/kg, za mesnati dio 25 mg/kg i za sjemenke 15 mg/kg. Demir i sar. (2000) su utvrdili sadržaj gvožđa u uzorcima u granicama od 59,4 do 72,9 mg/kg, Özcan (2002) u sjemenkama 14 ppm. Rezultati koji su dobijeni u ovom master

radu (tabela 7) za sadržaj gvožđa su najpribližniji radu Saygi i sar. (2021) koji su ispitivali uzorke sa područja Turske.

Chrubasik i sar. (2008) su za sadržaj nikla u sprasanim plodovima šipurka dobili rezultat 2,9 mg/kg, a Vural (2015) 1,050 ppm. Sadržaj nikla za plod NK iznosi 1,013 mg/kg, za ŽB 0,514 mg/kg (tabela 7), što su manje vrijednosti od vrijednosti nađenih u ostalim naučnim radovima.

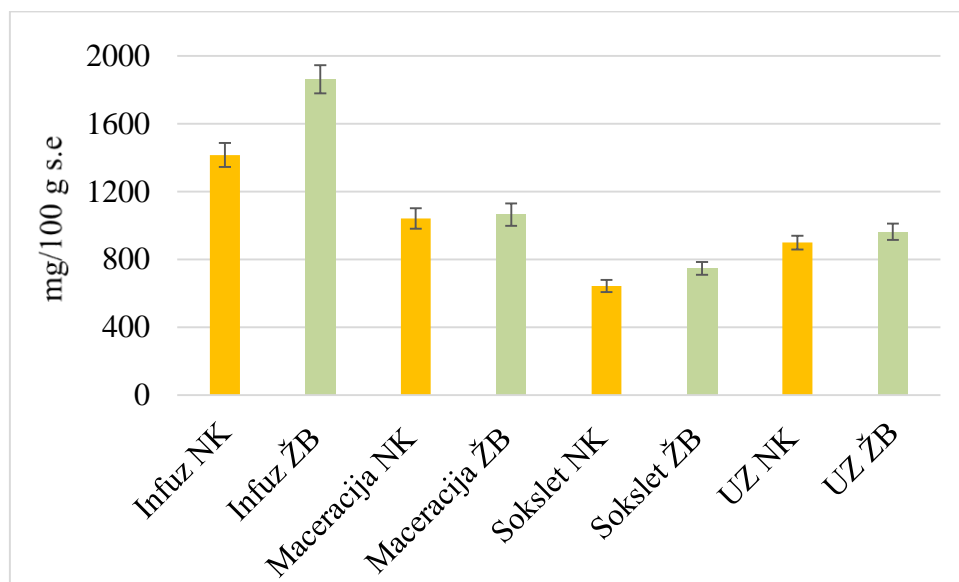
Chrubasik i sar. (2008) su za sadržaj cinka dobili vrijednost od 22 mg/kg, Saygi i sar. (2021) 9,78 mg/kg, Javanmard i sar. (2018) od 8 do 27 mg/kg. Kazaz i sar. (2009) su za sadržaj cinka u plodu dobili 10 mg/kg, Demir i sar. (2000) su utvrdili sadržaj cinka u uzorcima u granicama od 3,69 do 4,51 mg/kg, Özcan (2002) u granicama od 121,75 do 976,14 ppm, Vural (2015) 11,50 mg/kg, Fan i sar. (2014) 0,25 mg/100 g. Rezultati ispitivanja sadržaja cinka iz ovog master rada su slični većini rezultata prikazanih u istraživanjima u različitim državama, za plod NK 15,651 mg/kg, plod ŽB 4,409 mg/kg (tabela 7).

#### **4.7. SADRŽAJ VITAMINA C U RAZLIČITIM EKSTRAKTIMA PLODA ŠIPURKA**

Vitamin C je vitamin koji je rastvorljiv u vodi. Ima važnu ulogu u svim oksido-redukcionim procesima tako što neutrališe slobodne radikale koji su štetni za organizam. Sadržaj vitamina C je veći u potpuno zrelih i poluzrelih plodovima nego u nezrelih. Varijabilnost sadržaja vitamina C može biti uzrokovana: geografskim regionom, nadmorskom visinom, vrstom, sortom i načinom uzgoja šipurka, nivoom zrelosti, različitim zemljišnim i klimatskim uslovima (Nojavan i sar., 2008; Adamczak i sar. 2012; Oprica i sar., 2015) . Roman i sar. (2013) su utvrdili povećanje sadržaja vitamina C u plodu šipurka sa porastom nadmorske visine za istu sortu. Koncentracija kiseonika na velikim nadmorskim visinama je smanjena, pa se smanjuje i oksidativni stres, akumulira askorbinska kiselina, ali i niske temperature utiču na povećanje sadržaja vitamina C. Sadržaj vitamina C zavisi od nekoliko faktora koji uključuju: kiseonik, svjetlost, temperaturu, sadržaj vlage, vrijeme sušenja, katalizu metalnih jona. Erenturk i sar. (2005) su dokazali da se degradacija vitamina C povećava sa povećanjem temperature na početku sušenja. Stabilnost i zadržavanje vitamina C ne zavisi samo od uslova sušenja, već i od procenta vlage u uzorku. Metode koje se najčešće koriste za određivanje vitamina C jesu HPLC, spektrofotometrijska i AOAC metoda.

Dobijeni rezultati u ovom master radu za sadržaj vitamina C su izraženi u mg/100 g suvog ekstrakta (s.e.). Na grafikonu 12 su predstavljeni rezultati sadržaja vitamina C u različitim ekstraktima ploda

šipurka. Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti±standardna devijacija, a sva mjerenja su rađena tri puta.



Grafikon 12. Sadržaj vitamina C (mg/100 g suvog ekstrakta) u ekstraktima ploda šipurka Iz Nikšića (NK) i sa Žabljaka (ŽB), dobijenim različitim načinima ekstrakcije

Sa grafikona 12 se uočava da je najveći sadržaj vitamina C nađen u infuzima (NK 1415,61±70,96 mg/100 g s.e., ŽB 1862,68±83,75 mg/100 g s.e.), a najmanje u ekstraktima dobijenim Sokslet ekstrakcijom (NK 642,569±35,67, ŽB 747,372±37,41 mg/100 g s.e.). Utvrđeno je da svaki ekstrakt ploda šipurka sa Žabljaka ima veći sadržaj vitamina C od ekstrakata ploda iz Nikšića.

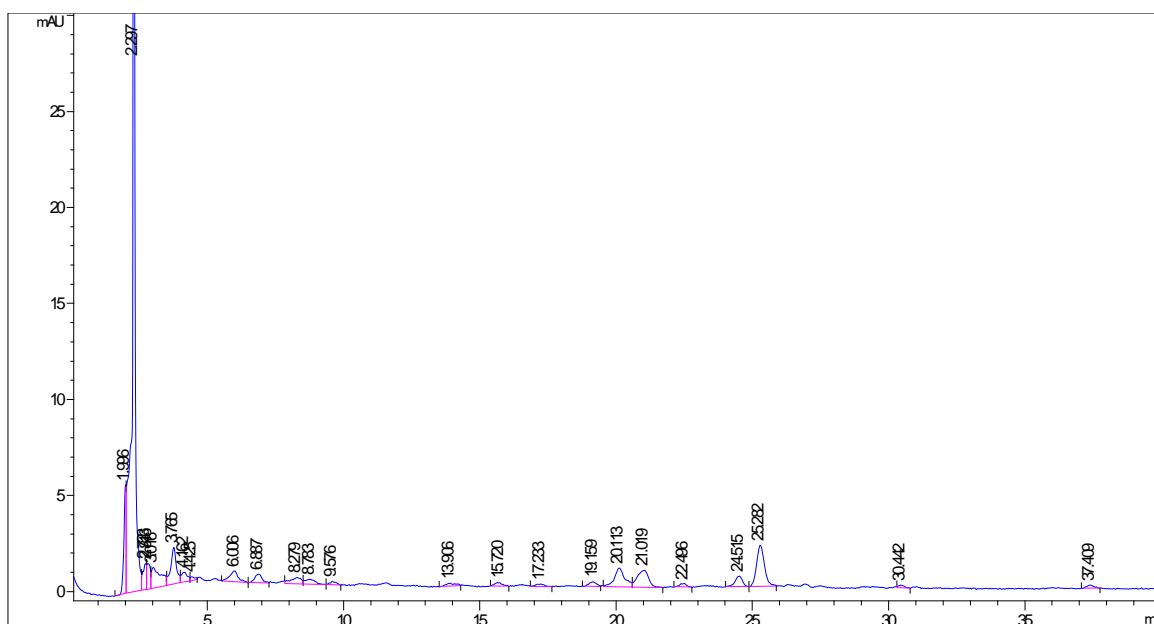
Nađpal i sar. (2016) su ispitivanjem vodenog ekstrakta svježeg i suvog ploda šipurka utvrdili sadržaj vitamin C od 1,96 mg/g s.e. i 2,09 mg/g s.e., što je približno rezultatima iz ovog rada. Pulumackanycz i sar. (2020) su za vodeni ekstrakt dobili vrijednosti sadržaja od 0,7 do 5,08 mg/g, a za hidrometanolni ekstrakt vrijednosti od 0,35 do 8,79 mg/g. Ovo su značajno niže vrijednosti od vrijednosti iz ovog master rada. Taneva i sar. (2016) su ispitivali macerate (korišćenjem vode, 50 % etanola i 70 % etanola kao rastvarača) na sadržaj vitamina C i dobili rezultate: 2340 mg/100 g (voda kao rastvarač), 2189 mg/100 g (50 % etanol kao rastvarač), 2404 mg/100 g (70 % etanol kao rastvarač). Ove vrijednosti su skoro duplo veće od vrijednosti za macerate koje su dobijene u ovom master radu.



#### 4.8. IDENTIFIKACIJA FENOLNIH JEDINJENJA HPLC METODOM U PLODOVIMA ŠIPURKA

Za uzorak osušenog ploda šipurka iz Nikšića (uzorak obilježen brojem 1) identifikovano je sedam jedinjenja: galna kiselina, protokatehinska kiselina, elaginska kiselina, hiperozid, kvercetin, kvircitrin i rutin; a za uzorak sa Žabljaka (uzorak obilježen brojem 2) identifikovano devet jedinjenja i to: galna kiselina, protokatehinska kiselina, elaginska kiselina, hiperozid, kvercetin, kvircitrin, rutin, epikatehin i epikatehin galat. Najzastupljenije jedinjenje u oba uzorka je galna kiselina (koncentracija uzorka 1- 0,458237 %, uzorka 2- 0,392186 %), a najmanje zastupljen je kvercetin (koncentracija uzorka 1- 0,000225 %, uzorka 2- 0,000741 %). Protokatehunske kiseline u uzorku 1 ima u koncentraciji 0,00721979 %, dok nešto više u uzorku 2-0,05178024 %. Elaginske kiseline ima približno isto u oba uzorka (1-0,00316303 %, 2-0,000390505 %), sličan sadržaj i hiperozida (za uzorak 1-0,0017418 %, za uzorak 2-0,00175305%). Kvircitrina ima više u uzorku 1 (uzorak 1-0,00271808 %, uzorak 2- 0,00224601 %), kvercetina u uzorku 2 (uzorak 1-0,00022535 %, uzorak 2-0,00074111 %). Rutina ima približno isto u oba uzorka (uzorak 1-0,00315721 %, uzorak 2-0,00389786 %). Epikatehin i epikatehin galat su nađeni samo u uzorku 2 u koncentraciji 0,34011462 % i 0,04530728 %, redom.

HPLC hromatogrami fenolnih jedinjenja identifikovanih na 325 nm u ispitivanim uzorcima plodova suvog šipurka sa dva lokaliteta su dati na slici 17.



a)



Takođe su, Nađpal i sar. 2016 ispitivali razne ekstrakte šipurka (uzorci sa teritorije Srbije): vodeni ekstrakt suvog (Vsu), vodeni ekstrakt svježeg ploda, metanolni ekstrakt suvog ploda (Msu), metanolni ekstrakt svježeg ploda (Msv) na sadržaj fenolnih jedinjenja HPLC metodom i dobili rezultate koji su navedeni u tabeli 9.

Tabela 9. Sadržaj određenih fenolnih jedinjenja u ekstraktima ploda šipurka, (Nađpal i sar., 2016)

Jedinjenje	Jedinica mjere ( $\mu\text{g/g}$ suvog ekstrakta)			
	Vsu	Vsv	Msu	Msv
<b>Protokatehinska kiselina</b>	14,2 $\pm$ 0,56	9,79 $\pm$ 0,39	13,7 $\pm$ 6,61	8,04 $\pm$ 0,32
<b>galna kiselina</b>	5,11 $\pm$ 0,19	11,3 $\pm$ 0,64	2,32 $\pm$ 0,11	1,86 $\pm$ 0,09
<b>kvircitrin</b>	27,1 $\pm$ 0,10	40,4 $\pm$ 1,30	113 $\pm$ 6,78	95,2 $\pm$ 3,29
<b>hiperozid</b>	<loq	2,53 $\pm$ 0,09	8,50 $\pm$ 0,36	7,73 $\pm$ 0,33
<b>katehin</b>	7,35 $\pm$ 0,17	7,83 $\pm$ 0,41	2,37 $\pm$ 0,08	4,23 $\pm$ 0,15
<b>epikatehin</b>	1,72 $\pm$ 0,06	2,35 $\pm$ 0,07	4,74 $\pm$ 0,20	2,92 $\pm$ 0,10

Anđelković (2016) je odredila sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim od ploda šipurka (sa teritorije Srbije) i dobila vrijednost za: katehin 5,23 $\pm$ 0,07 mg/kg, epikatehin 10,78 $\pm$ 0,10 mg/kg, kvercetin-3-glukozid 45,11 $\pm$ 1,14 mg/kg. Tumbaš i sar. 2012 su ispitivali sadržaj fenolnih jedinjenja u čaju od šipurka (sa teritorije Srbije) HPLC metodom i dobili rezultate za: katehin 12,59 $\pm$ 0,53  $\mu\text{g/kg}$ , rutin 63,35 $\pm$ 2,86  $\mu\text{g/kg}$ , kvercetin 296,5 $\pm$ 11,69  $\mu\text{g/kg}$ , galnu kiselinu 3,31 $\pm$ 0,15  $\mu\text{g/kg}$ , protokatehinsku kiselinu 6,94 $\pm$ 0,25  $\mu\text{g/kg}$ , elaginsku kiselinu 444,61 $\pm$ 17,36  $\mu\text{g/kg}$ . Liaudanskas i sar. 2021 su ispitivali sadržaj fenolnih jedinjenja u čaju od šipurka koristeći UHPLC metodu i prijavili sledeće rezultate: za katehin 107,93 $\pm$ 1,93  $\mu\text{g/g}$ , epikatehin galat 117,52 $\pm$ 2,27  $\mu\text{g/g}$ , kvircitrin 2,63 $\pm$ 0,01  $\mu\text{g/g}$ , dok rutin, epikatehin i kvercetin nijesu identifikovali.

Može se uočiti, na osnovu rezultata HPLC određivanja u ovom master radu i literaturnih podataka, da su identifikovana ista jedinjenja u uzorcima ekstrakata ploda šipurka iz Srbije i u uzorcima ploda šipurka sa područja Nikšića i Žabljaka.

## 5. KORELACIJA IZMEĐU SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, VITAMINA C, MIKROELEMENATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA PLODA ŠIPURKA

Plod šipurka pored fenolnih jedinjenja sadrži i druge nefenolne aktivne komponente. Zato se moraju uzeti u obzir i moguće sinergističke i antagonističke reakcije koje ova jedinjenja međusobno ostvaruju i tako utiču na antioksidativni potencijal (Chew i sar., 2011; Lianda, 2012; Hajimehdipoor i sar., 2014). Međutim, fenolna jedinjenja se smatraju glavnom grupom jedinjenja koja doprinose antioksidativnom kapacitetu. Antioksidativni potencijal fenolnih jedinjenja potiče od njihovih redoks svojstava, koji im omogućavaju da djeluju kao redukciona sredstva (Roman i sar., 2013).

Korelaciona analiza je rađena u cilju procjene uticaja sadržaja fenolnih jedinjenja, vitamina C kao i mikroelemenata na antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka šipurka (sjemenke, mesnati dio i plod) i ekstrakata ploda šipurka. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabelama od 10 do 13.

Tabela 10. Stepen korelacije ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i tanina i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima ploda šipurka

	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Ukupni fenoli</b>	$r=0,154315$	$r=0,511575$
<b>Flavonoidi</b>	$r=-0,23529$	$r=0,856503$
<b>Antocijani</b>	$r=-0,50911$	$r=0,966759$
<b>Tanini</b>	$r=-0,058009$	$r=0,747948$

Najveći stepen korelacije za uzorke sjemenki, mesnatog dijela i samog ploda imaju antocijani sa antioksidativnom aktivnošću mjenom DPPH metodom (umjeren,  $r=-0,50911$ ) i FRAP metodom (veoma jak,  $r=0,966759$ ). Negativan predznak (kod korelacije između antocijana i DPPH) ukazuje da što je veći sadržaj antocijana, manja je vrijednost DPPH odnosno veći antioksidativni potencijal. Takođe, rezultat od  $r=0,966759$  ukazuje da sadržaj antocijana mnogo utiče na antioksidativni potencijal ploda šipurka. Korelacija između ukupnih fenola i DPPH je veoma slaba ( $r=0,154315$ ), dok je sa vrijednostima dobijenim FRAP testom umjerena ( $r=0,511575$ ). Korelacija između flavonoida i vrijednosti dobijenih DPPH testom je veoma slaba ( $r=-0,23529$ ), dok je između flavonoida i

vrijednosti dobijenih FRAP testom jaka ( $r=0,856503$ ). Korelacija između tanina i vrijednosti dobijenih FRAP testom je jaka ( $r=0,747948$ ) za razliku od vrijednosti dobijenih DPPH testom gdje je veoma slaba ( $r=-0,058009$ ). Uočavaju se mnogo veće korelacije između pomenutih jedinjenja i vrijednosti dobijenih FRAP testom nego sa vrijednostima dobijenim DPPH testom.

Skrypnik i sar. (2019) su utvrdili Pearsonov koeficijent korelacije između ukupnih fenola i vrijednosti dobijenih DPPH testom od 0,248, što je približno rezultatu koji je dobijen u ovom master radu ( $r=0,154315$ ). Skrypnik i sar. (2019) su takođe utvrdili korelaciju između ukupnih fenola i vrijednosti dobijenih FRAP testom od 0,563, što se slaže sa vrijednošću dobijenom u ovom master radu ( $r=0,511575$ ).

Tabela 11. Stepen korelacije ukupnih fenola, flavonoida, tanina, vitamina C i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima šipurka

	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Ukupni fenoli</b>	$r=-0,34986$	$r=0,472353$
<b>Flavonoidi</b>	$r=-0,59303$	$r=0,390108$
<b>Tanini</b>	$r=-0,68006$	$r=0,768396$
<b>Vitamin C</b>	$r=-0,63136$	$r=0,892037$

Iz tebele 11 se uočava da najveći stepen korelacije sa vrijednostima dobijenim DPPH testom ima sadržaj tanina u ekstraktima (umjerena vrijednost korelacije  $r=-0,68006$ ), a sa FRAP vrijednostima najveći stepen korelacije ima vitamin C (veoma jak  $r=0,892037$ ). Umjerena korelacija je nađena između flavonoida i sposobnosti neutralizacije DPPH' ( $r=-0,59303$ ), a slaba između ukupnih fenola i vrijednosti dobijenih DPPH testom ( $r=-0,34986$ ).

Prikazani faktori korelacije pokazuju da je antioksidantna aktivnost ploda šipurka najverovatnije posledica sinergističkog djelovanja različitih klasa jedinjenja, uz dominantnu ulogu vitamina C, što potvrđuje prethodne zaključke da flavonoidi i organske kiseline prisutni u šipurku sprečavaju oksidaciju vitamina C i povećavaju njegovu stabilnost i biodostupnost u ljudskom organizmu (Adamczak i sar., 2012).

Stepen korelacije između identifikovanih pojedinačnih elemenata AAS metodom i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima šipurka i ekstraktima šipurka je dat u tabeli 12 i 13.

Tabela 12. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih elemenata odođenih AAS metodom i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima šipurka

	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Cu</b>	$r=-0,70614$	$r=-0,05441$
<b>Mn</b>	$r=-0,61801$	$r=0,548747$
<b>Fe</b>	$r=-0,6695$	$r=0,029521$
<b>Zn</b>	$r=-0,5494$	$r=-0,14024$

Uočava se negativna korelacija između pojedinačnih elemenata i antioksidativne aktivnosti određene DPPH testom. Jaka korelacija se uočava između vrijednosti dobijenih DPPH testom i bakra ( $r=-0,70614$ ). Umjerena korelacija je uočena između vrijednosti dobijenih DPPH testom i mangana ( $r=-0,61801$ ), vrijednosti dobijenih DPPH testom i gvožđa ( $r=-0,6695$ ), vrijednosti dobijenih DPPH testom i cinka ( $r=-0,5494$ ), između vrijednosti dobijenih FRAP testom i mangana ( $r=0,548747$ ). Slaba korelacija je uočena između vrijednosti dobijenih FRAP testom i cinka, gvožđa, bakra.

Tabela 13. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih elemenata odođenih AAS metodom i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima šipurka

	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Cu</b>	$r=-0,439$	$r=0,617236$
<b>Mn</b>	$r=-0,78397$	$r=0,899865$
<b>Fe</b>	$r=0,811964$	$r=-0,47085$
<b>Ni</b>	$r=-0,10949$	$r=-0,14847$
<b>Zn</b>	$r=-0,53718$	$r=0,829406$

Kada je u pitanju stepen korelacije između pojedinačnih elemenata određenih u ekstraktima i antioksidativne aktivnosti ekstrakata uočava se jak stepen korelacije između vrijednosti dobijenih DPPH testom i gvožđa ( $r=0,811964$ ), vrijednosti dobijenih FRAP testom i mangana ( $r=0,899865$ ), vrijednosti dobijenih FRAP testom i cinka ( $r=0,829406$ ). Umjeren stepen korelacije je nađen između vrijednosti dobijenih DPPH testom i mangana ( $r=-0,78397$ ), slab između vrijednosti dobijenih DPPH testom i cinka ( $r=-0,53718$ ), vrijednosti dobijenih DPPH testom i bakra ( $r=-0,439$ ), vrijednosti dobijenih FRAP testom i gvožđa ( $r=-0,47085$ ), vrijednosti dobijenih FRAP testom i bakra

( $r=0,617236$ ). Veoma slaba korelacija je između vrijednosti dobijenih DPPH testom i nikla ( $r=-0,10949$ ) i vrijednosti dobijenih FRAP testom i nikla ( $r=-0,14847$ ).

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu su ispitivani ukupni fenoli, flavonoidi, tanini, vitamin C, bakar, mangan, cink, gvožđe, olovo, nikl i antioksidativna aktivnost osušenih plodova, samoniklog šipurka *Rosa canina* L. sa područja Crne Gore (okolina Nikšića i Žabljaka). Analizirani su sledeći uzorci: sjemenke, mesnati delovi šipurka, plodovi šipurka, ekstrakti dobijeni različitim načinima ekstrakcije (Sokslet, infuz, maceracija i ultrazvučna ekstrakcija).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da najviše fenola, flavonoida, tanina, antocijana ima u mesnatom dijelu uzorka iz okoline Nikšića (upoređujući plod, sjemenke i mesnati dio šipurka). Plod šipurka iz Nikšića ima bolju antioksidativnu aktivnost/potencijal što je potvrđeno FRAP i DPPH testom, od ploda šipurka iz okoline Žabljaka. Pokazalo se da se infuz ekstrakcijom izoluje najviše fenola, flavonoida, tanina, vitamina C, kao i da infuz ekstrakti imaju najbolju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa maceratima, ultrazvučnim i Sokslet ekstraktima.

Mineralni sastav plodova određen je AAS metodom i nađeno je da plod iz okoline Nikšića sadrži veće koncentracije svih ispitivanih elemenata (bakra, mangana, gvožđa, olova, nikla, cinka) u poređenju sa plodom iz okoline Žabljaka. Kada se radi o ekstraktima, najveći sadržaj bakra, mangana i cinka je identifikovan u infuzima iz oba grada ali više u uzorku iz Nikšića; gvožđa ima najviše u ultrazvučnom ekstraktu iz Nikšića.

Za uzorke sjemenki, mesnatih delova i plodova šipurka nađena je veoma jaka korelacija između flavonoida i vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobijenih FRAP testom, kao i antocijana i vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobijenih FRAP testom. Takođe, jaka korelacija se uočava između antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom i bakra.

Veoma jak stepen korelacije utvrđen je između sadržaja vitamina C i antioksidativne aktivnosti ekstrakata mjerene FRAP testom. Kada je u pitanju stepen korelacije između pojedinačnih elemenata određenih u ekstraktima i antioksidativne aktivnosti ekstrakata uočava se jak stepen korelacije između antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom i gvožđa kao i između antioksidativne aktivnosti mjerene FRAP testom i mangana i cinka.

HPLC metodom je potvrđeno prisustvo galne, protokatehinske i elaginske kiseline, hiperozida, kvercetina, kvircitrina i rutina za oba uzorka, a epikatehin i epikatehin galat samo za plod šipurka sa Žabljaka. Najviše zastupljeno jedinjenje je galna kiselina kod oba uzorka.

Sekundarni metaboliti biljaka, uključujući mnoge biološki aktivne komponente spadaju u osjetljive komponente biljaka, čija zastupljenost zavisi od stanja životne okoline (zagađenja vazduha i zemljišta)



kao i od ekoloških uslova koji određuju rast i razvoj biljaka (temperatura, svjetlost, vlažnost itd), pa otuda i razlike u rezultatima dobijenim za plodove šipurka sa dva različita lokaliteta.

## 7. LITERATURA

1. Adamczak A., Buchwald W., Zieliński J., Mielcarek S., **2012**, Flavonoid and organic acid content in rose hip (*Rosa L.*, SECT. *Caninae* DC. EM. CHRIST.), *Acta Biologica Cracoviensia*, 54(1), 105-112
2. Ali A.H., **2022**, High- Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review, *Annals of advances in chemistry*, 6, 11-20
3. Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D.G., Lightfoot D.A., **2017**, Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts, *Plants*, 6(4), 1-23
4. Anđelković A.S.M., **2016**, Ekstrakcija, karakterizacija, biološka aktivnost i potencijalna primena fenolnih jedinjenja iz plodova i lišća biljnih vrsta porodice *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija
5. Arya P.S., Mahajan M., Jain P., **1998**, Photometric Methods for the Determination of Vitamin C, *Analytical Sciences*, 14, 889-895
6. Azahar N.I., Mokhtar N.M., Arifin M.A., **2020**, Piper betle: a review on its bioactive compounds, pharmacological properties, and extraction process, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991(1), 1-17
7. Bajić-Ljubičić J., **2018**, Varijabilnost sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova pet šumskih drvenastih vrsta sa različitih staništa u Srbiji, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
8. Bancuta O.R., Chilian A., Bancuta I., Ion R.M., Setnescu R., Setnescu T., Gheboianu A., **2016**, Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations, *Romanian Journal Physics*, 61 (7-8), 1255-1264
9. Benzie F.F., Strain J.J., **1999**, 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
10. Blois M.S., **1958**, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200
11. Bosilj P., **2022**, Morfološka i biokemijska svojstva plodova pasje ruže (*Rosa canina L.*) iz različitih regija Republike Hrvatske, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

12. Brašanac-Vukanović S., Mutić J., Stanković D.M., Arsić I., Blagojević N., Vukašinović-Pešić V., Tadić V., **2018**, Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., *Ericaceae*) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals, *Molecules*, 23(8), 1864
13. Bumbak J., **2021**, Fenolni sastav plodova roda Rosa, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Split, Hrvatska
14. Chemistry, Stack Exchange, 2019, Why should AAS use element lamps? <https://chemistry.stackexchange.com/q/115895>
15. Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M., Ho, C.W., **2011**, 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
16. Chrubasik C., Roufogalis B. D., Müller-Ladner U., Chrubasik S., **2008**, A Systematic Review on the Rosa canina Effect and Efficacy Profiles, *Phytotherapy Research*, 22, 725-733
17. Council of Europe, **2016**, Evropska farmakopeja, Eur. 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France.
18. Czyzowska A., Klewicka E., Pogorzelski E., Nowak A., **2015**, Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from *Rosa canina* L. and *Rosa rugosa* Thunb., *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 62-68
19. Daels-Rakotoarison D., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Luyckx M., Dine T., Bailleul F., Cazin M., Cazin J., **2002**, Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst, *Phytotherapy Research*, 16(2), 157-161
20. Decades, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 330(1), 1-19
21. Demir F., Özcan M, **2001**, Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey, *Journal of Food Engineering*, 47, 333-336
22. Dragović-Uzelac V., **2016**, Začinsko i aromatsko bilje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
23. Đorđević J., Maćej O., **1982**, Atomska apsorpciona spektrofotometrija i njena primena u određivanju mineralnog sastava mleka, *Mljekarstvo*, 32 (8), 233-242
24. Erenturk S., Gulaboglu S.M., Gultekin S., **2005**, The effects of cutting and drying medium on the vitamin C content of rosehip during drying ; *Journal of Food Engineering*, 68, 513–518
25. Fan C., Pacier C., Martirosyan M.D., **2014**, Rose hip (*Rosa canina* L.): A functional food perspective, *Functional Food in Health and Disease*, 4(11), 493-509

26. Fetni S., Bertella N., Ouahab A., **2020**, LC-DAD/ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in *Rosa canina* L. and Its Protective Effect in cells, *Wiley Analytical Science*, 34, 1-17
27. Fetni S., Bertella N., Ouahab A., Zapater M.M.J., Fernandez T.P.S., **2020**, Composition and biological activity of the Algerian plant *Rosa canina* L. by HPLC-UV-MS; *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 1105-1119
28. Fonmboh D.J., Abah E.R., Fokunang T.E., Herve B., Teke G.N., Rose N. M., Borgia N.N., Fokunang L.B., Andrew B.N., Kaba N., Bathelemy N., Ntungwen F.C., **2020**, An Overview of Methods of Extraction, Isolation and Characterization of Natural Medicinal Plant Products in Improved Traditional Medicine Research, *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 31-57
29. Ford L., Theodoridou K., Sheldrake N.G., Walsh P.J., **2019**, A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds; *Phytochemical Analysis*, 30, 587–599
30. Ghazghazi H., Miguel M., Weslati M., Hasnaoui B., Sebei H., sar., **2012**, Chemical variability of the essential oils from *Rosa canina* L. and *Rosa sempervirens* L. flowers collected at Tunisia, *Journal of Essential Oil Research*, 24(5), 475-780
31. Ghendov-Mošanu A., Cojocari D., Balan G., Sturza R., **2018**, Antimicrobial activity of Rose hip and hawthorn powders on pathogenic bacteria, *Journal of Engineering Science*, 25(4), 100-107
32. Ghendov-Mosanu A., Cristea E., Patras A., Sturza R., Niculaua M., **2020**, Rose hips, a valuable source of antioxidants to improve gingerbread characteristics, *Molecules*, 25(23), 1-18
33. Grajzer M., Prescha A., Korzonek K., Wojakowska A., Dziadas M., i sar., **2015**, Characteristics of rose hip (*Rosa canina* L.) cold-pressed oil and its oxidative stability studied by the differential scanning calorimetry method, *Food Chemistry*, 188, 459-466
34. Grgurić-Šipka S., **2014**, Hemija bioelemenata, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
35. Gruenwald J., Uebelhack R., Moré M., **2019**, *Rosa canina* – Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanics counteracting osteoarthritis – A systematic review, *Phytomedicine*, 60, 1-28
36. Guimarães R., Barros L., Carvalho A. M., Ferreira I. C. F. R., **2010**, Studies on Chemical Constituents and Bioactivity of *Rosa micrantha*: An Alternative Antioxidants Source for Food,

- Pharmaceutical, or Cosmetic Applications, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6277–6284
37. Gupta A., Naraniwal M., Kothari V., **2012**, Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts, *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)*, 1(1) 8-26
38. Hajimehdipoor H., Shahrestani R., Shekarchi M., **2014**, Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds, *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, 1(3), 35-40
39. Holer F.J., Crouch S.R., **2013**, Fundamental of Analytical chemistry 9E, Skoog | West
40. Igual M., Chiş M.S., Păucean A., Vondar D.C., Muste S., i sar., **2021**, Valorization of Rose Hip (*Rosa canina*) Puree Co-Product in Enriched Corn Extrudates, *Foods*, 10(11), 1-20
41. İlbay Z., Şahin S., Kirbaşlar Ş.İ., **2013**, Investigation of Polyphenolic Content of Rose Hip (*Rosa canina L.*) Tea Extracts: A Comparative Study; *Foods*, 2, 43-52
42. Izawa K., Amino Y., Kohmura M., Ueda Y., Kuroda M., **2010**, Comprehensive Natural Products II, 4, 631-671 (<https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00108-8>)
43. Javanmard M., Asadi-Gharneh A.H., Nikneshan P., **2018**, Characterization of biochemical traits of dog rose (*Rosa canina L.*) ecotypes in the central part of Iran, *Natural Product Research*, 32(14), 1738-1743
44. Jelikić-Stankov M., Kapetanović V., Karljiković-Rajić K., Aleksić M., Ražić S., Uskoković-Marković S., Odović J., **2010**, Kvantitativna hemijska analiza, Farmaceutski fakultet, Beograd
45. Jemaa H.B., Jemia A.B., Khlifi S., Ahmed H.B., Slama F.B., i sar., **2017**, Antioxidant activity and A-amylase inhibitory potential of *Rosa canina L.*, *African Journal Traditional Complementaey and Alternnative Medicines*, 14(2), 1-8
46. Jovanov P., **2014**, Optimizacija metoda ekstrakcije i određivanja neonikotinoida tečnom hromatografijom u odabranim uzorcima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija
47. Kayahan S., Ozdemir Y., Gulbag F., **2022**, Functional Compounds and Antioxidant Activity of *Rosa* Species Grown In Turkey, *Erwerbs-Obstbau*, 1-8
48. Kazaz S., Baydar H., Erbas S.; **2009**, Variations in Chemical Compositions of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa canina L.* Fruits; *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 178-184

49. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M., **2017**, Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, *Food and Nutrition Research*, 61, 1-21
50. Kim J., Choi K., Chung D.S., **2012**, Sample Preparation for Capillary Electrophoretic Applications, *Analytical Techniques for scientists*, 3, 701-721
51. Koraqi H., Qazimi B., Česko C., Petkoska A.T., **2022**, Environmentally Friendly Extraction of Bioactive Compounds from *Rosa canina* L. fruits Using Deep Eutectic Solvent (DES) as Green Extraction Media; *Acta Chimica Slovenica*, 69, 1-9
52. Krstić N.J., **2017**, Mineralni i polifenoni profil zelenog, crnog, biljnih i voćnih filter čajeva i njihov antioksidativni kapacitet, Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija
53. Kubczak M., Khassenova A.B., Skalski B., Michlewska S. i sar., **2020**, Non-food crop *Rosa canina* L. leaf and twig extracts as a source of nutrients and bioactive compounds, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz
54. Kumar K., Srivastav S., Sharanagat V.S., **2021**, Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 1-11
55. Kunno R., Ruangviriyachai C., Chanthai S., **2009**, Sample Preparation for Trace Analysis of Iron, Copper and Zinc in Thai Fruit Wines by ICP-AES, *Walailak Journal of Science and Technology*, 6(2), 243-254
56. Latinović S., Brkljača M., Vujasin M., Kukrić Z., Odžaković B., **2020**, The potential bioactivity of the wild grown rešehip (*Rosa canina* L.) and pomerganate (*Punica granatum* L.), *Advanced Technologies*, 9(2), 14-18
57. Lianda R.L.P., Sant' Ana L.D.O., Echevarria A., Castro R.N., **2012**, Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 618–627
58. Liaudanskas M., Noreikienė I., Zymonė K., Juodytė R., Žvikas V., Janulis V., **2021**, Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Fruit of the Genus *Rosa* L., *Antioxidants*, 10, 1-17
59. Lovrić S., (2014), Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurija u Osijeku, Osijek, Hrvatska
60. Marjoni M.R., Zulfisa A., **2017**, Antioxidant Activity of Methanol Extract/Fractions of Senggani Leaves (*Melastoma candidum* D. Don), *Pharmaceutica Analytica Acta*, 8(8), 1-6

61. Merkulov D.Š., Abramović B., Armaković S., Finčur N., **2021**, Hromatografske metode analize, udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
62. Mihaylova D., Georgieva L., Pavlov A., **2015**, Antioxidant activity and bioactive compounds of *Rosa canina* L. herbal preparations, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 14, 160-165
63. Milošević Z.A., **2019**, HPLC analiza ekstrakata ruzmarina. Validacija metode, Master rad, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija
64. Moldovan C., Babota M., Mocan A., Menghini L., Cesa S., i sar., **2021**, Optimization of the drying process of autumn fruits rich in antioxidants: A study focusing on rosehip (: *Rosa canina* L.) and sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) and their bioactive properties, *Food and Function*, 12(9), 3939-3953
65. Montazeri N., Baher E., Mirzajani F., Barami Z., Yousefian S., **2011**, Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran, *Journal of Medicinal Plants Research*; 5(18), 4584-4589
66. Mukherjee P.K., **2019**, Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs, *Evaluation Natural Products and Traditional Medicine*, 79-149
67. Murathan Z.T., Zarifikhosroshahi M., Kafkas E., Sevindik E., **2016**, Characterization of bioactive compounds in Rosehip species from East Anatolia region of Turkey, *Italian Journal of Food Sciences*, 28, 314-325
68. Mussatto S. I. **2015**, Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin; *Coffee in Health and Disease Prevention*, 93–106 doi:10.1016/b978-0-12-409517-5.00011-5
69. Nađpal J., **2017**, Fitohemijski skrining i biološka aktivnost ekstrakata i tradicionalnih proizvoda od plodova divljih ruža (*Rosa* L.; Rosaceae), Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija
70. Nađpal J., Lesjak M., Šibul F., Anačkov G., Četojević-Simin D., Mimica-Dukić N., Beara I., **2016**, Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds, *Food Chemistry*, 192, 907-914
71. Nojavan S., Khalilian F., Kiaie F., Rahimi A., Arabanian A., Chalavi S., **2008**, Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 300-305

72. Oprica L., Busca C., Zamfirache M.M., **2015**, Ascorbic Acid Content of Rose Hip Fruit Depending on Altitude, *Iran Journal Public Health*, 44(1), 138-139
73. Özcan M., **2002**, Nutrient Composition of Rose (*Rosa canina* L.) Seed and Oils, *Journal of medicinal food*, 5(3), 137-140
74. Patel M., Dave K., Patel P., **2021**, A review on different extraction method of plants: Innovation from ancient to modern technology, *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 10 (12), 511-527
75. Paunović D., Mirković D., Rabrenović B., Petrović T., Rajić J., Veljović M., **2014**, Stabilnost vitamina C u proizvodima od šipurka (*Rosa canina* L.) i mogućnost valorizacije ulja iz semenki ploda, *Journal of Pomology*, 48, 55-60
76. Pavlović R.D., **2012**, Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabраних biljnih vrsta rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna Salisb.* i *Erica* L. (Ericaceae), Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
77. Perteši A., **2014**, Potencijal neutralizacije DPPH radikala kao merilo antioksidantne aktivnosti ploda zimzelene divlje ruže (*Rosa sempervirens* L.), Diplomski rad, Univerzitet u Novom Sadu Novi Sad, Srbija
78. Poljarec K., **2017**, Proizvodnja biljnih ekstrakata, Prehrambeno-biotehnički fakultet Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
79. Polumackanycz M., Kaszuba M., Konopacka A., Marzec-Wróblewska U., Wesolowski M. i sar., **2020**, Phenolic Composition and Biological Properties of Wild and Commercial Dog Rose Fruits and Leaves, *Molecules*, 25, 1-15
80. Pregiban K., **2017**, Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska
81. Rivero-Cruz F.J., Granados-Pineda J., Pedraza-Chaverri J., Perez-Rojas J.M., Kumar-Passari A. i sar., **2020**, Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Extract of Mexican Brown Propolis, *Antioxidants*, 9, 70
82. Roman I., Stănilă A., Stănilă S., **2013**, Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania, *Chemistry Central Journal*, 7, 1-10
83. Rovná K., Ivanišová E., Žiarovská J., Ferus P., Terentjeva M., Kowalczewski P., Kačániová M., **2020**, Characterization of *rosa canina* fruits collected in urban areas of Slovakia. Genome size, IPBS profiles and antioxidant and antimicrobial activities, *Molecules*, 25(8), 1-16



84. Rudraswamy S., Godhi B.S., Shankar H.P.J., Kenganora M., Sumana M.N., **2021**, Detailed Understanding of Different Extraction Methods for the Research on Medicinal Plants, *Indian Journal of Oral Health and Research*, 7(1), 14-20
85. Sabahi Z., Hasan S.M.F., Ayatollahi S.A., Farmani F., Asfari A., Moein M., **2022**, Improvement of Phenolic Compound Extraction by Using Ion Exchange Chromatography and Evaluation of Biological Activities of Polyphenol-enriched Fraction of *Rosa canina* Fruits, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 21(1), 1-10
86. Saygı O. K., **2021**, Quantitative Analysis of Phenolic Compounds and Mineral Contents of *Rosa canina* L. Waste Seeds, *Turkish Journal of Agriculture*, 9(6), 1120-1123
87. Seifi M., Abbasalizadeh S., Mohammad-Alizadeh-Charandabi S., Khodaie L., Mirghafourvand M., **2018**, The effect of Rosa (L. *Rosa canina*) on the incidence of urinary tract infection in the puerperium: A randomized placebo-controlled trial, *Phytotherapy Research*, 32(1), 76-83
88. Selahvarzian A., Alizadeh A., Baharvand A.P., Eldahshan O.A., Rasoulilian B., **2018**, Medicinal Properties of *Rosa canina* L., *Journal of Herbal Medicine*, 3, 1-8
89. Şendil O., **2006**, Effect of some parameters on the extraction and decomposition of ascorbic acid from the rosehip, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 61-72
90. Serteser A., Kargioğlu M., Gök V., Bağcı Y., Özcan M., Arslan D., **2008**, Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7-8), 643-651
91. Sheraz M.A., Ahmed S., Ahmad I., **2007**, Developments in the clinical and food analysis of vitamin C, *Baqai Journal of Health Sciences*, 10(2), 19-24
92. Skrypnik L., Chupakhina G., Feduraev P., Chupakhina N., Maslennikov P., **2019**, Evaluation of the rose hip of *Rosa canina* L. and *Rosa Rugosa* thumb. As a valuable source of biological active compounds and antioxidants on the Baltic Sea coast, *Polish Journal of Sciences*, 34(3), 395-413
93. Stanić L., **2017**, Bioaktivne komponente ploda pasje ruže (*Rosa canina* L.), Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
94. Stănilă A., Diaconeasa Z., Roman I., Sima N., Măniuțiu D., Roman A., Sima R., **2015**, Extraction and Characterization of Phenolic Compounds from Rose Hip (*Rosa canina* L.) Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization - Mass Spectrometry; *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*; 43(2), 349–354

95. Stevanović D.Z., Stešević D. i Pljevljakušić D., **2016**, Regionalni priručnik za skupljače ljekovitog bilja, Opština Plužine (Crna Gora), Opština Ljubovija (Srbija), ISBN 978-9940-9552-0-5
96. Sudhakar P., Latha P., Reddy P.V, **2016**, Phenotyping Crop Plants for Physiological and Biochemical Traits, 121-127 (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804073-7.00015-6> )
97. Tahirović A., Bašić N., **2017**, Determination of phenolic content and antioxidant activity of *Rosa canina* L. fruits in different extraction systems, *Works of the Faculty of Forestry, University of Sarajevo*, 1, 47-59
98. Taneva I., Petkova N., Dimov I., Ivanov I., Denev P., **2016**, Characterization of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Fruits Extracts and Evaluation of Their *in vitro* Antioxidant Activity, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2), 35-38
99. Tihelka T., **2022**, Upotreba divljeg šipka (*Rosa canina* L.) u prehrani i tradicionalnoj medicine, Završni rad, Sveučilište Sjever, Koprivnica, Hrvatska
100. Tomaljnović M., **2000**, Instrumentalne hemijske metode, U. G. HIJATUS , Zenica
101. Truffault V., Gest N., Garchery C., Causse M., Duboscq R., Riqueau G., i sar., **2014**, Variation in Tomato Fruit Ascorbate Levels and Consequences of Manipulation of Ascorbate Metabolism on Drought Stress Tolerance, *Acta Horticulturae*, 1048, 75-84
102. Tumbaš T.V., Čanadanović-Brunet M.J., Četojević-Simin D.D., Četković S.G., Đilas M.S., Gille L., **2012**, Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1273-1281
103. Tumbaš T.V., Čanadanović-Brunet M.J., Gille L., Đilas M.S., Četković S.G., **2012**, Characterization of the free Radical Scavenging Activity of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Extract, *International Journal of Food Properties*, 15, 188-201
104. Türkben C., Uylaşer V., İncedayı B., Çelikkol I., **2010**, Effects of different maturity periods and processes on nutritional components of rose hip (*Rosa canina* L.), *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(1), 26-30
105. Varelis P., Melton L., Shahidi F., **2018**, Encyclopedia of Food Chemistry, *Elsevier*
106. Vasić D., Trifunović Š.B., Pećinar I., Paunović D., Đorojević P.J., **2021**, Chemical Characterization of *Rosa canina* L. Rosehip Seed: Application of Raman Spectroscopy and Gas Chromatography, *Biology and life sciences forum*, 3(1), 1-6
107. Veličković J., 2013, Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

108. Vural A., **2015**, Biogeochemical characteristics of *Rosa canina* grown in hydrothermally contaminated soils of the Gümüşhane Province, Northeast Turkey, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(8), 1-21
109. Washko W.P., Welch W.R., Dhariwal R.K., Wang Y., Levine M., **1992**, Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid Analyses in Biological Samples, *Analytical Biochemistry*, 204, 1-4
110. Wei S., Zhou Q., Wang X., **2005**, Identification of weed plants excluding the uptake of heavy metals. *Environment International*, 31, 829-834
111. Wenzig E., Widowitz U., Kunert O., Chrubasik S., Bucar F., Knauder E., Bauer R., **2008**, Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations, *Phytomedicine*, 15(10), 826-835
112. Winther K., Campbell-Tofte J., Vinther Hansen A., **2016**, Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and anti-inflammatory properties: in vitro studies, *Botanics: Targets and Therapy*, 6, 11-23
113. Wojtunik-Kulesza K.A., **2020**, Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes, *Molecules*, 25(22), 1-11
114. Zaporozhets O. A., Krushinskaya E. A., **2002**, Determination of Ascorbic Acid by Molecular Spectroscopic Techniques, *Journal of Analytical Chemistry*, 57(4), 286–297
115. Živković J., Stojković D., Petrović J., Zdunić G. Glamočlija J., Soković M., **2015**, *Rosa canina* L.-new possibilities for an old medicinal herb, *Food and Function*, 6 (12), 3687-3692