

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

STUDENTSKI RAD

Ana Legac

Ivan Ljubičić

Zagreb, svibanj 2011.

Mentor: prof. dr. sc. Draženka Komes

**INOVATIVNE FORMULACIJE ČAJNIH MJEŠAVINA
S PRIRODNIM SLADILIMA- KARAKTERIZACIJA
NUTRITIVNOG SASTAVA I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI**

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

INOVATIVNE FORMULACIJE ČAJNIH MJEŠAVINA S PRIRODNIM SLADILIMA- KARAKTERIZACIJA NUTRITIVNOG SASTAVA I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Ana Legac 141/ PI

Ivan Ljubičić 78/ PI

Sažetak: Budući da se suvremeni način života povezuje s neadekvatnom prehranom, sve veći interes potrošača usmjeren je na funkcionalne prehrambene proizvode među kojima biljne infuzije zauzimaju važnu ulogu. Cilj ovoga rada bio je kreirati nove formulacije čajnih mješavina baziranih na uporabi tradicionalnih ljekovitih biljaka (list kupine, list maline i list šumske jagode) uz dodatak prirodnih sladila. Razvijeno je devet čajnih mješavina koje, kao izvore sladila, sadrže suho voće (jabuka, šljiva, smokva, grožđice i marelica), suho povrće (mrkva i batat) te suhe listiće stevije i korijen sladića. Provedene su brojne analize u cilju karakterizacije fizikalnih svojstava čajnih mješavina (određivanje nasipne gustoće, boje, svojstava tečenja) te nutritivnog sastava (određivanje udjela ugljikohidrata, mineralnih tvari, pigmenata, ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina te pojedinačnih polifenolnih spojeva), biološke aktivnosti (određivanje antioksidacijskog kapaciteta, citotoksičnosti, slobodnih kisikovih radikala) i senzorskih svojstava pripremljenih biljnih infuzija. S obzirom na raznolikost korištenih prirodnih sirovina i kompleksnost sastava sve novokreirane formulacije bogat su izvor bioaktivnih spojeva (polifenola, biljnih pigmenata, mineralnih tvari) izražene biološke aktivnosti. Inovativne biljne infuzije atraktivne su arome, punog okusa i uravnotežene slatkoće, u odnosu na čiste bazne infuzije, te predstavljaju poželjne funkcionalne proizvode pogodne za konzumaciju potrošača svih dobnih skupina upotpunjujući njihov dnevni unos visokovrijednih nutrijenata.

Ključne riječi: biljne infuzije, čajne mješavine, funkcionalni proizvod, prirodna sladila

Rad sadrži: 117 stranica, 46 slika, 20 tablica, 96 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Dr. sc. Draženka Komes, izv. prof.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Technology

Laboratory for Carbohydrate and confectionery products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INNOVATIVE FORMULATIONS OF TEA BLENDS WITH NATURAL SWEETENERS – CHARACTERIZATION OF NUTRITIONAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Ana Legac 141/ PI

Ivan Ljubičić 78/ PI

Abstract: Since modern lifestyle is associated with inadequate diet, an increasing consumer interest is directed towards functional food products whereas herbal infusions have an important role. The objective of this study was to create novel tea mixture formulations based on traditional medicinal plants (blackberry, raspberry and wild strawberry leaves) with the addition of natural sweeteners. Nine tea mixtures were developed, which contain dried fruits (apple, prunes, figs, raisins and apricots), dried vegetables (carrot and batat), dried stevia leaves and liquorice root as sweetener sources. Numerous analyses were performed in order to provide a detailed characterisation of their physical properties (bulk density, colour and flow properties determination), nutritive profile (determination of carbohydrates, minerals, total phenols, flavonoids, flavan-3-ols, proanthocyanidins and specific polyphenolic compounds), biological activity (antioxidant capacity, cytotoxicity and free oxygen radical determination), and sensory properties. Considering the diversity of used plant derived raw materials for the preparation of tea mixtures, all novel created formulations present a rich source of bioactive compounds (polyphenols, minerals, plant pigments) with high biological activity. Innovative tea formulations exhibit excellent sensory properties, owing to the enhanced aroma profiles, full flavor and balanced sweetness, in relation to the pure base infusions, and they represent a desirable functional products suitable for consumers of all ages completing their daily intake of high-quality nutrients.

Keywords: herbal infusions, tea blends, functional products, natural sweeteners

Thesis contains: 117 pages, 46 figures, 20 tables, 96 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Draženka Komes, Associated Professor

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Funkcionalna hrana	3
2.2.1. Sušeno voće i povrće – prirodni izvori sladila	9
2.2.2. Stevija (<i>Stevia rebaudiana</i>)	11
2.2.3. Batat (<i>Ipomoea batatas</i> , L.)	12
2.2.4. Sladić (<i>Glycyrrhiza glabra</i>).....	13
2.2.5. Mrkva (<i>Daucus carota</i> , L.)	14
2.3. Uporaba funkcionalnih svojstava biljnih metabolita	15
2.3.1. Fenolni spojevi i njihov značaj	16
2.3.2. Načini djelovanja sekundarnih biljnih metabolita.....	17
2.4. Biljne infuzije	20
2.4.1. List maline (<i>Rubus idaeus folium</i>).....	20
2.4.2. List kupine (<i>Rubus fruticosus folium</i>).....	22
2.4.3. List šumske jagode (<i>Fragaria vesca folium</i>).....	23
3.1. MATERIJAL.....	24
3.1.1. Uzorci čajnih mješavina	24
3.1.2. Kemikalije	27
3.1.3. Aparatura i pribor	29
3.2. METODE RADA	30
3.2.1. Anketa	30
3.2.2. Određivanje fizikalnih svojstava čajnih mješavina	31
3.2.3. Određivanje bioaktivnog sastava čajnih mješavina	35
3.2.4. Određivanje udjela flavan-3-ola	42
3.3.6. Određivanje proantocijanidina metodom Bate – Smith	44
3.3.7. Određivanje udjela polifenola metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	45
3.4. Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	46
3.5. Određivanje biološke aktivnosti	47

3.5.1. FRAP metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta	47
3.5.3. DPPH metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta.....	49
3.5.4. Određivanje citotoksičnog učinka biljnih infuzija na humanu staničnu liniju	50
karcinoma debelog crijeva.....	50
3.6. Senzorska analiza biljnih infuzija	54
4. Rezultati	56
4.1. Anketa	56
4.2. Određivanje fizikalnih svojstava	59
4.2.1. Određivanje nasipne gustoće čajnih mješavina	59
4.2.2. Određivanje svojstava tečenja čajnih mješavina	59
4.2.3. Određivanje boje čajnih mješavina.....	60
4.3. Određivanje bioaktivnog sastava čajnih mješavina	61
4.3.1. Određivanje udjela mineralnih tvari u čajnim mješavinama atomskom	61
spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu.....	61
4.3.2. Određivanje udjela pigmenata u čajnim mješavinama	63
4.3.3. Određivanja udjela ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida	64
4.3.4. Određivanje udjela flavan-3-ola u biljnim infuzijama	65
4.3.5. Određivanje udjela proantocijanidina metodom po Bate – Smithu	66
4.3.6. Određivanje udjela polifenola metodom tekućinske kromatografije visoke	67
djelotvornosti	67
4.4. Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	71
4.5. Određivanje biološke aktivnosti	73
4.5.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta čajnih mješavina	73
4.5.2. Određivanje citotoksičnog učinka biljnih infuzija na humanu staničnu liniju	75
karcinoma debelog crijeva.....	75
4.6. Senzorska analiza biljnih infuzija	80
4.6.1. Senzorska analiza biljnih infuzija lista maline, kupine i šumske jagode	80
5. RASPRAVA	84
5.1. Anketa	84
5.2. Određivanje fizikalnih svojstava čajnih mješavina.....	85

5.2.1. Određivanje nasipne gustoće čajnih mješavina	85
5.2.2. Određivanje svojstava tečenja čajnih mješavina	86
5.2.3. Određivanje boje čajnih mješavina.....	87
5.3. Određivanje bioaktivnog sastava čajnih mješavina	88
5.3.1. Određivanje pigmenata	88
5.3.3. Određivanje udjela ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida	92
5.3.4. Određivanje udjela flavan-3-ola	93
5.3.5. Određivanje proantocijanidina hidrolizom po Bate – Smith-u.....	93
5.3.6. Određivanje udjela polifenola metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	94
5.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija	97
5.5.1. FRAP metoda	97
5.5.2. ABTS metoda	98
5.5.3. DPPH metoda	99
5.5.4. Određivanje citotoksičnog učinka biljnih infuzija na humanu staničnu liniju karcinoma debelog crijeva	100
3.6. Senzorska analiza biljnih infuzija	102
6. Zaključci.....	104
7. Literatura.....	108

1. UVOD

1. UVOD

Suvremeni način života često se povezuje s neadekvatnom prehranom koja uključuje konzumiranje proizvoda bogatih različitim sladilima, najčešće ugljikohidratima (Corti, 1999). Saharoza je, kao jedan od najpoznatijih ugljikohidrata, prisutna u većini proizvoda u kojima utječe na njihovu teksturu i konzistenciju, no ipak, kao glavni uzrok pretilosti, dijabetesa i pojave zubnog karijesa, nastoji se zamijeniti drugim sladilima. Tijekom posljednjih 30 godina učestalost pretilosti dramatično se povećala među djecom i odraslima (Mermel, 2004) te je povećan interes potrošača za zdravim načinom života koji uključuje održavanje normalne tjelesne mase uravnoteženom prehranom i adekvatnom tjelesnom aktivnošću. Danas se na tržištu može naći mnoštvo prehrambenih proizvoda manjenog udjela šećera (*light* proizvodi), no, ti proizvodi vrlo često sadrže različita umjetna sladila (acesulfam K, aspartam, ciklamati i sl.). Za razliku od umjernih, prirodna, nerafinirana sladila, biljnog su podrijetla, bogata su vitaminima i mineralnim tvarima, povoljno djeluju na gastrointestinalni sustav, osiguravaju organizmu potrebnu energiju, povoljno djeluju na tegobe dišnog sustava i smiruju živce (Sherman, 2003). Prirodna sladila biljnog podrijetla također značajno doprinose funkcionalnom konceptu prehrambenih proizvoda budući da su niskoenergijska, nekariogena, bogata prirodnim pigmentima i polifenolima te uz značajan antioksidacijski učinak, ne povećavaju glikemijski indeks.

Na tržištu funkcionalnih prehrambenih proizvoda, koje je u stalnom porastu, funkcionalni napitci zauzimaju velik udio što je u skladu s potrebama suvremenog čovjeka koji sve manje konzumira zaslađene gazirane napitke, a preferira kavu, čaj i biljne infuzije. Iako se tek posljednjih nekoliko godina i u Hrvatskoj počela popularizirati konzumacija čaja, preferencije potrošača su više usmjerene na biljne infuzije koje imaju dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini. Biljne infuzije su, uz kavu i čaj, izrazito bogati izvori bioaktivnih sastojaka, posebice polifenola kao najznačajnijih antioksidansa, no, zbog njihovog visokog udjela ujedno su i gorkog okusa. Budući da je osjet slatkoće među najpoželjnijim senzorskim karakteristikama, u želji da smanje osjet gorčine i postignu željenu slatkoću potrošači te napitke, kao i druge prehrambene proizvode, zaslađuju različitim, najčešće ugljikohidratnim sladilima.

Stoga je svrha ovoga rada kreirati nove formulacije čajnih mješavina baziranih na tradicionalnim ljekovitim biljkama (list kupine, list maline, list šumske jagode) uz dodatak prirodnih sladila (sušeno voće, povrće, listići stevije, korijen sladića).

Kako bi se dobio cjelovit uvid u funkcionalnost novokreiranih formulacija čajnih mješavina, primjenom mnogobrojnih analitičkih tehnika provest će se detaljna karakterizacija njihovih fizikalnih svojstava (određivanje nasipne gustoće, boje, svojstva tečenja), nutritivnog sastava (određivanje udjela ugljikohidrata, mineralnih tvari, pigmenata, ukupnih fenola, flavonoida, flavan-3-ola i proantocijanidina te pojedinačnih polifenolnih spojeva), biološke aktivnosti (određivanje antioksidacijskog kapaciteta, citotoksičnosti, slobodnih kisikovih skupina) te senzorskih svojstava.

Objedinjujući tradiciju i potrebe suvremenog čovjeka, inovativne biljne infuzije predstavljat će atraktivne funkcionalne napitke poželjne arome, punog, kompleksnog okusa i uravnotežene slatkoće, popularne među svim dobnim skupinama potrošača.

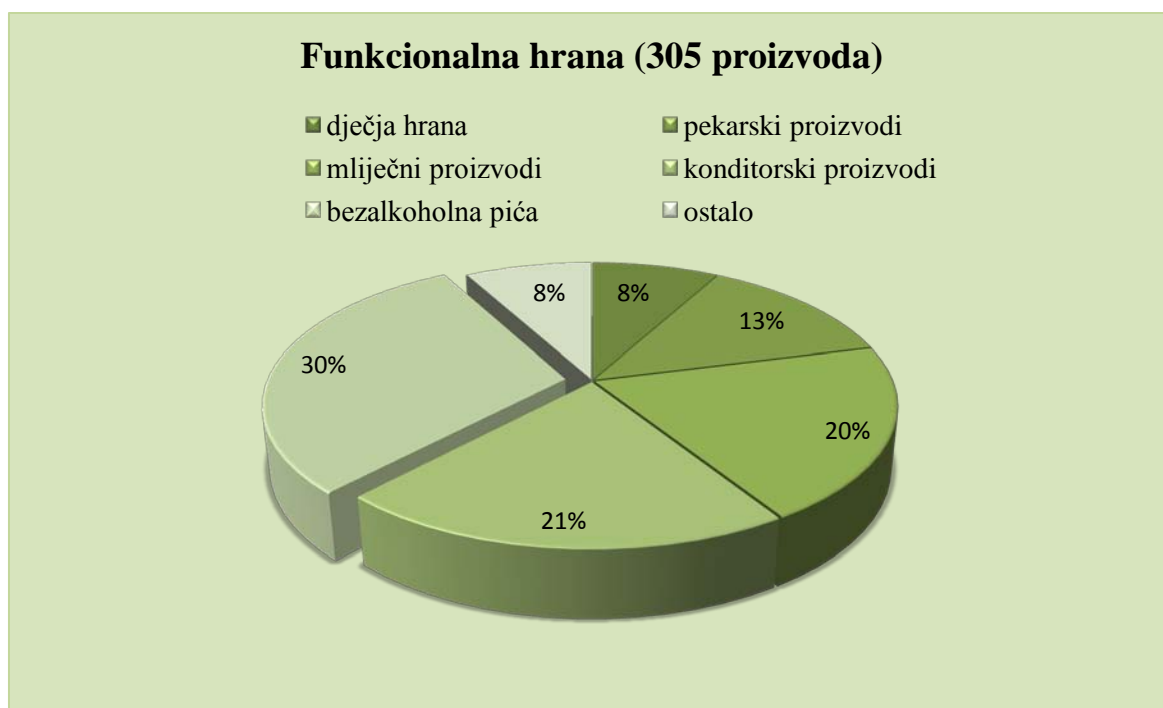
2. TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Funkcionalna hrana

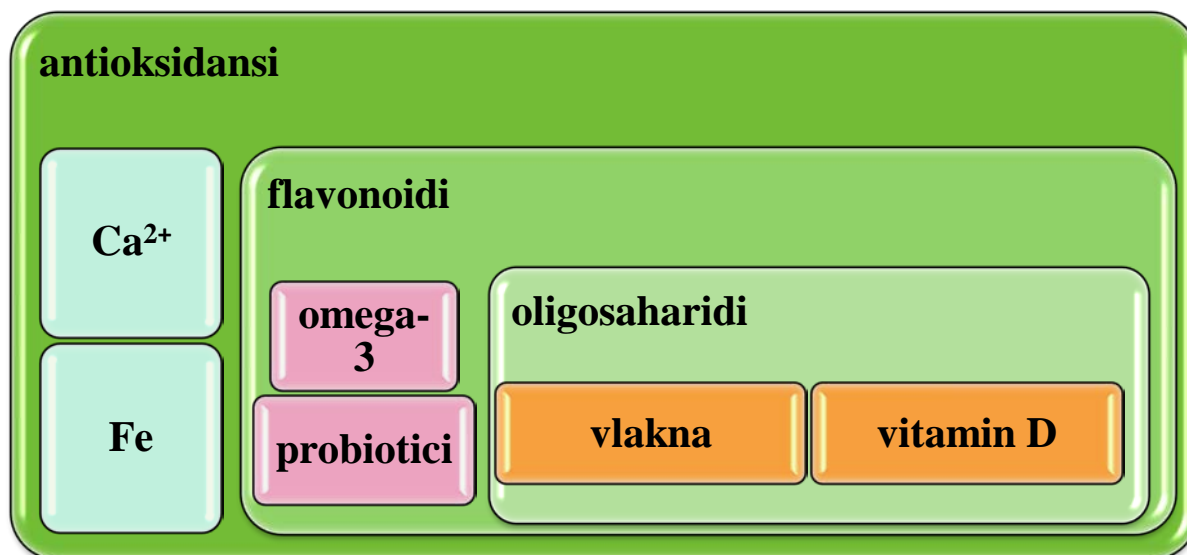
Pojam funkcionalna hrana prvi je puta uveden u Japanu 1980. godine i Japan je prva zemlja koja je zakonskom regulativom definirala funkcionalnu hranu. Opće prihvaćena definicija funkcionalne hrane u znanstvenim krugovima je: „funkcionalna hrana je ona koja sadrži bioaktivne sastojke za koje je znanstveno utvrđeno da imaju povoljno djelovanje na zdravlje ljudi”. Do 2001. godine Japan je registrirao čak 271 različiti prehrambeni proizvod FOSHU statusa (Food for Specified Health Use). Funkcionalna hrana je osmišljena u svrhu smanjivanja rizika od specifičnih bolesti kao što je karcinom, uklanjanjem određenih sastojaka, dodavanjem sastojaka koji nisu prirodno prisutni u određenom prehrambenom proizvodu ili koncentriranjem sastojaka u količinama većim od uobičajenih. Kreiraju se prehrambeni dodaci u cilju zamjene ili smanjenja udjela masti i šećera, što se povezuje s prevencijom kardiovaskularnih bolesti. Na globalnoj razini najveći je porast broja funkcionalnih napitaka budući da su oni prepoznati kao najbolji medij za funkcionalne sastojke. Tržište funkcionalnih napitaka obuhvaća veliku paletu proizvoda, od energetskih do biljnih infuzija, voćnih sokova, mliječnih proizvoda, *smoothies* (svježe iscijeđeni sokovi od voća i povrća) i sl. Niskokalorični funkcionalni napitci ključni su segment razvoja brzorastućeg tržišta funkcionalne hrane, na kojem bi primjena prirodnih sladila trebala zauzeti izuzetno važnu poziciju. Prirodna sladila su niskoenergijska, nekariogena, njihov dodatak ne mijenja svojstva proizvoda a imaju i izražena antioksidacijska svojstva (Cock i Bechert, 2002).

Do sada je velik broj funkcionalnih proizvoda u raznolikim oblicima uveden na tržište (slika 1). Mnogi od njih sadrže karakteristične funkcionalne sastojke kao što su dijetalna vlakna, oligosaharidi, šećerni alkoholi, peptidi i proteini, prebiotici i probiotici, bioaktivni sastojci i antioksidansi te polinezasićene masne kiseline (Li Day et al., 2008). Područje razvoja funkcionalnih prehrambenih proizvoda različitih regija svijeta ovisi o prehrambenim navikama stanovništva.



Slika 1. Noviteti prehrambene industrije na njemačkom tržištu (Menrad, 2002)

Prihvatljivost specifičnih funkcionalnih sastojaka (vitamini, minerali, vlakna, kalcij, željezo i sl.) od strane potrošača povezano je sa njihovim saznanjima o zdravstvenim učincima pojedinih sastojaka (slika 2) (Menrad, 2002).



Slika 2. Funkcionalni sastojci koje potrošači najviše percipiraju (Menrad, 2002)

Pravila uspješne proizvodnje i plasiranja prehrambenih proizvoda promijenila su se posljednjih desetak godina. Danas je imperativ funkcionalne hrane originalna ideja i dobar marketing, a proizvodi koji imaju povoljan učinak na zdravlje imaju dodatnu prednost. Zdravstveno i prehrambeno osviješteni potrošači diktiraju razvoj novih proizvoda. Moderni funkcionalni napitci odraz su novih dinamičnih trendova u prehrambenoj industriji. Od bezalkoholnih napitaka više se ne očekuje samo osvježanje, nego se zahtjevaju i dodatni pozitivni učinci njihovog konzumiranja na očuvanje zdravlja i ljepote. Zdravstveni učinci pojedinih funkcionalnih prehrambenih proizvoda primarno ovise o „aktivnim” sastojcima koji im se dodaju u obliku izoliranih sastojaka i ekstrakata iz prehrambenih proizvoda ili biljaka. Što je više znanstvenih dokaza o pozitivnim učincima određenih sastojaka to je veći interes za njihovu primjenu u funkcionalnim proizvodima (Bender, 2008), uzimajući u obzir i prirodne komponente i pojedinačne porcije serviranja (slika 3).



Slika 3. Tendencija na tržištu funkcionalnih proizvoda

Aktivni sastojci koji su dovoljno istraženi i kojima je dokazana učinkovitost i neškodljivost mogu biti nosioci zdravstvene tvrdnje koju odobrava mjerodavno tijelo. Neki od pozitivnih primjera funkcionalnih proizvoda na tržištu su primjerice fermentirani mliječni napitci s dodatkom probiotičkih bakterija i neprobavljivih vlakana (prebiotika), napitci obogaćeni antioksidansima i folnom kiselinom, *juice* od naranče obogaćen kalcijem za čvrste kosti ili biljnim sterolima koji povoljno djeluju na razinu kolesterola. Ti proizvodi rezultat su čvrstih znanstvenih dokaza iza kojih stoji velik broj znanstvenih studija koje su dokazale povoljno djelovanje na zdravlje. Neki od funkcionalnih proizvoda prikazani su na slici 4.

a)



bezalkoholna pića u kombinaciji s različitim sastojcima:

- badem, orah, crni grah, pinjoli, đumbir i zeleni čaj

- ugodan miris
- bogat okus
- ublažava kašalj i bol u mišićima
- blagotvorni učinak na psihofizičko zdravlje

b)



Slika 4. Biljne infuzije dizajnirane u svrhu opuštanja (a), stimulacije ili terapije (b)

(Anonymous 1)

2.2. Sladila

Tvari za zaslađivanje ili sladila su tvari koje dodane hrani nadopunjuju ili stvaraju sladak okus. Obično se dijele na zamjene za šećer (poliole) i umjetna sladila ili samo sladila (NN 173/04). Osim zdravstvenog učinka odabir sladila se provodi i prema tehnološkim svojstvima i cijeni te vrsti proizvoda za koji su namijenjeni. Tvari za zaslađivanje su nadomjestak šećeru te bitno smanjuju energijsku vrijednost namirnice. Zamjena za šećer ili smanjena kalorijska vrijednost pomažu pojedinim skupinama ljudi da reguliraju energijski unos a da pritom ne smanjuju unos namirnica, odnosno da pri bolesnim stanjima organizma, kod kojih je ograničen unos šećera, i dalje uživaju u slatkom okusu. Međutim, vrlo često se u sastavu niskoenergijskih prehrambenih proizvoda nalaze umjetna sladila koja imaju visok intenzitet slatkoće pa ih je potrebno koristiti u znatno manjem udjelu da se postigne slatkoća ekvivalentna istoj saharoze, koja se uzima kao referentna supstanca. Budući da su umjetna sladila dobivena sintetskim putem, a koncept funkcionalne hrane se vezuje uz zdrav način života, interes potrošača usmjeren je na prirodna sladila koja već zbog same činjenice da su biljnog podrijetla imaju značajnu prednost u odabiru određenog prehrambenog proizvoda (Mitchell, 2006). Podjela sladila prikazana je na slici 5.



Slika 5. Podjela sladila prema energijskoj vrijednosti, kemijskoj strukturi, porijeklu i intenzitetu slatkoće (Mitchell, 2006)

Zašto “NE” umjetnim sladilima?

Postoji velik broj poznatih intenzivnih sladila, no samo mali broj udovoljava zakonskoj regulativi u modernoj prehrambenoj industriji. Popis dozvoljenih umjetnih sladila varira od zemlje do zemlje. Primjerice, u EU postoji lista koja uključuje 6 umjetnih sladila visokog inteziteta čija je uporaba dozvoljena (acesulfam K, aspartam, ciklaminska kiselina i njene soli, saharin i njegove soli, sukraloza, neohesperdin dihidrohalkon), dok u SAD-u taj isti popis ne uključuje ciklamate i NHDC (neohesperidin dihidrohalkon), ali se tamo na popisu može pronaći i neotam. Umjetna sladila visokog intenziteta koja su naveliko promovirana od strane prehrambene industrije, ubrajaju se među najkontroverznije prehrambene sastojke zbog sumnje da izazivaju nepovoljne zdravstvene efekte kao što su dermatološki problemi, glavobolje, promjene raspoloženja, promjene u ponašanju, poteškoće s disanjem, alergije pa čak i karcinom. Tako su primjerice provedena brojna istraživanja o sigurnosti saharina (kod životinja) i ciklamata kod kojeg je problem složeniji, jer različiti ljudi metaboliziraju ovo sladilo na različite načine. Stoga je zbog sigurnosti potrošača potrebno kontrolirati sadržaj sladila u hrani i njihov unos u organizam (Zygler i sur., 2009).

Zašto prirodna sladila?

Konsumacija napitaka zaslađenih šećerom može uzrokovati brojne metaboličke poremećaje, među kojima se, kao najučestaliji, navodi pretilost, ali i dijabetes i zubni karijes. Stoga je zamjena šećera drugim sladilima, posebice prirodnima, od velike socijalne i gospodarske važnosti (Cadore i sur., 2010), jer osim kontrole tjelesne mase može utjecati na prevenciju drugih metaboličkih poremećaja (Anton i sur., 2010).

Prirodna sladila pružaju širok spektar pozitivnih zdravstvenih učinaka kao što su:

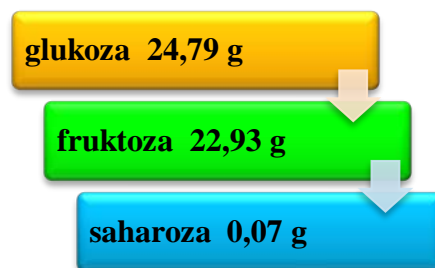
- smanjenje rizika od pojave zubnog karijesa
- potencijalno lakša obnova karijesnih lezija
- smanjenje energijske vrijednosti
- smanjenje rizika od pojave karcinoma debelog crijeva (Mitchell, 2006).

2.2.1. Sušeno voće i povrće – prirodni izvori sladila

Kao posljedica koncentracije sastojaka tijekom sušenja, sušeno voće ima veću ukupnu energiju, viši udio nutrijenata, a često i znatno veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi sa svježim voćem (Bennett i sur., 2011). Zbog dominantnog udjela reducirajućih šećera u sastavu (tablica 1), uporaba sušenog voća i povrća kao izvora prirodnih sladila, od velikog je značaja. Među sušenim voćem posebice su popularne smokve, grožđice, marelice, jabuke i šljive, dok je među povrćem značajan izvor sladila mrkva i batat. U novije vrijeme izrazito se povećava i popularnost biljke *Stevia rebaudiana*, dok sladić već ima dugu tradiciju primjene u terapijske svrhe i kao sladilo.

2.2.1.1. Smokva

Smokva, u svježem ili sušenom obliku, sadrži visok udjel ugljikohidrata i prehrambenih vlakana, željeza, kalcija i kalija (Rinzler, 1999). Udjel ukupnih šećera iznosi 47,92 g na 100 g voća i to prema slijedećim udjelima:



2.2.1.2. Grožđice

Grožđice su koncentrirani izvor ugljikohidrata, bogate su prehrambenim vlaknima, antioksidansima i mineralnim tvarima, među kojima su najzastupljeniji kalij i željezo (Mattern i sur., 2008). Udio ukupnih šećera iznosi 59,19 g na 100 g voća, pri čemu najveći udio otpada na fruktozu (29,68 g) i glukozu (27,75 g), a najmanji na saharozu (0,45 g).

2.2.1.3. Marelica

Marelica je voće porijeklom iz Kine koje se vrlo dobro prilagodilo mediteranskim uvjetima a koje se konzumira širom svijeta zbog svoje ugodne arome i mirisa. Osim atraktivne arome koja je rezultat brojnih hlapljivih spojeva poput terpena, alkohola, laktona i benzaldehida (Sanchez i sur., 2007), marelica je značajno prirodno sladilo.

Udjel ukupnih šećera u suhom plodu marelice iznosi 53,44 g na 100 g voća. Najveći je udjel glukoze (33,08 g) koju slijedi fruktoza (12,47 g), dok je najmanje zastupljena saharoza (7,89 g).






2.2.1.4. Jabuka

Jabuke sadrže mnoge komponente za koje je dokazan pozitivan učinak na ljudsko zdravlje kao što su šećeri, šećerni alkoholi, organske kiseline, aminokiseline i fenolni spojevi. Izbalansiran odnos udjela šećera i organskih kiselina odgovoran je za okus i aromu jabuke, dok fenolni spojevi i vitamici C povisuju njezin antioksidacijski kapacitet (Cheng i sur., 2010). Jabuka je bogata mineralom kalijem (622 mg), aminokiselinama lizinom (66 mg) te fenilalaninom i tirozinom (59 mg) (Kulier, 2001).

2.2.1.5. Šljiva

Udjel ukupnih šećera u suhoj šljivi iznosi 38,13 g na 100 g voća, pri čemu najveći udio čini glukoza (25,46 g), zatim fruktoza (12,45 g), a najmanji saharoza (0,15 g). Bogata je kalijem (732 mg), fosforom (69 mg) i magnezijem (41 mg) (USDA, 2011).

Tablica 1. Prikaz kemijskog sastava suhog voća (Kulier, 2001)

	SMOKVA	GROŽĐICE	MARELICA	JABUKA	ŠLJIVA
					
Glukoza	24,79 g	27,75 g	33,08 g	/	25,46 g
Fruktoza	22,93 g	29,68 g	12,47 g		12,45 g
Saharoza	0,07 g	0,45 g	7,89 g		0,15 g
Vitamini	C 2,5 mg Folna kis. 14 µg β-karoten 51 µg	C 2,3 mg K 3,5 mg	β-karoten 4620 µg Folna kis. 5,1 µg	Nikotinska kis. 0,8 mg	β-karoten 670 µg Nikotinska kis. 1,73 mg
Minerali	K 850 mg Ca ²⁺ 193 mg Na ⁺ 40 mg	K 749 mg F 234 mg P 101 mg	K 1370 mg P 114 mg Mg ²⁺ 50 mg	K 622 mg P 50 mg Ca ²⁺ 30 mg	K 824 mg P 73 mg Ca ²⁺ 41 mg

Također, suho voće ima nizak glikemijski indeks: smokva (61), grožđice (54), marelica (30), jabuka (29) i šljiva (29).

2.2.2. Stevija (*Stevia rebaudiana*)



Kraljevstvo:	<i>Plantae</i>
Podkraljevstvo:	<i>Tracheobionta</i>
Odjel:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred:	<i>Asteridae</i>
Red:	<i>Asterales</i>
Porodica:	<i>Asteraceae</i>
Rod:	<i>Stevia</i> Cav.
Vrsta:	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni

(USDA, 2011).

Slika 6. Stevija, *Stevia rebaudiana* (Anonymous 2)

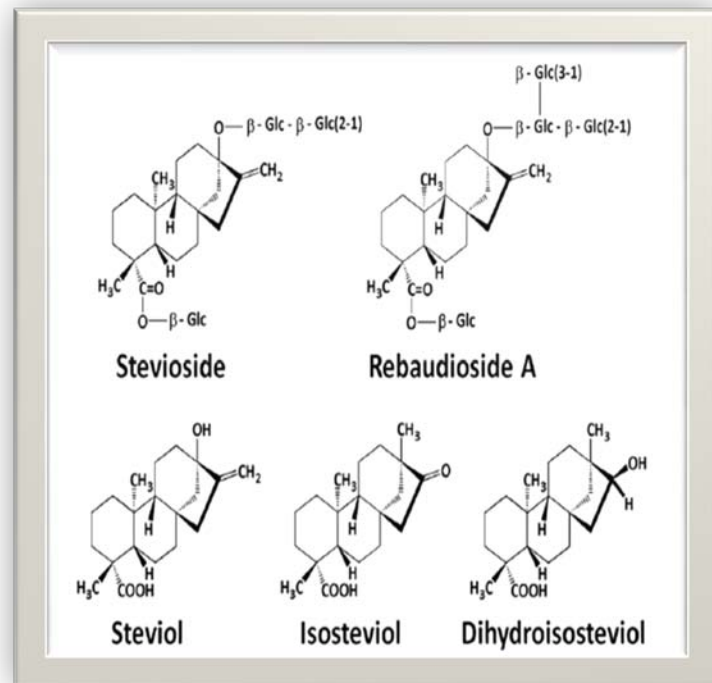
Stevia rebaudiana Bertoni (slika 4) je slatka biljka koja pripada obitelji *Compositae*, rodnom iz Južne Amerike, no također se uzgaja u Kini i jugoistočnoj Aziji, a od 1925. godine nalazi se na popisu ljekovitih biljaka. Ekstrakti lišća koriste se za zaslađivanje bezalkoholnih pića, soje, sojinih umaka, jogurta i druge vrste hrane u Koreji, Japanu i Brazilu. Suhi ekstrakt lista stevije sadrži alkaloidne, flavonoide, klorofile, ksantofile, hidroksicimetne kiseline (kava kiselina, klorogenska kiselina itd.), oligosaharide, slobodne šećere, aminokiseline, lipide i elemente u tragovima (Muanda i sur., 2010). Listovi biljke *Stevia rebaudiana* slatkog su okusa i sadrže veliki broj aktivnih komponenti, od kojih su najvažniji steviozid i rebaudiozid A. Obje komponente su glikozidi steviola i u probavnom se traktu hidroliziraju do steviola koji se apsorbira i topljiv je u mastima (Renwick, 2008).

Steviozid/rebaudiozid A

Steviozid i njegov analog, rebauozid A, su diterpenski glikozidi koji sadrže aglikol steviol a nastaju u listovima biljke *Stevia rebaudiana* čije je stanište tipično za sjeverno područje Paragvaja u Južnoj Americi. Rebaudiozid A je topljiviji, sadrži više polarnih skupina i daje čišći okus, više nalik saharozi, za razliku od steviozida koji je gorčeg okusa.

Izdvajanje glikozida iz lišća počinje vodenom ekstrakcijom, nakon čega slijedi selektivna ekstrakcija polarnim organskim otapalom, dekolorizacija, uklanjanje nečistoća, ionska izmjena i konačno kristalizacija (Mitchell, 2006). Steviozid je postao poznat po svojoj intenzivnoj slatkoći (250 - 300 puta je slađi od saharoze) te se koristi kao nekalorični zaslađivač u nekoliko zemalja.

Brojne studije pokazale su da, osim slatkoće, steviozid uz srodne spojeve, koji uključuju rebaudiozid (drugi najčešći sastojak *S. rebaudiana* lista), steviol i izosteviol (slika 7), također ima brojne pozitivne zdravstvene učinke kao antihiperглиkemijsko, antihipertenzivno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje (Chatsudthipong i sur., 2009).



Slika 7. Strukturni prikaz steviozida i kemijski srodnih spojeva (Chatsudthipong i sur., 2009)

2.2.3. Batat (*Ipomoea batatas*, L.)



Kraljevstvo:	<i>Plantae</i>
Podkraljevstvo:	<i>Tracheobionta</i>
Odjel:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred:	<i>Asteridae</i>
Red:	<i>Solanales</i>
Porodica:	<i>Convolvulaceae</i>
Rod:	<i>Ipomoea</i> L.
Vrsta:	<i>Ipomoea batatas</i> , L. (USDA, 2011).

Slika 8. Batat, *Ipomoea batatas* L. (Anonymous 3)

Slatki krumpir (slika 8) bogat je prehranbenim vlaknima, mineralnim tvarima, vitaminima i antioksidansima poput fenolnih kiselina, antocijana, tokoferola i β - karotena. Osim antioksidacijskog djelovanja, karotenoidi i fenolni spojevi također su odgovorni za različite karakteristične boje mesa slatkog krumpira (kremastu, žutu, narančastu i ljubičastu) (Teow i sur., 2007). Batat je važan izvor ugljikohidrata te bi mogao biti važna namirnica u uvjetima preživljavanja (za vrijeme gladi). Čaj od lista batata preporučuje se za poboljšanje glikemijskog indeksa (posebno dobro za dijabetičare), kod osoba koje pate od slabokrvnosti (preporučeno s medom), za ublažavanje probavnih tegoba, za poboljšanje funkcija gušterače i jetre te za spriječavanje nesаницe (Byamukama i sur., 2004).

Kemijski sastav batata:

70 % suhe tvari

30% suha tvar (od toga 80-90% ugljikohidrati: škrob, fruktoza, glukoza i saharoza)

2.2.4. Sladić (*Glycyrrhiza glabra*)



Kraljevstvo:	<i>Plantae</i>
Podkraljevstvo:	<i>Tracheobionta</i>
Odjel:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred:	<i>Rosidae</i>
Red:	<i>Fabales</i>
Porodica:	<i>Fabaceae</i>
Rod:	<i>Glycyrrhiza</i> L.
Vrsta:	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.

(USDA, 2011).

Slika 9. Sladić, *Glycyrrhiza glabra* (Anonymous 4)

Sladić (slika 9) je višegodišnja biljka visine do 1 m s razgranatim rizomima i drvenastim stabljikama koja nosi složene listove i svjetlo-ljubičaste ili bijele cvjetove.

U biljci se nalaze mnoge aktivne tvari kao što su flavonoidi, izoflavonoidi i halkoni. Glavni flavonoidi i halkoni u svježem korijenu (likvirtin i izolikvirtin) su djelomično hidrolizirani nakon sušenja. Najzastupljeniji triterpenski saponin je glicirizinska kiselina (2-15%) i njen aglikon, gliciretinska kiselina, koja se javlja s 24-hidroksigliceretinskom kiselinom (50-100 puta slađa od šećera) i nekolicinom drugih saponina. Osim što djeluje kao ekspektorans, sladić ima protuupalno, antivirusno, antibakterijsko, citotoksično, antihepatoksično, antioksidacijsko i antihistaminsko djelovanje (Wyk i sur., 2004). Glicirizinska kiselina jedan je vodećih prirodnih spojeva koji se, prema posljednjim studijima, koristi u kliničkim ispitivanjima u borbi protiv kroničnog virusnog hepatitsa i HIV-a. Na temelju tih razmatranja, određivanje i selektivna ekstrakcija glicirizinske kiseline iz korijena sladića, postalo je od velikog interesa (Puoci i sur., 2010). Korijen sladića sadrži 81% ugljikohidrata među kojima je najzastupljenija glukoza (16,2%), galaktoza (14,9%), arabinoza (11,5%), manozna (6,9%), a prisutna je i glukuronska kiselina (18,8%) (Hensel i sur., 2009).

2.2.5. Mrkva (*Daucus carota*, L.)



Kraljevstvo:	<i>Plantae</i>
Podkraljevstvo:	<i>Tracheobionta</i>
Odjel:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred:	<i>Rosidae</i>
Red:	<i>Apiales</i>
Porodica:	<i>Apiaceae</i>
Rod:	<i>Daucus</i> L.
Vrsta:	<i>Daucus carota</i> L.

(USDA, 2011).

Slika 10. Mrkva, *Daucus carota* L. (Anonymous 5)

Mrkva (slika 10) je povrće koje se u širokom rasponu konzumira u sirovom ili kuhanom obliku zbog svog ugodnog okusa ali i brojnih nutrijenata koji su u mrkvi prisutni u visokim udjelima. Mrkva se većinom sastoji od vode (oko 90% svježe mase) i ugljikohidrata, na koje


otpada 5% jestivog djela mrkve. Osim terpenoida, ugljikohidrati su najvažniji sastojci koji doprinose prihvatljivosti ovog povrća od strane potrošača. Kao što je poznato, glukoza, fruktoza i saharoza su glavni šećeri zastupljeni u mrkvi te su objavljena mnoga opsežna istraživanja njihove prisutnosti u različitim vrstama mrkve ovisno o različitim uvjetima obrade i skladištenja. Sušena mrkva najbogatija je saharozom (406,8 mg/g suhe mrkve), glukozom (194,4 mg/g suhe mrkve), fruktozom (175,8 mg/g suhe mrkve) i manitolom (0,9 mg/g suhe mrkve) (Villamiel i sur., 2008). Osim što je bogata β -karotenom, mrkva sadrži i značajne količine vitamina A, C, E, B₁, B₂, B₆ i B₁₂ te polifenola, što se povezuje s antikancerogenim i antioksidacijskim svojstvima (Chang i sur., 2007).

2.3. Uporaba funkcionalnih svojstava biljnih metabolita

Različite vrste biljaka imaju različit sastav i udjel bioaktivnih komponenata te stoga i različito djelovanje na ljudski organizam. Raznolikost biljnog svijeta i prisutnost velikog broja biljnih vrsta upućuje na potrebu određivanja bioaktivnih komponenata i pozitivnih bioloških učinaka (Kris-Etherton i sur., 2002). Biljni pripravci imaju dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini. Djelotvorna doza biljnih pripravaka izrazito se razlikuje od toksične doze, za razliku od čistih kemijskih spojeva, koji su visoko koncentrirani pa se dostatna doza lako premašuje. Većina ljekovitog bilja koristi se u kratkom periodu (do tri tjedna) za liječenje različitih lakših bolesti. Postoje određena stanja gdje je potrebno nekoliko tjedana da bi pripravak postao djelotvoran npr. kod kroničnih bolesti kao što su blaga depresija, loša cirkulacija, lakši oblici astme te neki oblici dijabetesa. Svježi biljni pripravci rijetko se koriste za liječenje ozbiljnih zdravstvenih stanja (iznimka su neke zemlje trećeg svijeta gdje je ograničen pristup modernim lijekovima) nego se koriste pažljivo testirani i standardizirani „biljni preparati“ te izolirani sastojci svježih biljaka. Ljekovito bilje osigurava lako dostupan izvor primarne zdravstvene zaštite milijunima ljudi širom svijeta (tablica 2). Moderni trendovi u razvoju prehrambenih proizvoda usmjereni prema funkcionalnoj hrani također sve više ističu prirodne dodatke biljnog podrijetla (Wyk i Wink., 2004). Biljni pripravci pripremaju se iz biljaka koje sadrže specifične kemijske spojeve ili češće mješavinu kemijskih spojeva koje djeluju na prevenciju zdravstvenih poremećaja ili se koriste u terapijske svrhe. Bioaktivni spojevi su nutritivne komponente koje se obično u malim udjelima pojavljuju u hrani, ali konzumiranje proizvoda bogatih bioaktivnim sastojcima doprinosi brojnim pozitivnim

zdravstvenim učincima, posebice prevenciji carcinoma i kardiovaskularnih spojeva. Najvažniji bioaktivni kemijski spojevi u ljekovitom bilju su vitamini, mineralne tvari, aminokiseline, alkaloidi te polifenoli kao najznačajniji sekundarni biljni metaboliti (Kris-Etherton i sur., 2002).

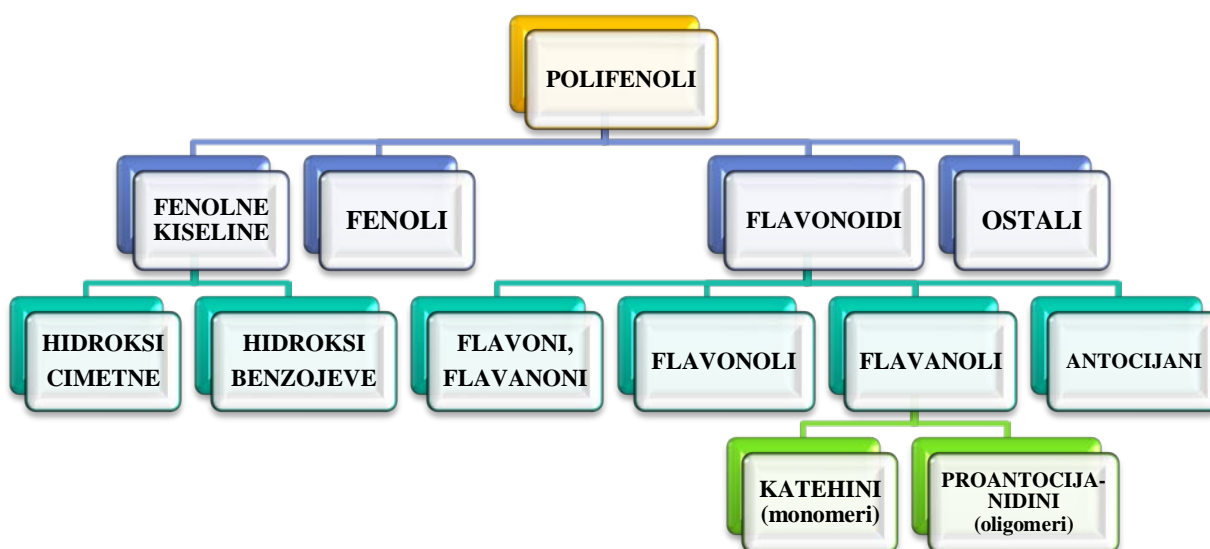
Tablica 2. Veličina globalnog tržišta suplemenata u milijunima \$ (Wyk i Wink., 2004)

	Vitamini i minerali	Homeopatski i specijalni proizvodi, proizvodi za sportaše	Funkcionalna hrana	Ljekovito bilje i biljni lijekovi
Japan	3200	1280	11830	2340
SAD	7070	4230	16080	4070
Europa	5670	2510	15390	4070
UKUPNO (računajući sve regije svijeta)	19620	9960	47670	17490

2.3.1. Fenolni spojevi i njihov značaj

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti koje sintetiziraju biljke tijekom normalnog razvoja i kao odgovor na stresne uvjete kao što su infekcije, oštećenja i UV zračenje. Ti spojevi nastaju u svim djelovima biljke i predstavljaju vrlo raznoliku skupinu bioaktivnih spojeva nastalih iz fenilalanina i tirozina. Polifenoli (slika 11), zastupljeni u biljkama, dijele se na jednostavne fenole, fenolne kiseline (derivate benzojeve i cimetine kiseline), kumarine, flavonoide, stilbene, hidrolizirane i kondenzirane tanine, lignane i lignine (Shadidi i Nacz, 2004). Važni su konstituenti prehrambenih proizvoda biljnog porijekla. Ovi spojevi su odgovorni za senzorska svojstva namirnica kao što su okus, astrigentnost i boja. Osim toga, prisustvo fenolnih spojeva u prehrani je od velikog značaja zbog njihove izražene antioksidacijske aktivnosti, prevencije razvoja karcinogeneze i mutageneze (Muñoz i sur.,

2009). Polifenoli imaju važnu ulogu u očuvanju senzorskih svojstava namirnica tijekom termalne obrade sirovina. Poznavanje polifenolnog sastava hrane i njihovih promjena tijekom skladištenja i procesiranja od presudne je važnosti za osiguranje kvalitete hrane. Antocijani su odgovorni za crvenu, plavu i ljubičastu boju mnogih namirnica, uključujući voće i povrće, dok flavanoli i tanini sudjeluju u formiranju njihovih okusa (astrigentnost) i gorčini (Safi i sur., 2003).



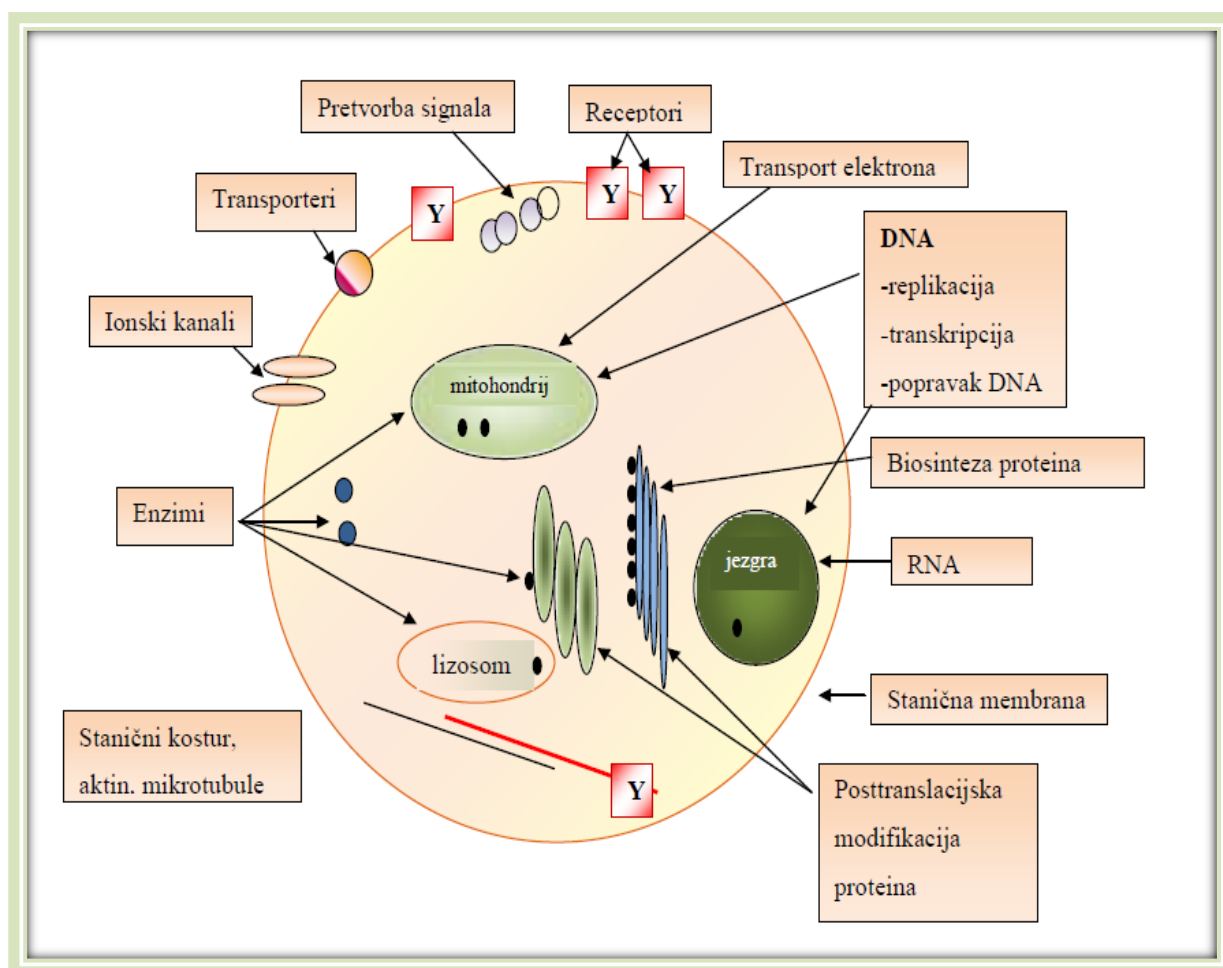
Slika 11. Podjela fenolnih spojeva (Escarpa i sur., 2001)

2.3.2. Načini djelovanja sekundarnih biljnih metabolita

Čovječanstvo upotrebljava brojne sekundarne biljne metabolite već tisućama godina, bilo kao boje (npr. indigo), arome (npr. vanilin, kapsaicin), mirise (npr. ružino i lavandino ulje), halucinogene (npr. morfin, kokain), insekticide (npr. nikotin, piperin), otrove (npr. akonitin, konin), te ono najvažnije, kao terapijske tvari (npr. atropin, kodein). Kako bi bili učinkoviti u terapiji, sekundarni metaboliti moraju interferirati s organom, tkivom te naposljetku s molekularnim mjestom djelovanja u ljudskom tijelu. Uobičajeno su sekundarni metaboliti multifunkcionalni spojevi zato što većina njih sadrži više od jedne farmakološki aktivne kemijske grupe, a vrlo često se pojavljuju u složenim mješavinama. Stoga, prilikom konzumacije, ekstrakti ljekovitih biljaka često istovremeno zahvaćaju više od jednog molekularnog mjesta djelovanja. To je posebno važno kod složenih poremećaja budući da

ovakvi ekstrakti povećavaju vjerojatnost pozitivnih učinaka na nekoliko relevantnih područja (Wyk i Wink., 2004).

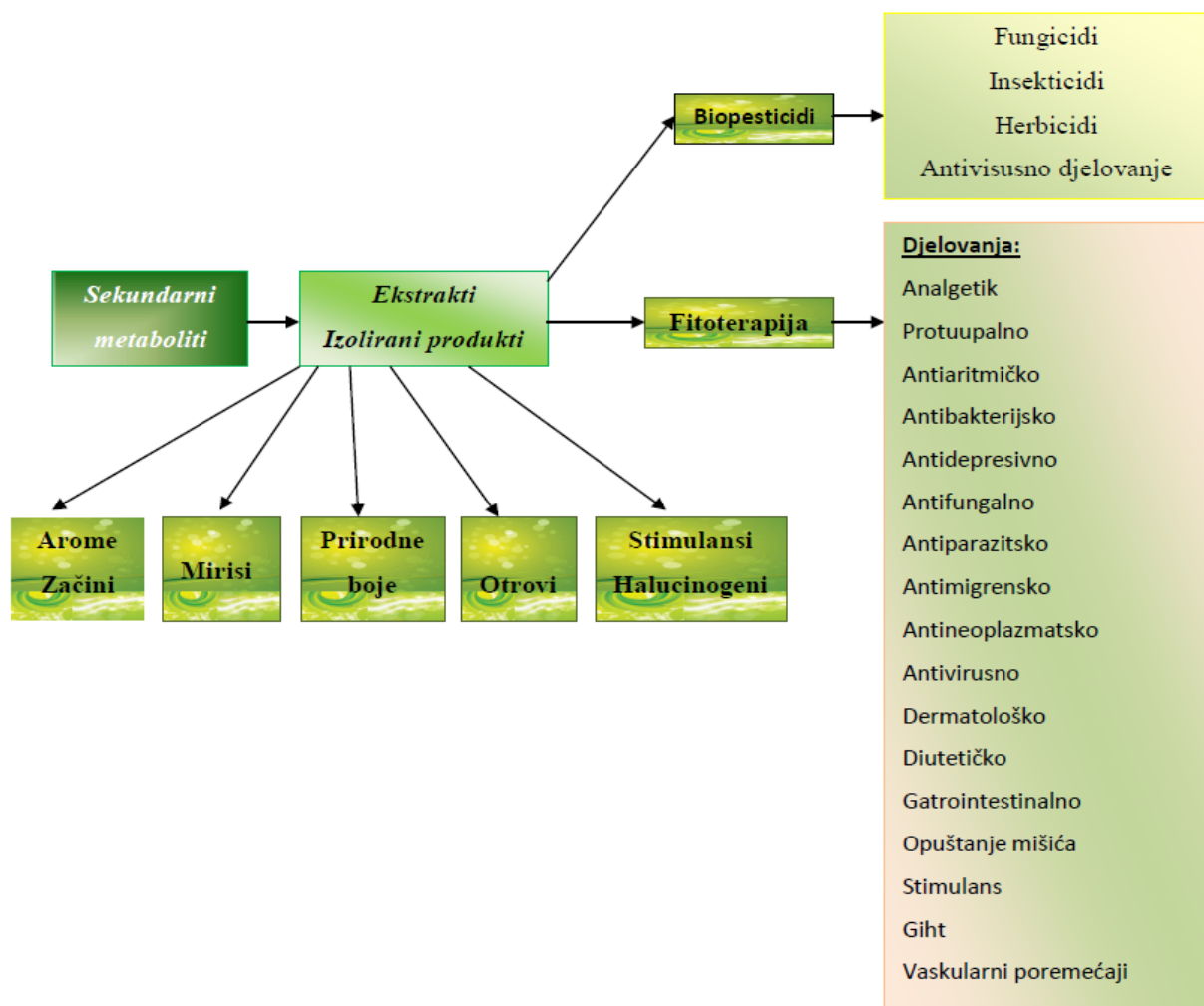
Zabilježene su razlike kemijskog sastava između biljnih jedinki iste populacije, a iste su još izraženije između jedinki različitih populacija. Čak i male razlike u kemijskom sastavu mogu biti osnova za novu farmakološku aktivnost biljke što je važno kod kontrole njihove kvalitete. Slika 12. prikazuje ljudsku stanicu sa pregledom glavnih molekularnih meta aktivnih spojeva ljekovitih biljaka (Wyk i Wink, 2004).



Slika 12. Glavne “molekularne mete” zahvaćene djelovanjem ljekovitog bilja (Wyk i Wink, 2004)

Pretpostavlja se da su komponente kao što su alelotvari (alelokemikalije) evolucijom oblikovane na način da mogu podraživati endogene supstrate, hormone, neurotransmitere ili druge ligande. Drugi metaboliti dopunjuju ili alkiliraju DNA, inhibiraju DNA i RNA enzime,

biosintezu proteina, moduliraju metabolički aktivne enzime ili remete stabilnost membrane. Zbog ovakvih interakcija, biljni pripravci mogu interferirati sa poremećajima pojedinih organa (srce i cirkulacija, želudac i probavni trakt, pluća, jetra, bubrezi), upalama i infekcijama. Općenito, često se pronalazi niz povezanih spojeva u nekoliko glavnih metabolita i nekolicini manje zastupljenijih, koji se razlikuju u položaju kemijskih skupina. Profil često varira ovisno o biljnom organu, o periodu vegetacije, ponekad čak i period unutar dana. Biološka raznolikost biljnih metabolite i načini djelovanja prikazani su na slici 13. Zbog tradicionalnog pristupa uporabi „pravih” biljaka u „pravim” koncentracijama za održavanje zdravlja ili ublažavanje simptoma zdravstvenih poremećaja i smetnji, fitoterapija postaje sve važniji dio suvremenog načina života (Wyk i Wink, 2004).



Slika 13. Raznolikost prirodnih metabolita i njihova biološka svojstva (Wyk i Wink, 2004)

2.4. Biljne infuzije

Biljne infuzije imaju dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini i postaju sve značajniji funkcionalni napitci konzumacijom kojih na jednostavan način organizmu osiguravamo prijekopotrebne nutrijente. Pripremaju se ekstrakcijom uglavnom osušenog i usitnjenog bilja kipućom vodom kroz 10 do 30 minuta. Različite biljne vrste koriste su u medicinske svrhe, kao konzervansi i sastojci kozmetičkih preparata (Djeridan i sur., 2006; Beuchat, 1994; Nakatani, 1994; Cutler, 1995). Istraživanja provedena na velikom broju raznog ljekovitog bilja pokazala su da imaju antioksidacijsko, antimikrobno, protuupalno, antikancerogeno i antimutageno djelovanje na probavni sustav koje je povezano s udjelom fenolnih spojeva u njihovom sastavu. Većina znanstvenih istraživanja bavila se proučavanjem svojstava metvice, matičnjaka, kadulje i majčine dušice, međutim, mali je broj provedenih istraživanja vezan uz listove maline, kupine i šumske jagode, a ona provedena, pokazala su da te biljke imaju izražena antioksidacijska svojstva koja su rezultat širokog spektra polifenolnih spojeva u njihovom sastavu.

2.4.1. List maline (*Rubus idaeus folium*)

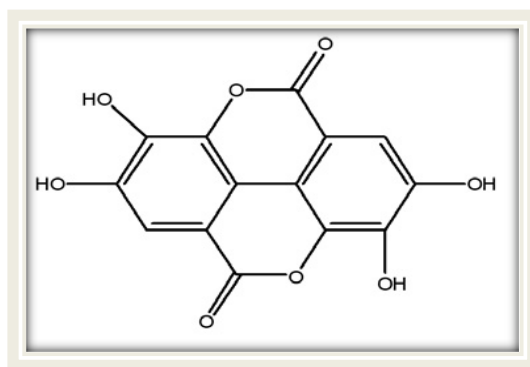


Kraljevstvo:	<i>Plantae</i>
Podkraljevstvo:	<i>Tracheobionta</i>
Odjel:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred:	<i>Rosidae</i>
Red:	<i>Rosales</i>
Porodica:	<i>Rosaceae</i>
Rod:	<i>Rubus</i> L.
Vrsta:	<i>Rubus idaeus</i> L. (USDA, 2011).

Slika 14. Malina, *Rubus idaeus* (Anonymous 6)

Medicinskim istraživanjem je dokazano da infuzija lista maline (slika 14) posjeduje biološki aktivne tvari koje pozitivno utječu na zdravlje. U ljekovite svrhe koriste se listovi i zreli plodovi biljke i sjemenke, koji sadrže vitamine A, C, B₁, B₂, B₆ te polifenole koji imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost (Chuen i Sin, 2002).

Infuzija lista maline ima široku primjenu, a posebice je zanimljiva uporaba u svrhu olakšanja poroda. Naime, smatra se da potiče longitudinalne mišiće uterusa, pojačava kontrakcije te stoga ubrzava porod. Koristi se za ublažavanje probavnih smetnji, liječi crijevne upale i dizenteriju, smiruje živčanu napetost te se koristi za dijetalnu prehranu kod šećernih bolesnika.



Slika 15. Strukturni prikaz elaginske kiseline (Cuartero, M. Et al. 2011)

Za vanjsku uporabu infuzija je dobra ispiranje usta, očiju zahvaćenih konjuktivitisom, kao losion za čireve i rane (Fnimh, 1996). Malina, uz vitamin C ima i visok udjel fenolnih spojeva, posebice elaginske kiseline (slika 14) (Henning, 1981). Samo mali dio elaginske kiseline možemo pronaći u slobodnom obliku, češće dolazi u obliku različitih O-metil derivata i/ili kao slobodni fenoli ili kao konjugati 4-O-glikozida (Zarfrilla, 2001.) Značajan udio elaginske kiseline detektiran je u infuziji nakon kiselinske hidrolize kao produkt razradnje elagitanina (Mullen, 2002).

2.4.2. List kupine (*Rubus fruticosus folium*)



Kraljevstvo:	<i>Plantae</i>
Podkraljevstvo:	<i>Tracheobionta</i>
Odjel:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred:	<i>Rosidae</i>
Red:	<i>Rosales</i>
Porodica:	<i>Rosaceae</i>
Rod:	<i>Rubus L.</i>
Vrsta:	<i>Rubus fruticosus L.</i> (USDA, 2011).

Slika 16. Kupina, *Rubus fruticosus* (Anonymous 7)

Kupina (slika 16) sadrži značajan udio fenolnih spojeva, uključujući antocijane, flavonole, klorogensku kiselinu i procijanidine. Ti spojevi imaju visoku biološku i antioksidacijsku aktivnost te povoljno utječu na zdravlje (Koca i Karadeniz, 2009). Vrhovi ogranaka koriste se protiv dijareje, a listovi pomažu kod problema sa zubnom mesom, čireva, hemeroida te kod gastrointestinalnih bolesti. Kod vanjske primjene se usitnjeni svježi listovi upotrebljavaju za liječenje otvorenih rana, osipa i ozeblina (Shafner i sur., 2004).

List kupine sadrži oko 10% u vodi topljivih tanina (galotanina, dimernog elagitanina) i flavonoida. U prethodnim radovima je utvrđeno da su u listu kupine prisutni rutin, kvercetin, elaginska kiselina, kvercetin, kamferol, rutin, ferulinska i kava kiselina. Zanimljivo je istaknuti da u listu kupine ima više vitamina C nego u zreom plodu (u 100 grama lista ima 125 miligrama posto vitamina C, a u zreom plodu, u istoj masi uzorka, samo 24 miligrama posto) (Martini i sur., 2009).

2.4.3. List šumske jagode (*Fragaria vesca folium*)



Kraljevstvo:	<i>Plantae</i>
Podkraljevstvo:	<i>Tracheobionta</i>
Odjel:	<i>Magnoliophyta</i>
Razred:	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred:	<i>Rosidae</i>
Red:	<i>Rosales</i>
Porodica:	<i>Rosaceae</i>
Rod:	<i>Fragaria</i> L.
Vrsta:	<i>Fragaria vesca</i> L. (USDA, 2011).

Slika 17. Šumska jagoda, *Fragaria vesca* (Anonymous 8)

Šumska jagoda (slika 17) se zbog svog kemijskog sastava svrstava u ljekovite biljke. Ljekovita svojstva ispoljavaju: korijen, list, cvijet i plod. Nutritivna vrijednost šumske jagode zavisi od niza faktora, kao što su klimatski i zemljišni uvjeti te uvjeti presađivanja budući da uzgoj u vrtnim uvjetima uzrokuje veliki gubitak ljekovitih svojstava. Korijen i list šumske jagode izrazito su bogati taninima. Ljekovita svojstva lista rezultat su prisutnih flavonoida i vitamina C tako da se infuzija lista šumske jagode koristi za čišćenje krvi, u liječenju zadaha, upale zubnog mesa i usne šupljine te dijareje, dizenterije, raznih želučano-crijevnih upala i hemeroida, a također je i dobar diuretik. Infuzija lista šumske jagode ili osušenog ploda dobra su zamjena za čaj. Istraživani su različiti pozitivni biološki učinci konzumacije jagoda te je dokazano povećanje antioksidacijskog kapaciteta seruma u ljudskom organizmu, antikancerogena aktivnost, antitrombotički učinak itd. Ovi korisni učinci uglavnom se pripisuju fenolnim spojevima koji su nađeni u velikim količinama u plodu šumske jagode. Međutim, lišće jagode, kao izvor bioaktivnih spojeva s potencijalnim korisnim biološkim učincima, zapostavljeno je od strane istraživača. Osim radova o korištenju vodenog ekstrakta lista šumske jagode, u tradicionalnoj medicini za liječenje različitih bolesti, nedostatan je broj znanstvenih radova o sastavu i djelovanju infuzije na biološke sustave.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci čajnih mješavina

U ovom radu korišteni su list maline, kupine i šumske jagode kao osnova mješavina, u koje su inkorporirani listići stevije i/ili korijen sladića uz dodatak cvjetića lipe ili kamilice, listića mente, suhog povrća (mrkva i batat) te suhog voća (šljiva, smokva, grožđica, marelica i jabuka).

Sastojci: list maline , list kupine , list šumske jagode (Ika Maduna, Matulji)

korijen sladića (Bioaromatica d.o.o.)

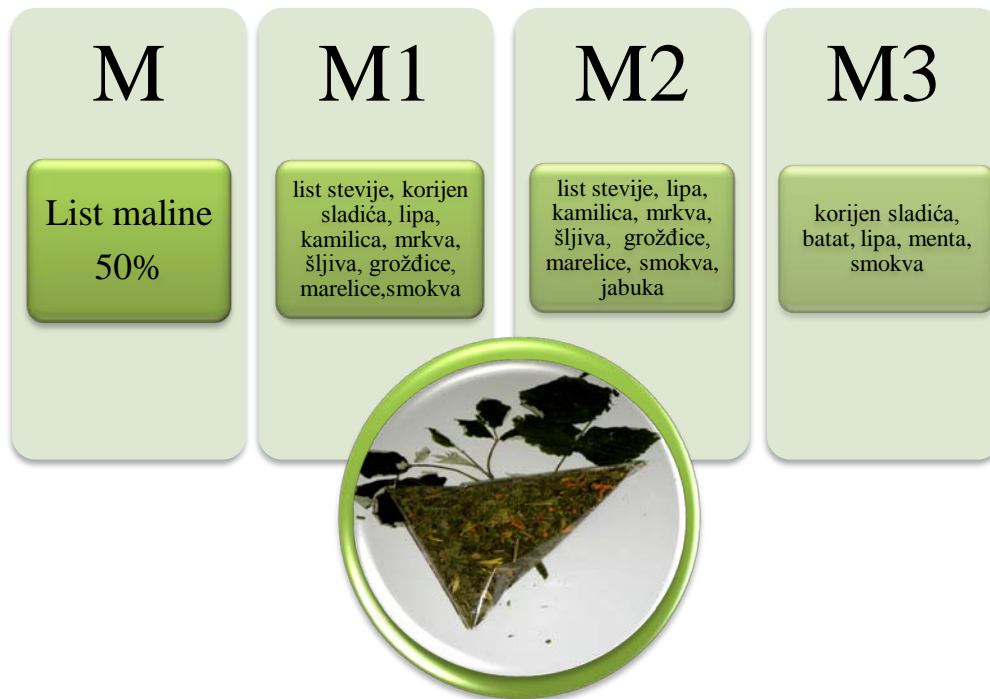
list stevije, mrkva, batat (poljoprivredno dobro Agronomskog fakulteta, Zagreb)

kamilica, lipa (Suban d.o.o)

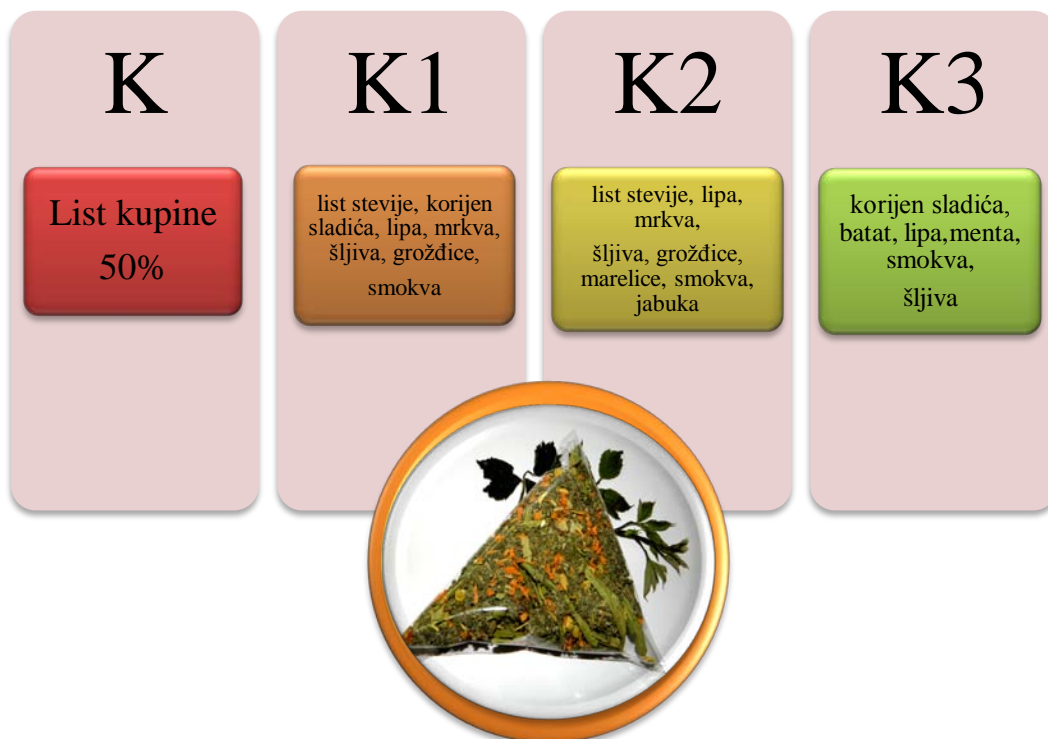
menta (STIL d.o.o)

smokva, šljiva, marelica, grožđica, jabuka (Ecor)

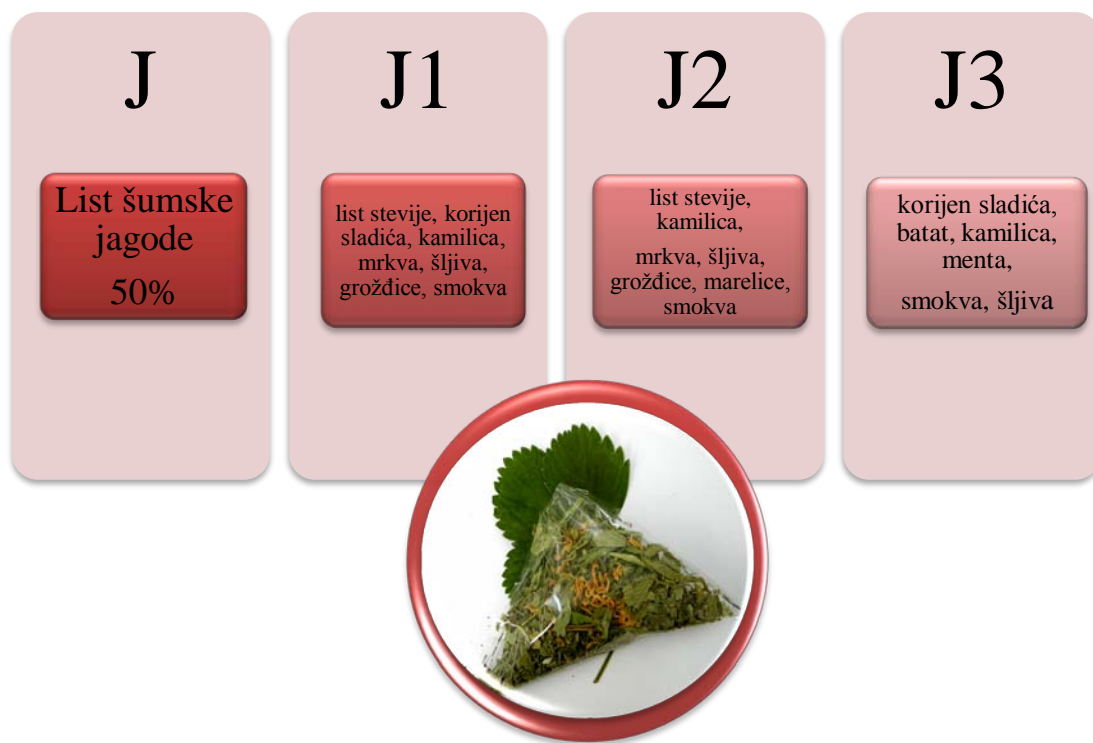
Na osnovu rezultata senzorskog ocjenjivanja, nakon 50 različitih formulacija mješavina pripremljenih kombinacijom navedenih sastojaka odabrano je 9 mješavina kojima je definiran nutritivni sastav, biološka aktivnost i senzorski profil. Sastojci čajnih mješavina baziranih na listu maline, kupine i šumske jagode prikazani su na slikama 18-20.



Slika 18. Čajne mješavine lista maline



Slika 19. Čajne mješavine lista kupine



Slika 20. Čajne mješavine lista šumske jagode

Biljne infuzije pripremljene su prelijevanjem 300 mL ključale vode preko 3 g čajne mješavine. Ekstrakcija je trajala 10 minuta, nakon čega je napitak procijeđen kroz metalnu cjediljku. Napici su se analizirali nakon što su se ohladili na sobnu temperaturu.

U cilju što bolje karakterizacije kreiranih čajnih mješavina i iz njih pripremljenih infuzija, provedene su brojne analize kojima su definirani pojedini fizikalni parametri (nasipna gustoća, svojstva tečenja, boja), bioaktivni sastav (polifenoli, mineralne tvari i pigmenti), biološka aktivnost (antioksidacijski kapacitet i citotoksičnost), udjel ugljikohidrata, energijska vrijednost i senzorski profil.

3.1.2. *Kemikalije*

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće (p.a.).

Određivanje minerala u čaju atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu:

Dušična kiselina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Ultračista voda (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje udjela pigmenata: klorofila, β -karotena i likopena:

n-heksan, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Aceton, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih fenola:

Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev karbonat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Galna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Etanol (96%-tni), Gram-mol, d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i ukupnih flavonoida:

Klorovodična kiselina (37%-tna), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Formaldehid (35%-tni), Alkaloid, AD (Skopje, Makedonija)

Određivanje udjela flavan-3-ola: (vanilin i *p*-DAC metode)

Vanilin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

p-dimetilamino-cinamaldehyd (*p*-DAC), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Nizozemska)

Određivanje udjela proantocijanidina metodom po Bate-Smithu:

n-butanol, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Amonij-željezo(II) sulfat dodekahidrata ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$), Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Određivanje udjela polifenola metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti:

Mravlja kiselina, TTT d.o.o (Sveta Nedelja, Hrvatska)

Acetonitril, Panreac (Barcelona, Španjolska)

Redestilirana voda (AQUA pro injectione, Zagreb)

Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti:

Acetonitril, Panreac (Barcelona, Španjolska)

Redestilirana voda, (AQUA pro injectione, Zagreb)

FRAP metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta:

Natrijev acetat-trihidrat, Alkaloid, AD (Skopje, Makedonija)

Octena kiselina, Alkaloid, AD (Skopje, Makedonija)

2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ), Sigma-Aldrich (Steinheim, Švicarska)

Željezov(III)-klorid-heksahidrat, Kemika (Zagreb, Hrvatska)

Željezov(II)-sulfat-heptahidrat, Gram-mol, d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta:

Kalijev peroksodisulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS),

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

DPPH metoda određivanje antioksidacijskog kapaciteta:

Metanol, Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Nizozemska)

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka)

Određivanje citotoksičnog učinka biljnih infuzija na humanu staničnu liniju karcinoma debelog crijeva

2',7'-diklorofluoroscein-diacetat, Sigma Chemical (Steinheim, Njemačka)

Dimetilsulfoksid, (Kemika, Zagreb)

Dulbeccov medij s 4500 mg/L glukoze, NaHCO₃ i piridoksinom, (Imunološki zavod, Zagreb)
Foetal bovine serum, heat inactivated, Gibco(Grand Island, NY, USA)
Glicerol, Merck (Darmstadt, Njemačka)
Neutral red, Merck (Darmstadt, Njemačka)
Newborn calf serum, heat inactivated, Gibco (Grand Island, NY, SAD)
penicilin/streptomycin otopina (10000 U/mL penicilina i 10 mg/ml streptomicina); Gibco
(Grand Island, NY, SAD)
izopropanol, Alkaloid (Skopje, Makedonija)

3.1.3. Aparatura i pribor

Powder Flow Analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, Velika Britanija)
Uređaj za mjerenje nasipne gustoće (Enelsmann, Ludwigshafen, Germany)
Spectra Magic NX (KonicaMinolta, Osaka, Japan)
Uređaj za mikrovalno razaranje, MWS-2 Microwave System Speedwere BERGHOF
(Eningen Germany)
ICP-AES spektrometar , Teledyne Leeman PRODIGY (Hudson, USA)
Spektrofotometar Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)
Tekućinski kromatograf Agilent 1100/1200 Series (Stuttgart, Njemačka) s PDA i RI
detektorom
Celulozno-acetatni mikrofilteri (0,45 μ m), Machery-Nagel (Düren, Njemačka)
Tekućinski kromatograf GROM-SIL 120 s RI detekcijom
Analitička vaga (A&D Company, Japan)
Laboratorijsko posuđe (staklene čaše, odmjerne tikvice, pipete, menzure, lijevci, stakleni
štapići)
Kivete
Microtiter reader Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambridge
Spektrofotometar Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambridge
Fluorimetar Jarrell Ash Division – 26000 (Fisher Scientific Company, Waltham, 1978)

3.2.2. Određivanje fizikalnih svojstava čajnih mješavina

3.2.2.1. Određivanje značajki tečenja

Za svaki uzorak provode se tri testa: test kohezivnosti, Powder Flow Speed Dependency test i test stvaranja čvrstog kolača (caking). Svaki test daje kvantitativne podatke o protoku mješavine na temelju različitih načina kontrole tečenja.

Test kohezivnosti

Princip metode:

Kohezivnost je sklonost čestica materijala da prijanjaju jedna uz drugu i nakupljaju se u veće čestice - aglomerate. PFA (Powder Flow Analyser) mjeri ove karakteristike pomicanjem rotirajuće oštrice koja podiže mješavinu u cilindričnom spremniku u kojem se nalaze testirani materijali. Test počinje s dva kruga kondicioniranja uzorka kojima se uklanja pritisak i "normalizira" mješavina nakon nasipavanja. Oštrica se zatim pomiče kroz kolonu metodom "sječenja" i uzrokuje minimalno sabijanje. Kada se oštrica kreće prema gore, kroz kolonu mješavine, bilježi se snaga kojom čajna mješavina djeluje na bazu posude. Kohezivnije čestice će se sabiti ili pribiti uz oštricu zbog čega se smanjuje sila naprezanja na bazi posude (Ghosal i sur., 2010).

Izražavanje rezultata:

Index kohezije predstavlja omjer koeficijenta kohezije i mase uzorka (tablica 3).

Tablica 3. Ponašanje čajne mješavine prilikom tečenja i index kohezije

Index kohezije	Svojstva tečenja čajne mješavine
> 19	izrazito kohezivna
16-19	vrlo kohezivna
14-16	kohezivna
11-14	lako teče
< 11	slobodno teče

PFSD test (Powder Flow Speed Dependency)

Princip metode:

Promjenom brzine tečenja mogu se mijenjati svojstva tečenja čajne mješavine. Povećanjem brzine može se povećati slobodan protok mješavine i kod velikih brzina ona može biti otporna na tečenje. PFA (Powder Flow Analyser) (slika 22) određuje svojstva tečenja tako da mjeri rad koji je potreban da mješavina teče pri različitim brzinama. Kontrola protoka djelovanjem rotirajuće oštrice sastoji se od mjerenja u prilagođenim uvjetima u dva ciklusa, tj. u dva ciklusa po pet serija. Prva serija (od dva ciklusa) izvodi se pri brzini od 10 mm/s, a sljedeće serije pri brzinama od 20, 50 i 100 mm/s, dok se zadnja dva ciklusa izvode pri 10 mm/s. U svakom ciklusu oštrica sabija mješavinu prema dolje i podiže ju prema gore. Bilježi se kretanje oštrice prema dolje, kao velika pozitivna sila (što se može usporediti s kretanjem oštrice prema dolje u testu kohezije), dok se negativna sila javlja kad se oštrica kreće prema gore, kako se mješavina podiže. Stabilnost čajne mješavine se procjenjuje na osnovi promjene svojstva mješavine tijekom testiranja, uspoređuje se rad koji je potreban za protok mješavine tijekom prva dva kruga pri brzini od 10 mm/s s radom potrebnim za tečenje mješavine u zadnja dva kruga, pri istoj brzini (Benković i Bauman, 2009).

Izražavanje rezultata:

Površina ispod pozitivnog dijela krivulje (silazni put oštrice) je rad potreban za sabijanje, a izražava se kao koeficijent sabijanja. Koeficijent sabijanja se prikazuje kao prosječna vrijednost podataka koji se bilježe na grafu tijekom dva kruga pri istoj brzini kretanja oštrice (površina ispod pozitivnog dijela krivulje). Površina ispod negativnog dijela krivulje (dizanje oštrice prema gore) koristi se za određivanje koeficijenta kohezije. Indeks stabilnosti toka se računa dijeljenjem koeficijenta sabijanja prva dva kruga pri 10 mm/s s koeficijentom sabijanja zadnja dva kruga pri 10 mm/s. Indeks stabilnosti toka jednak 1,00 je vrijednost koja indicira da nema promjena u mješavini tijekom testiranja. Vrijednosti veće ili manje od 1,00 ukazuju na promjene, primjerice u obliku čestica ili kristalnoj strukturi, može doći do razbijanja aglomerata i čestica mješavine. Što je veći koeficijent sabijanja čajna mješavina će teže teći, a rast koeficijenta s brzinom tečenja pokazuje da uzorak pruža veći otpor tečenju pri većim brzinama tečenja.

Test stvaranja čvrstog kolača (caking)

Princip metode:

Stvaranje čvrstog kolača je sklonost mješavine sabijanju i stvaranju velikih aglomerata tijekom skladištenja i transporta. Sposobnost stvaranja čvrstog kolača ovisi o kohezivnosti, efikasnom pakiranju, nasipnoj gustoći materijala, interakcijama između čestica i udjelu vlage u okolini. Izvođenju testa prethode 2 ciklusa u kojima se mješavina kondicionira u koloni s uzorkom. Na početku analize oštrica ravna mješavinu na vrhu stupca i mjeri se visina kolone, zatim se kretanjem oštrice mješavina u koloni sabija određenom silom (najčešće 750 g). Kad se dostigne ta sila, oštrica se podiže i ciklusi se ponavljaju još četiri puta (sveukupno pet ciklusa). Peti put kad se ostvari ciljana sila, oštrica mijenja smjer i reže kolač koji se formirao u posudi. Uređaj bilježi promjene u visini stupca prilikom sabijanja mješavine (Abu-hardan i Hill, 2010).

Izražavanje rezultata:

Omjer visine kolača koji se ne mijenja tijekom analize ukazuje da mješavina nema, ili pokazuje vrlo malu sklonost stvaranju kolača. Snažan rast omjera visine kolača (pad visine stupca) znači veliku tendenciju mješavine da stvara kolač. Mješavina s velikom tendencijom stvaranja kolača vjerojatno će stvarati čvrst kolač.



Slika 22. Uređaj za određivanje svojstva tečenja čajnih mješavina (Powder Flow Analyser)

3.2.2.2. *Određivanje nasipne gustoće*

Princip metode:

Nasipna gustoća zasniva se na određivanju volumena koji uzorak zauzima odmah nakon što je usipan u menzuru i nakon “udaraca” (jednolično su protreseni uzorci 10, 100 i 1250 puta) (Haugaard Sørensen i sur., 1978).

Postupak rada:

Uzorak se usipa u menzuru volumena od 250 ml. Nakon usipavanja uzorka, zabilježi se masa prazne i pune menzure te volumen koji uzorak zauzima u menzuri, te nakon 10, 100, 1250 „udaraca“ (Murakami i sur., 2001).

Izražavanje rezultata:

Nasipna gustoća se određuje preko omjera mase uzorka i volumena uzorka u menzuri. Kao konačan rezultat uzima se srednja vrijednost 3 mjerenja.

$$\rho_{0,10,100,1250} = \frac{m}{V_{0,10,100,1250}}$$

3.2.2.3. *Određivanje boje*

Princip metode:

S digitalnim sustavom za snimanje moguće je odrediti boju hrane koristeći tri senzora boje. U ovom slučaju boja površine uzorka određuje se i prati bez kontakta s uzorkom. Prednost kompjuteriziranog vizualnog nadzora nad ljudskim je u tome da uređaji mogu mjeriti boju objektivno i kontinuirano.

Ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koje su poznate i kao plavi, zeleni i crveni receptori. Prema tome, potrebna su tri parametra za opis osjeta boje. Specifična metoda za povezivanje ta tri parametra zove se obojeni prostor. Godine 1976. CIE definirala je $L^*a^*b^*$ model i to je najpotpuniji i perceptivno ujednačen model koji djeluje kao poveznica te je neovisan o uređajima. Temelji se na XYZ obojenom prostoru, a predstavlja pokušaj linearizacije percepcije razlike u bojama koristeći matricu za razliku boje opisane pomoću *Macadam* elipse.

Nelinearni odnosi za L^* , a^* i b^* imaju zadatak imitirati logaritamski odgovor ljudskog oka. L^* je osvjetljenje ili svjetlosna komponenta, koja ima vrijednosti u rasponu 0 – 100. Parametri a^* (od zelene do crvene) i b^* (od plave do žute) dvije su kromatske komponente u rasponu od -120 do 120 (Gökmen i Sügüt, 2007).

Postupak rada:

Određivanje boje uzoraka čajnih mješavina vršilo se kolorimetrom CM-3500 d (Konica – Minolta, Japan) pri čemu su se izmjerili L^* , a^* i b^* vrijednosti. Kontrola mjerenja obavlja se preko softvera SpectraMagic NX. Sva mjerenja bila su u SCI (specular component included) modu koji predstavlja način mjerenja boje uzorka pri kojem uračunava sjene, tj. prikazuje uzorak onako kako ga mi vidimo (Gökmen i Sügüt, 2007).

Izražavanje rezultata:

$$\begin{aligned} \Delta L &= L_{\text{uzorak}} - L_{\text{standard}} & \Delta E &= \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 \Delta b^2} \\ \Delta b &= b_{\text{uzorak}} - b_{\text{standard}} & \Delta H &= \sqrt{\Delta E^2 - \Delta L^2 - \Delta c^2} \\ \Delta a &= a_{\text{uzorak}} - a_{\text{standard}} & c &= \sqrt{a^2 + b^2} \\ \Delta C &= C_{\text{uzorak}} - C_{\text{standard}} \end{aligned}$$

3.2.3. Određivanje bioaktivnog sastava čajnih mješavina

3.2.3.1. Određivanje udjela mineralnih tvari u čaju atomskom spektrometrijom uz

induktivno spregnutu plazmu

Princip metode:

Atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) određeni su mikroelementi u čaju. U uzorcima analiziran je sadržaj elemenata: Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg (Kara, 2009).

Postupak rada:

Uzorci čaja usitnjeni su u tarioniku i vagani (0,2500 g). Nakon vaganja uzorci čaja mikrovalno su razoreni uz dodatak 5 mL HNO₃ (50% v/v) (tablica 4).

Uzorci su ostavljeni u teflonskoj posudi da se ohlade, a zatim razrijeđeni s ultračistom vodom na konačni volumen od 25 mL. Razaranje i mjerenja svake vrste čaja ponovljeno je najmanje tri puta. Prije mjerenja uzorci su profiltrirani (crna vrpca).

Tablica 4. Uvjeti mikrovalnog razaranja

	1	2	3
T [°C]	150	160	190
P [W]	80	80	80
t [min]	10	10	20

Kalibracija uređaja:

Sustav je kalibriran korištenjem vodenih otopina standardnih elemenata (tablica 5). Sve baždarne krivulje dobivene su na temelju 5 različitih koncentracija. Standardne otopine elemenata za ICP-AES pripremljene su s multielementnim standardom za ICP-AES, 1000 µg/mL (Merck).

Tablica 5. Uvjeti mjerenja na ICP-AES instrumentu

Instrument	Prodigy High Dispersive ICP
Spektrometar	Ešelatnog tipa
RF-Generator	“free-running” 40 MHz
Protok plina (Argon)	vanjski: 18 L min ⁻¹ pomoćni: 0,8 L min ⁻¹ za raspršivanje: 36 psi
Plamenik	Fasselov tip, DUAL-VIEW
Raspršivač	Pneumatski
Komora za raspršivanje	Ciklonska

Metodom jednog standardnog dodatka određena je iskoristivost metode (tablica 6).

Tablica 6. Iskoristivost metode iskazana kao postotak određenog analita prema stvarnoj vrijednosti

Element (valna duljina određivanja / nm)	%
Al 308.215	90,5
Ba 455.403	109,1
Ca 396.847	98,4
Cd 214.441	112,5
Co 228.615	125,3
Cr 206.149	143,9
Cu 224.700	129,2
Cu 324.754	113,3
Fe 238.204	124,1
K 769.897	125,5
Mg 279.553	94,8
Mg 280.271	117,1

Iskoristivost metode je u rasponu od 86,5 – 148,1%.

Po Boumansovoj metodi određene su detekcijske granice metode (LOD, 3σ) i detekcijske granice kvantifikacije (LOQ, 9σ) za sve uzorke, uz relativno standardno odstupanje (RSO) za sve analite u rasponu od 1 – 10% (tablica 7).

Tablica 7. Detekcije granice metode (LOD, 3σ), detekcijske granice kvantifikacije (LOQ, 9σ) i valne duljine određivanja elemenata

	LOD, 3σ		LOQ, 9σ
	ppm (mg/L)	ppb($\mu\text{g/L}$)	ppb($\mu\text{g/L}$)
Ba 455.403	0,0004	0,42	1,27
Ca 396.847	0,0190	19,02	57,05
Cd 214.441	0,0018	1,76	5,29
Co 228.615	0,0031	3,10	9,29
Cr 206.149	0,0020	2,04	6,13
Cu 224.700	0,0148	14,80	44,40
Cu 324.754	0,0076	7,58	22,75
Fe 238.204	0,0100	10,04	30,12
K 766.491	0,1265	126,47	379,40
Mg 280.271	0,0814	81,38	244,13
Mg 285.213	0,0524	52,38	157,15

Detekcijske granice metode su u rasponu od 0,4 do 126 $\mu\text{g L}^{-1}$, a detekcijske granice kvantifikacije su u rasponu od 1,27 do 379,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kara, 2009; Lamble i Hill, 1998; Boumans, 1987).

3.2.3.2. *Određivanje pigmenata*

Određivanje β-karotena i likopena

Postupak rada:

100 mg metanolnog ekstrakta biljnog čaja snažno se miješa sa mješavinom acetona i heksana (4:6, 10 mL) 1 minutu i zatim profiltrira kroz filter papir. Izmjeri se apsorbancija filtrata na $\lambda=453, 505$ i 663 nm (Barros i sur., 2008). Udjeli β -karotena i likopena izračunaju se prema sljedećim jednadžbama:

$$\begin{aligned} \text{Likopen (mg/100 mL)} &= -0.0458 \cdot A_{663} + 0.372 \cdot A_{505} - 0.0806 \cdot A_{453} \\ \beta\text{-karoten (mg/100 mL)} &= 0.216 \cdot A_{663} - 0.304 \cdot A_{505} + 0.452 \cdot A_{453} \end{aligned}$$

Rezultati se izražavaju kao μg karotenoida/ g ekstrakta.

Određivanje klorofila

Postupak rada:

Oko 100-200 mg usitnjenih listića čaja (u tarioniku, do praškastog stanja) ekstrahira se sa 50 mL 80% acetona - snažno se miješa 2 minute i zatim profiltrira kroz filter papir. Izmjeri se apsorbancija filtrata termostataranog na 30°C na valnim duljinama od $\lambda=663$ nm (za klorofil *a*) i $\lambda=645$ nm (klorofil *b*) (Huang i sur., 2007).

Udjeli klorofila *a* i *b* izračunaju se prema sljedećim jednadžbama:

$$\begin{aligned} \text{Klorofil a (mg/L)} &= 12,7 \cdot A_{663} - 2,95 \cdot A_{645} \\ \text{Klorofil b (mg/L)} &= 22,95 \cdot A_{645} - 4,67 \cdot A_{663} \end{aligned}$$

$$\text{Ukupni klorofil} = \text{klorofil a} + \text{klorofil b}$$

Rezultati se izražavaju kao:

$$\text{Ukupni klorofil (mg/g)} = \text{ukupni klorofil (mg/L)} \times 50 \text{ mL} / (\text{masa uzorka} \times 1000)$$

*3.2.3.3. Određivanja udjela ukupnih fenola*Princip metode:

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteau reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteau reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteau reagens reducira do plavo obojenih volframova i molibdenova oksida (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Nakon dva sata reakcije u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteau reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988) pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singelton i Rossi, 1965).

Postupak rada:

U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetira se 0,5 mL uzorka, 30 mL destilirane vode te 2,5 mL Folin-Ciocalteau reagensa, promiješa i doda 7,5 mL 20%-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Sadržaj tikvice se zatim ponovno dobro promiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 0,5 mL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te tako dobivenu vrijednost koristiti za izračunavanje konačnog rezultata. Svaki uzorak priprema se u tri paralelne probe ($n=3$), a rezultat se izražava kao srednja vrijednost dobivenih rezultata.

$$y = 0,001x - 0,018$$

$$R^2 = 1,000$$

Gdje su:

x – poznata koncentracija otopine galne kiseline (mg/L)

y- izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Rezultati se izražavaju:

Kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L (Singelton i Rossi, 1965).

3.2.3.4. Određivanje udjela ukupnih neflavonoida i ukupnih flavonoida

Princip metode:

Za taloženje flavonoidnih spojeva primijenjuje se formaldehid koji reagira s C-6 ili C-8 na 5,7-dihidroksi flavonoidu stvarajući metilol derivate koji dalje reagiraju s drugim flavonoidnim spojem također na C-6 ili C-8 položaju itd. Kondenzirane molekule nastale ovom reakcijom uklone se filtriranjem, a ostatak neflavonoidnih fenola određuje se prema metodi za ukupne fenole (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada:

U tikvice od 25 mL otpipetira se 10 mL uzorka, 5 ml otopine kloridne kiseline (1:4) i 5 mL formaldehida te se otopina propuše plinovitim dušikom i ostavi stajati 24 sata na mračnom i hladnom mjestu, nakon čega se u tako pripremljenoj otopini odredi udjel ukupnih neflavonoida, i to prema prethodno opisanom postupku određivanja ukupnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom.

Izražavanje rezultata:

Udjel neflavonoida izračunava se prema istoj formuli kao i udjel ukupnih fenola, na osnovi srednje vrijednosti triju paralelnih proba. Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/L ili kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g suhe tvari uzorka (Ough i Amerine, 1988).

Udjel ukupnih flavonoida izračunava se kao razlika udjela prethodno određenih ukupnih fenola i neflavonoida prema formuli:

$$\text{ukupni flavonoidi} = \text{ukupni fenoli} - \text{ukupni neflavonoidi}$$

$$(\text{mg GAE/L})$$

3.2.4. Određivanje udjela flavan-3-ola

3.2.4.1. Reakcija s vanilinom (vanilin indeks)

Princip metode:

Metoda se temelji na reakciji vanilina (p-hidroksibenzaldehida) s alkoholnim skupinama na položajima C6 i C8 u molekulama flavan-3-ola, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks. Intenzitet crvenog obojenja, koji se određuje spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 500 nm, direktno je proporcionalan koncentraciji flavan-3-olnih monomera (katehina) i polimera (proantocijanidina) (Di Stefano i sur., 1989).

Postupak rada:

Pripremi se 4%-tna otopina vanilina u metanolu. U tamnu epruvetu doda se 0,5 mL uzorka i 3 mL prethodno pripremljene otopine vanilina. Epruveta se stavi u hladnu vodenu kupelj i nakon 5 minuta doda se 1,5 mL koncentrirane kloridne kiseline, a nakon 15 minuta očita se apsorbancija na 500 nm (Di Stefano, 1989). Slijepa proba priprema se na isti način, posebno za svaki uzorak, ali se umjesto 4%-tne otopine vanilina dodaje čisti metanol.

Izražavanje rezultata:

Udjel (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema formuli:

$$(+)\text{-katehin} = 290,8 \times \Delta E \times \text{razrijeđenje [mg/L (+)-katehina]}$$

gdje je ΔE razlika apsorbancije između uzorka i slijepe probe.

3.2.4.2. *Reakcija s p-dimetilamino-cinamaldehydom (p-DAC)*

Princip metode:

Ova metoda temelji se na istom principu određivanja udjela (+)-katehina i proantocijanidina kao i metoda s vanilinom, ali se razlikuje po tome što p-dimetilamino-cinamaldehyd (p-DAC) reagira samo s hidroksilnom skupinom na položaju C-8 u molekuli flavan-3-ola. Intenzitet nastalog zelenog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 640 nm (Di Stefano i sur., 1989).

Postupak rada:

Reagens se priprema otapanjem 100 mg p-dimetilamino-cinamaldehyda (p-DAC) u 70 mL metanola i 25 mL koncentrirane kloridne kiseline, nakon čega se tikvica od 100 mL nadopuni do oznake metanolom. Tako pripremljen reagens stabilan je tjedan dana ukoliko se drži na tamnom mjestu i na temperaturi $\approx 4^\circ \text{C}$.

U odmjernu tikvicu doda se 1 mL uzorka i 5 mL reagensa, promućka i nakon 10 minuta izmjeri apsorbancija na 640 nm. Potrebno je pripremiti dvije slijepe probe jer se kod izračunavanja uzima u obzir i apsorbancija reagensa i apsorbancija uzorka. Prva slijepa proba priprema se miješanjem 5 mL reagensa p-DAC i 1 mL vode, dok se druga slijepa proba priprema miješanjem 5 mL vode i 1 mL razrijeđenog uzorka (Di Stefano, 1989).

Izražavanje rezultata:

Udjel (+)-katehina i proantocijanidina računa se prema formuli:

$$\text{(+)katehin} = 32,1 \times \Delta E \times \text{razrijeđenje [mg/L (+)katehina]}$$

gdje je: $\Delta E = a - b - c$, odnosno razlika apsorbancije između:

uzorka i reagensa

vode i reagensa

uzorka i vode

3.3.6. Određivanje proantocijanidina metodom Bate – Smith

Princip metode:

Ova metoda razvijena je modifikacijom metode po Bate–Smithu (1973), a temelji se na kiselinskoj hidrolizi polimernih molekula procijanidina s kloridnom kiselinom, pri čemu nastaju jednostavni cijanidini. Reakcija je popraćena nastankom crvenog obojenja čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm (Porter, Hrstich i Chan, 1986).

Postupak rada:

Pripreme se otopine *n*-butanol/HCl (95:5, v/v) i 2% $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ u 2 M HCl. 2 mL razrijeđenog uzorka (razrijeđenog u omjeru 1:10 u 70%tnom acetonu) otpipetira se u odmjernu tikvicu i doda 4 mL otopine butanol/HCl i 200 μL 2% $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ u 2M HCl. Suspenzija se dobro izmiješa i zagrijava 45 minuta na 95°C u začepljenim tikvicama. Nakon zagrijavanja, smjesa se ohladi i profiltrira te se očita apsorbancija na 550 nm. Slijepa proba priprema se po istom postupku, ali umjesto uzorka sadrži metanol/acetone.

Rezultati se izražavaju:

Kao mg ekvivalenata cijanidin klorida (CyE)/L, a izračunaju se iz jednadžbe baždarnog pravca:

$$y = 0,0321 x + 0,0574$$

$$R^2 = 0,9901$$

3.3.7. *Određivanje udjela polifenola metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti*

Princip metode:

Razvijena je metoda koja je pomoću gradijentne elucije otapala (tablica 8) omogućila dobru separaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva prisutnih u biljnim napicima (Belščak-Cvitanović i sur. 2011).

Postupak rada:

Ekstrakti su prije injektiranja profiltrirani kroz celuložno-acetatne mikrofiltre veličine pora 0,45 μm . U kromatografski sustav injektirano je 20 μL tako profiltriranog ekstrakta te je provedena analiza prema dolje navedenim uvjetima.

Kromatografski uvjeti:

Kromatografska kolona: Zorbax Eclipse XD-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm)

Mobilna faza: A – acetonitril : mravlja kiselina = 97% : 3%

B - voda : mravlja kiselina = 97% : 3%

Protok: 0,9 mL/min

Eluiranje: gradijentno

Tablica 8. Gradijent otapala za HPLC analizu spojeva prisutnih u ekstraktima

t [min]	otapalo A [%]	otapalo B [%]	protok [mL/min]
0	10	90	0,9
20	40	60	0,9
30	70	30	0,9

Detekcija:	UV-Vis Diode Array ($\lambda=278$ nm)
Temperatura kolone:	sobna
Vrijeme trajanja analize:	30 min

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih i alkaloidnih spojeva:

Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću Diode Array Detector-a pri valnim duljinama od 190 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Usporedbom vremena zadržavanja (R_t) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda te usporedbom s UV-spektrima standarda identificirani su spojevi na pojedinim kromatogramima. Kvantitativna determinacija spojeva omogućena je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca pojedinih standarda. Poseban software Chem32 Chromatography Workstation omogućava prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom.

3.4. Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Princip metode:

Razrađena je metoda koja je pomoću izokratne elucije otapala omogućila dobru separaciju i kvantifikaciju ugljikohidratnih spojeva prisutnih u biljnim napicima.

Postupak rada:

Ekstrakti prije injektiranja su profiltrirani kroz celulozno-acetatne mikrofiltere veličine pora 0,45 μm . U kromatografski sustav injektirano je 10 μL tako profiltriranog ekstrakta te je provedena analiza prema dolje navedenim uvjetima.

Kromatografski uvjeti:

Kromatografska kolona: GROM-SIL 80 Amino-3 CP, 5 μ m Col 150x1mm

Mobilna faza: A – acetonitril : voda = 70%:30%

Protok: 2 mL/min

Eluiranje: izokratno

Detekcija: RI

Temperatura kolone: 30°C

Vrijeme trajanja analize: 30 min

Identifikacija i kvantifikacija ugljikohidratih spojeva:

Izdvojeni spojevi detektirani su pomoću RI detektora. Usporedbom vremena zadržavanja (R_t) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenima zadržavanja vanjskih standarda te usporedbom s RI-spektrima standarda identificirani su spojevi na pojedinim kromatogramima. Kvantitativna determinacija spojeva omogućena je korištenjem jednadžbi baždarnih pravaca pojedinih standarda.

3.5. Određivanje biološke aktivnosti

3.5.1. FRAP metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Princip metode:

Ova metoda temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996).

Postupak rada:

U kiveti se pomiješa 50 μ L uzorka i 950 μ L FRAP reagensa te se nakon točno 4 minute izmjeri apsorbancija na 593 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka 50 μ L vode pomiješa s istom količinom FRAP reagensa (950 μ L).

Izražavanje rezultata:

Za izračunavanje koncentracije (u mM željezo(II)-sulfat-heptahidrata) prema baždarnom pravcu, potrebno je oduzeti apsorbanciju slijepa probe od apsorbancije uzorka te tako dobivenu razliku apsorbancija koristiti za preračunavanje prema dobivenoj jednadžbi pravca (Benzie i Strain, 1996):

$$y = 0,0016x$$

$$R^2 = 0,9942$$

3.5.2. ABTS metoda određivanja antioksidacijskog kapacitetaPrincip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize.

Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti ispitivanog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije. Stoga se udjel ABTS radikala koje „gase“ različiti antioksidansi izražava kao funkcija koncentracije i vremena, i mjeri praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka pripremi se otopina ABTS⁺ radikala, oksidacijom 7 mM vodene otopine ABTS reagensa s 140 mM kalijevim peroksodisulfatom, do konačne koncentracije otopine kalijevog peroksodisulfata od 2,45 mM. Budući da ABTS i kalijev peroksodisulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5 neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (min. 12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%) do konačne koncentracije ABTS⁺ radikala od 1%, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$. Alikvot od 20 μ L uzorka pomiješa se s 2 mL otopine ABTS⁺ radikala u kiveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minute. Prije mjerenja uzoraka, potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka 20 μ L vode pomiješa s istom količinom reagensa (2 mL otopine ABTS⁺ radikala).

Izražavanje rezultata:

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema baždarnom pravcu preračunava u koncentraciju (mM ekvivalenti Troloxa) (Re i sur., 1999).

$$y = -0,0014x + 0,7$$

$$R^2 = 0,9936$$

3.5.3. DPPH metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidativne aktivnosti temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne

radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Blois, 1958; Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U kivetu se otpipetira 100 μ L ispitivanog uzorka i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH. Odmah po dodatku otopine DPPH mjeri se apsorbancija pri 515 nm u razmaku od 1 minute, sve do uspostavljanja konstantne vrijednosti apsorbancije (ravnotežno stanje). U drugu kivetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 μ L metanola te 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH.

Izražavanje rezultata:

Vrijednost ΔA za nepoznati uzorak dobiva se oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe. Rezultati ΔA preračunavaju se prema baždarnoj krivulji u koncentracije (mmol/L Trolox ekvivalenta - analog vitamina E) (Blois, 1958; Brand-Williams, Cuvelier, Berset, 1995).

$$y = -1,1428x + 1,413$$

$$R^2 = 0,9809$$

3.5.4. Određivanje citotoksičnog učinka biljnih infuzija na humanu staničnu liniju karcinoma debelog crijeva

Stanične linije:

U ovom radu korištena je stanična linija karcinoma debelog crijeva SW 480. Sve korištene stanične linije rastle su kao jednoslojna kultura u kompletiranom Dulbeccovom modificiranom Eaglovom mediju (DMEM, Gibco).

Sastav medija za uzgoj staničnih linija u monosloju:

DMEM medij je steriliziran filtracijom kroz 0,22 µm filter.

DMEM medij (4500 mg glukoze/L, NaHCO ₃ , piridoksin)	442,5 mL
Teleći serum serum, toplinski inaktiviran («heat inactivated»)	25,0 mL
Fetalni teleći serum, toplinski inaktiviran («heat inactivated»)	25,0 mL
Streptomycin (10 mg/mL)/penicilin (10000 U/mL) otopina	2,5 mL
GlutaMAX(100x, 2mM)	5,0 mL

Sastav korištenih otopina:

<i>Fosfatni pufer A</i> (PBS A, 1x, pH =7,4)	<i>Otopina Neutral red</i> (5 M)	<i>Otopina za odbojavanje</i>	<i>2',7'- diklorofluors cein-diacetat</i> (50 M)
KCl (0,2 g)	NR (5,0 mg)	Etanol (50 mL)	2',7'diklorofl
KH ₂ PO ₄ (0,2 g)	Etanol (1,0 mL)	destilirana voda (49 mL)	uorscein-
NaCl (8,0 g)		ledena octena kiselina	diacetat
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (2,2 g)		(80%) (1mL)	(2 mg)
Destilirana voda (1000 mL)			DMSO (2mL)

3.5.4.1. NR testPrincip metode:

NR test pruža kvantitativnu procjenu broja živih stanica u kulturi. To je jedan od najčešće korištenih testova citotoksičnosti. Temelji se na sposobnosti živih stanica da vežu boju „neutral red“ na lizosome (Repetto, 2008.)

Postupak rada:

Radna otopina se dobije tako da se matična otopina neutral red (konc.5 mg/mL) dodaje mediju u omjeru 1:100, te se profiltrira na filteru.

Nakon tripsinizacije i brojenja stanica, pripremi se stanična suspenzija u koncentraciji od 10^5 stanica/mL te se 180 μ L stanične suspenzije nasađuje u mikrotitarsku pločicu sa 96 bunarića. Stanice se inkubiraju 24 sata kako bi se vezale za dno bunarića i kako bi započele s diobom. Nakon toga se tretiraju različitim koncentracijama biljnih ekstrakata (0,5-5x), u trajanju od 1 i 2 sata bez oporavka i s oporavkom u trajanju od 24 sata nakon tretmana. Nakon tretmana stanice se ispiru PBS-om, te se u svaki bunarić dodaje 100 μ L pripremljene radne otopine NR. Stanice se inkubiraju 2 sata prilikom čega dolazi do vezanja boje unutar lizosoma. Nakon inkubacije, stanice se ispiru s PBS-om kako bi se uklonio višak neutral reda koji nije ušao u lizosome, te se na stanice stavlja otopina za odbojavanje (100 μ L / bunariću) pomoću koje se neutral red koji se nalazi vezan u lizosomima ekstrahira iz stanica. Intenzitet nastalog obojenja određuje se mjernjem apsorbancije pri valnoj duljini od 450 nm.

Izražavanje rezultata:

Postotak preživljenja određuje se u odnosu na negativnu kontrolu prema dolje navedenoj formuli:

$$\% \text{ preživljenja} = (A_{450 \text{ nm}} \text{ istraživanog spoja} / A_{450 \text{ nm}} \text{ kontrole}) \times 100$$

Svaki je eksperiment ponavljen 3 puta, a svaka je koncentracija istraživana u 4 replike.

3.5.4.2. *Određivanje slobodnih radikala u stanicama u monosloju*

Princip metode:

Određivanje slobodnih radikala u stanicama vrši se DCFH-DA fluorimetrijskim testom.

2',7"-diklorodihidrofluorescein-diacetat (DCFH-DA) se često koristi za otkrivanje reaktivnih kisikovih međuprodukata i za procjenu ukupnog oksidativnog stresa. DCFH-DA lako prolazi kroz staničnu membranu, nakon čega ga unutarstanične esterase deacetiliraju. Dobiveni 2',7"-diklorodihidrofluorescein (DCFH) reagira sa slobodnim radikalima koji potječu od vodikovog peroksida (ili nekog drugog oksidirajućeg kisikovog spoja) u stanici i oksidira se u fluorescentni 2',7"-diklorofluorescein (DCF) (Afri i sur., 2004). Što je intenzitet fluorescencije veći, to je veći i udio reaktivnih kisikovih spojeva.

Postupak rada:

Nakon tripsinizacije i brojenja stanica, pripremi se stanična suspenzija u koncentraciji od 3×10^4 stanica/mL te se 180 μ L stanične suspenzije nasadije u crnu mikrotitarsku pločicu sa 96 bunarića. Stanice se inkubiraju 24 sata kako bi se vezale za dno bunarića i kako bi započele s diobom. Nakon ukljanjanja medija i spiranja s PBS-om, stanice se tretiraju 72 sata s otopinama metala i/ili PBDE. Nakon tog vremena, uklanja se medij sa stanica. Pripremi se otopina (50 μ M) 2',7"-diklorofluorescein-diacetata i PBS-u koji sadrži 1 % BSA te se stanice nakon uzoraka i nakon ispiranja s PBS-om tretiraju otopinom 2',7"-diklorofluorescein-diacetata pola sata. Intenzitet fluorescencije određuje se na fluorimetru pri valnoj dužini ekscitacije od 485 nm i valnoj dužini emisije 520 nm.

Kako bi se izmjerena fluorescencija mogla izraziti po postotku preživjelih stanica, ponovno se provodi neutral red test i izračunava kvocijent preživljenja.

Izražavanje rezultata:

Rezultati se izražavaju kao kvocijent fluorescencije i kvocijenta preživljenja. Svaki je eksperiment ponovljen 2 puta, a svaka je koncentracija istražena u 3 replike.

Rezultati su izraženi kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljenja koji je izračunat u odnosu na negativnu kontrolu.

$$\text{fluorescencija (proizvoljna jedinica) DCF} = \text{fluorescencija} / Q_{\text{preživljenja}}$$

3.6. Senzorska analiza biljnih infuzija

Senzorsko ocjenjivanje biljnih infuzija provedeno je uz pomoć panela od 6 educiranih osoba. Sve biljne infuzije pripremljene su na isti način, prelijevanjem 3 g biljke sa 300 mL kipuće vode. Nakon 10- minutne ekstrakcije, čaj je ocjeđen i serviran. Budući da u literaturi ne postoje definirani aromatski profili ispitivanih biljnih infuzija (list kupine, list maline i list šumske jagode) u sklopu ovog istraživanja, a prema uzoru na aromatske profila *Rooibos* čaja i zelenog čaja te kave, definirani su njihovi aromatski profili. Svaki član panela bilježio je svoje impresije koje su na kraju prodiskutirane i kao rezultat dobio se senzorski profil svakog čaja.

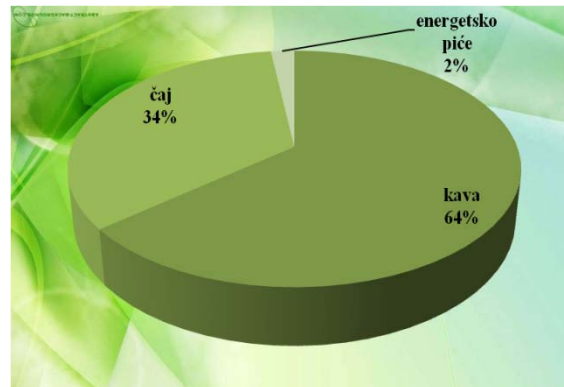
Novokreirane formulacije čajnih mješavina bazirane na listu kupine, listu maline i listu šumske jagode potom su ocjenjene 10-bodovnom hedonističkom skalom.

Ocjenjivano je 6 svojstava: okus, miris, sveukupna prihvatljivost, prepoznatljivost arome, intenzitet slatkoće te intenzitet arome, sukladno sličnim istraživanjima koja su proveli Chen i suradnici (2009). Svaki ispitivani parametar ocjenjen je u rasponu ocjena od 1 (najlošije prihvaćen) do 10 (najpoželjnije).

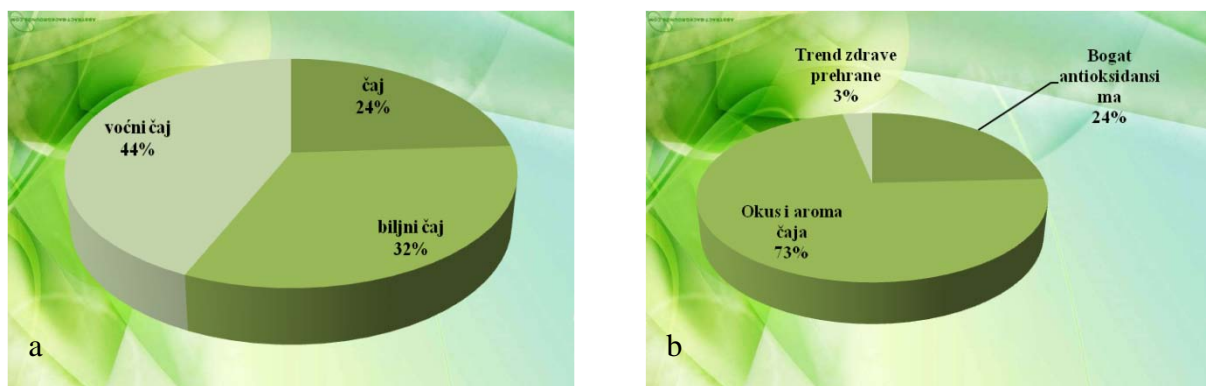
4. REZULTATI

4. Rezultati

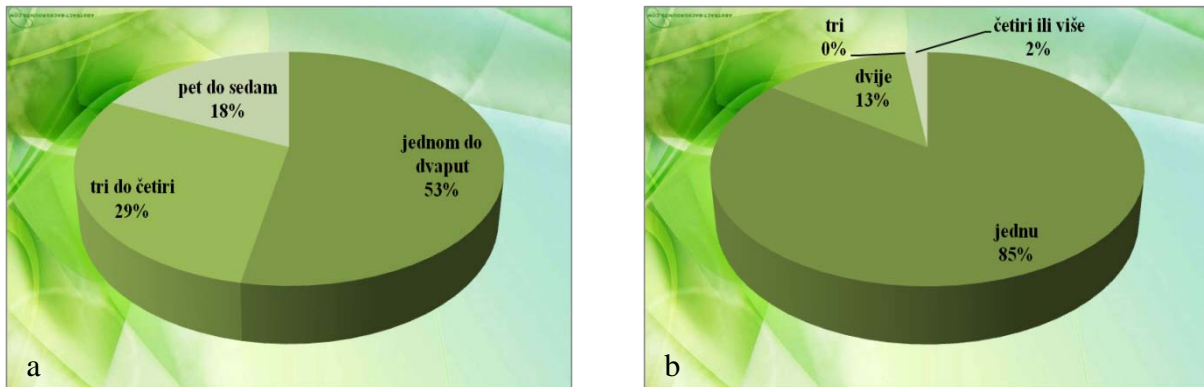
4.1. Anketa



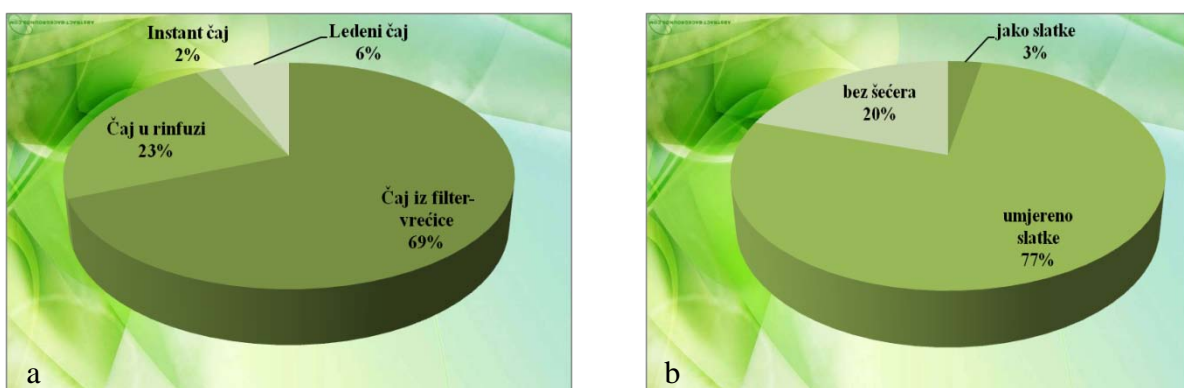
Slika 23. Preferencija ispitanika prema konzumiranju kave, čaja i energetskega napitaka



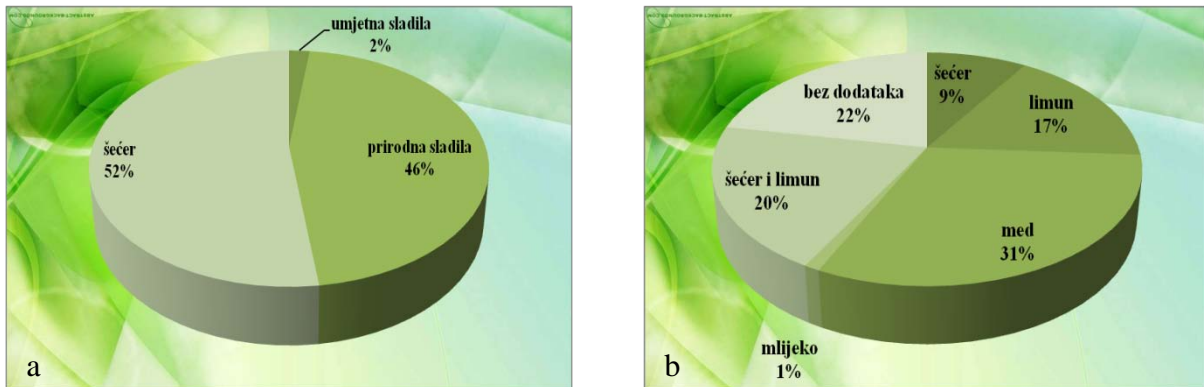
Slika 24. Preferencija ispitanika prema konzumiranju različitih vrsta čajeve (a) i razlozi takvih odabira (b)



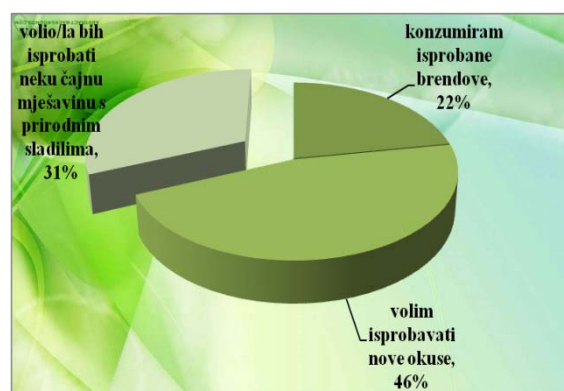
Slika 25. Postotak ispitanika ovisno o: a) tjednoj b) dnevnoj učestalosti konzumacije čaja



Slika 26. a) Preferencije ispitanika prema obliku konzumiranja čaja (a) i prema intenzitetu slatkoće (b)



Slika 27. Preferencija ispitanika prema uporabi različitih sladila (a) i prema dodacima čaju (b)



Slika 28. Sklonost ispitanika novim formulacijama

4.2. Određivanje fizikalnih svojstava

4.2.1. Određivanje nasipne gustoće čajnih mješavina

Tablica 9. Nasipna gustoća čajnih mješavina

	ρ_0 (kg/m ³)	ρ_{10} (kg/m ³)	ρ_{100} (kg/m ³)	ρ_{1250} (kg/m ³)	Hr
M	108.30	122.52	142.51	150.42	1.22
M1	135.20	153.64	175.13	187.78	1.22
M2	147.24	165.81	183.13	202.25	1.22
M3	174.51	195.64	215.98	228.41	1.16
K	65.48	75.09	75.09	87.07	1.16
K1	117.38	127.95	127.95	144.93	1.13
K2	114.96	129.59	139.75	148.49	1.14
K3	118.76	136.19	145.54	153.04	1.13
J	74.22	87.40	100.56	111.33	1.28
J1	81.19	89.81	102.51	114.03	1.27
J2	79.92	92.22	104.24	114.17	1.24
J3	106.45	115.71	126.73	135.78	1.17


4.2.2. Određivanje svojstava tečenja čajnih mješavina

Tablica 10. Značajke tečenja čajnih mješavina (zbog heterogenosti čajnih mješavina u tablici su prezentirani samo rezultati pojedinih čajnih mješavina)

	Indeks kohezije	Indeks stabilnosti	Čvrstoća kolača (gmm)	Prosječna čvrstoća kolača(g)
M	-57,92	/	11 647,03	503,95
M3	/	/	/	/
K	-7,41	0,55	12 632,97	688,29
K3	-6,94	/	/	/
J	-32,45	/	12012,65	589,65

4.2.3. *Određivanje boje čajnih mješavina*

Tablica 11. Boja (izražene pomoću svjetline L i kromatskih kordinata a i b) svježe pripremljenih infuzija lista maline, lista kupine i lista šumske jagode i infuzija nakon 24 sata stajanja

	<u>Svježe pripremljene infuzije</u>			<u>24h odstajale infuzije</u>		
	<i>L (D65)</i>	<i>a (D65)</i>	<i>b (D65)</i>	<i>L (D65) 24h</i>	<i>a (D65) 24h</i>	<i>b (D65) 24h</i>
M	92.82	-3.41	25.7	78.2	4.26	48.23
M1	94.57	-3.85	22.58	81.32	2.01	43.08
M2	94.41	-3.37	21.43	82.83	1.99	41.4
M3	90.92	-3.87	36.16	80.94	1.91	41.31
K	83.66	-3.04	42.14	80.11	1.47	59.24
K1	86.38	-3.4	37.5	80.95	0.93	51.67
K2	89.31	-3.63	31.66	79.5	2.25	54.19
K3	89.59	-4.29	36.75	79.59	3.57	59.84
J	90.18	-3.75	36.21	83.87	0.46	52.32
J1	93.03	-3.98	27.16	84.58	-0.76	47.42
J2	93.41	-4.39	26.55	82.93	0.68	51.71
J3	90.52	-4.11	35.61	84.99	-0.61	48.11

4.3. Određivanje bioaktivnog sastava čajnih mješavina

4.3.1. Određivanje udjela mineralnih tvari u čajnim mješavinama atomskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu

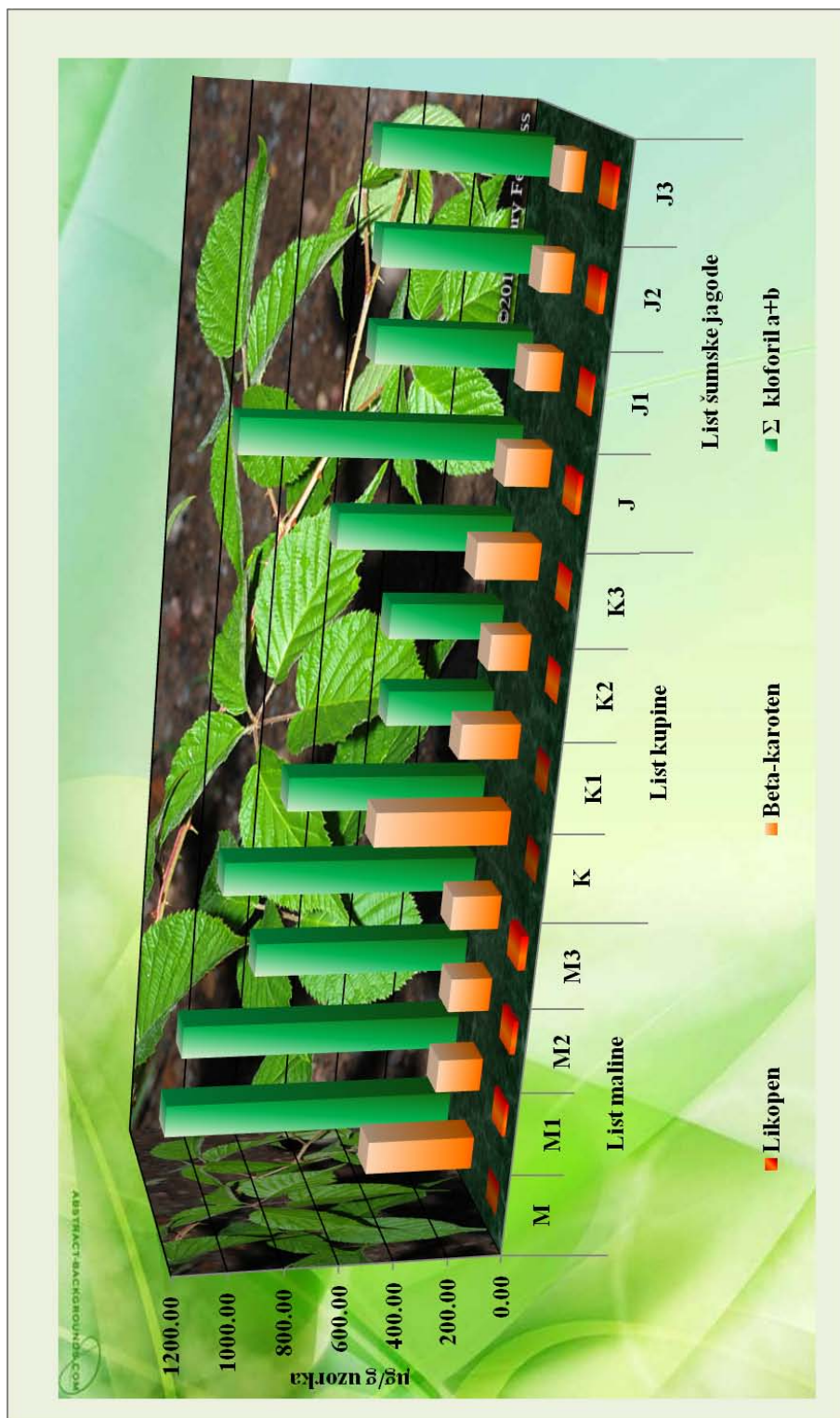
Tablica 12. Udjeli (mg/g) aluminija, kalcija, kalija i magnezija u čajnim mješavinama

	<i>Al (mg/g)</i>	<i>Ca (mg/g)</i>	<i>K (mg/g)</i>	<i>Mg (mg/g)</i>
M	4.26	1.92	4.28	2.07
M1	3.77	1.82	4.62	1.40
M2	3.76	1.08	5.66	1.44
M3	4.33	1.66	4.41	1.93
K	5.32	1.26	5.22	1.86
K1	3.36	2.42	4.55	1.51
K2	4.00	2.33	5.42	1.97
K3	4.94	1.79	5.45	1.50
J	6.05	1.98	8.41	1.98
J1	3.59	2.25	3.59	1.11
J2	4.78	2.17	5.93	1.39
J3	4.96	1.40	6.02	1.85

Tablica 13. Udjel ($\mu\text{g/g}$) mikroelemenata u čajnim mješavinama

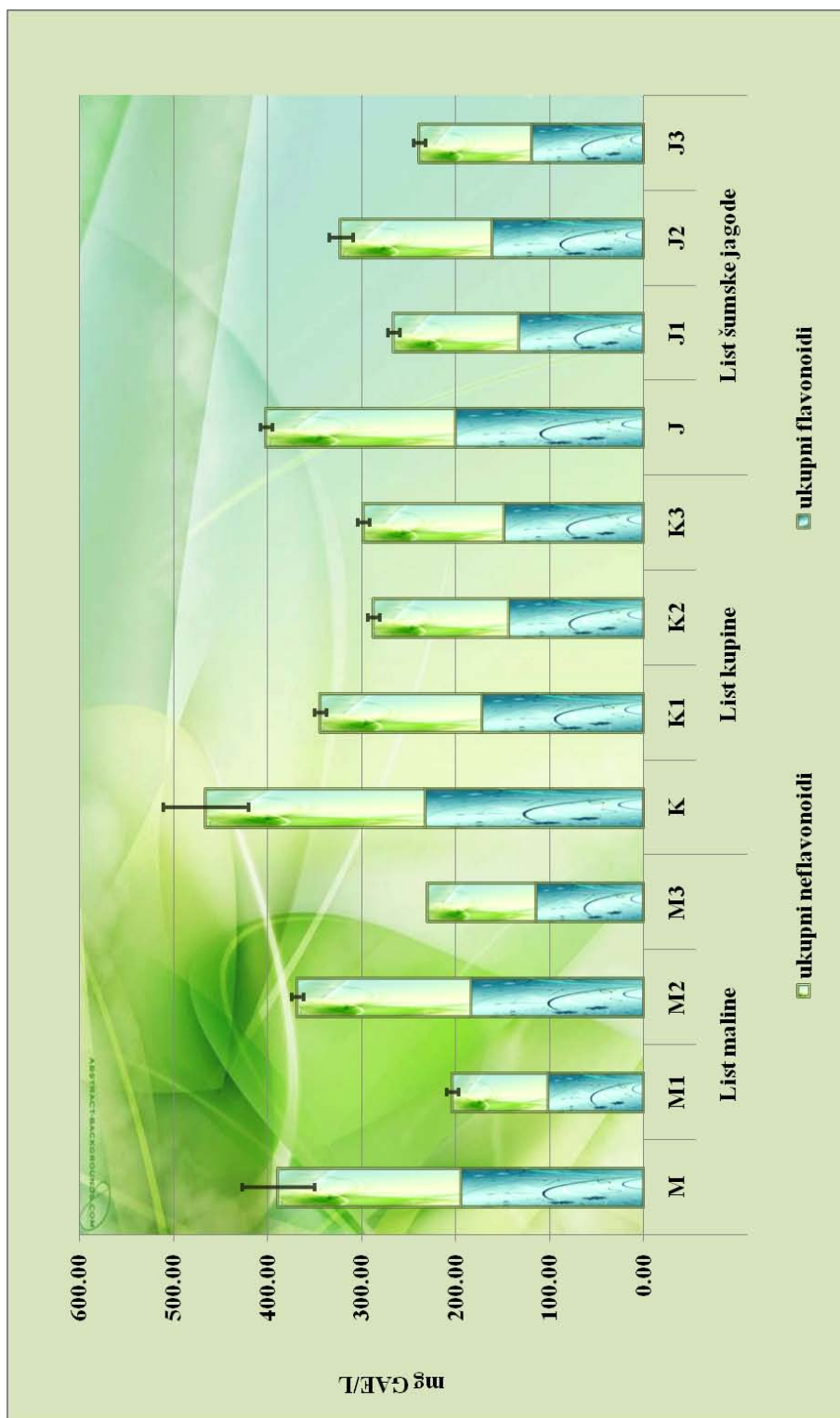
	<i>Ba</i>	<i>Cd</i>	<i>Co</i>	<i>Cr</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Na</i>	<i>Ni</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>
M	5.21	<LOD	<LOD	6.63	1.97	4.77	121	9.37	3.12	0.702	5.36
M1	14.6	0.073	<LOD	7.64	2.32	5.96	67.7	169	12.5	1.13	7.00
M2	4.33	0.125	0.472	14.0	2.82	21.0	84.2	205	17.3	0.878	12.5
M3	8.66	0.035	<LOD	7.57	1.94	7.78	121	35.3	6.23	0.457	6.23
K	12.6	0.144	<LOD	11.2	3.07	45.6	233	47.4	39.4	0.922	10.2
K1	9.13	0.154	<LOD	0.751	2.12	4.75	141	198	3.58	0.253	1.34
K2	14.3	0.044	<LOD	6.95	2.61	16.2	244	16.3	18.0	0.566	5.57
K3	10.3	0.371	<LOD	5.38	2.96	35.9	163	492	27.1	1.49	5.44
J	6.91	0.242	0.817	23.6	6.82	30.5	126	367	29.0	12.4	25.3
J1	33.1	0.149	<LOD	4.58	2.53	20.8	33.7	183	24.4	0.553	3.79
J2	68.6	0.227	<LOD	6.68	4.23	20.4	40.9	125	18.4	1.03	5.96
J3	14.2	0.125	<LOD	10.6	3.21	34.8	134	292	29.9	0.885	9.42

4.3.2. Određivanje udjela pigmentata u čajnim mješavinama



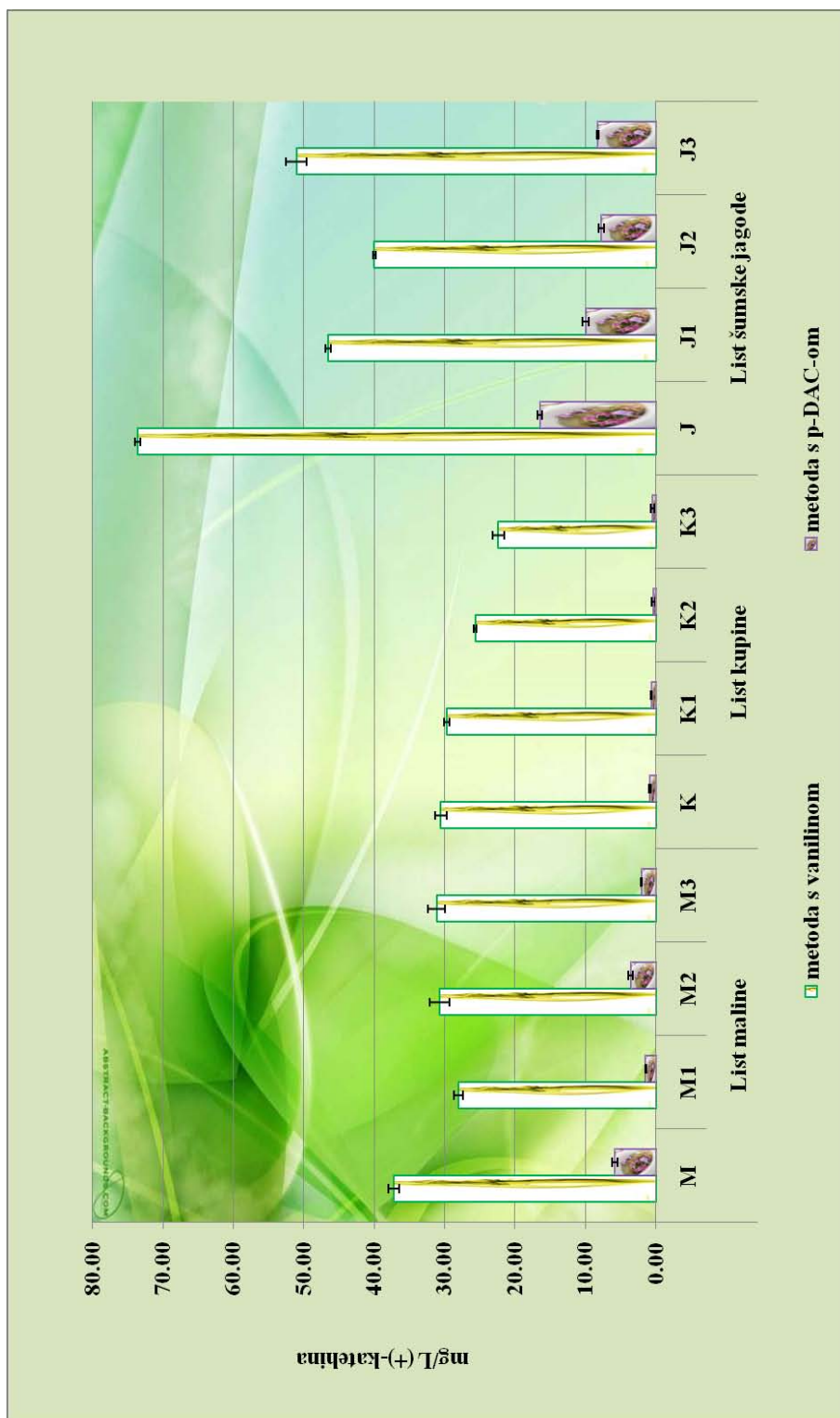
Slika 29. Udjel beta-karotena, likopena i klorofila a i b u čajnim mješavinama

4.3.3. *Određivanja udjela ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida*



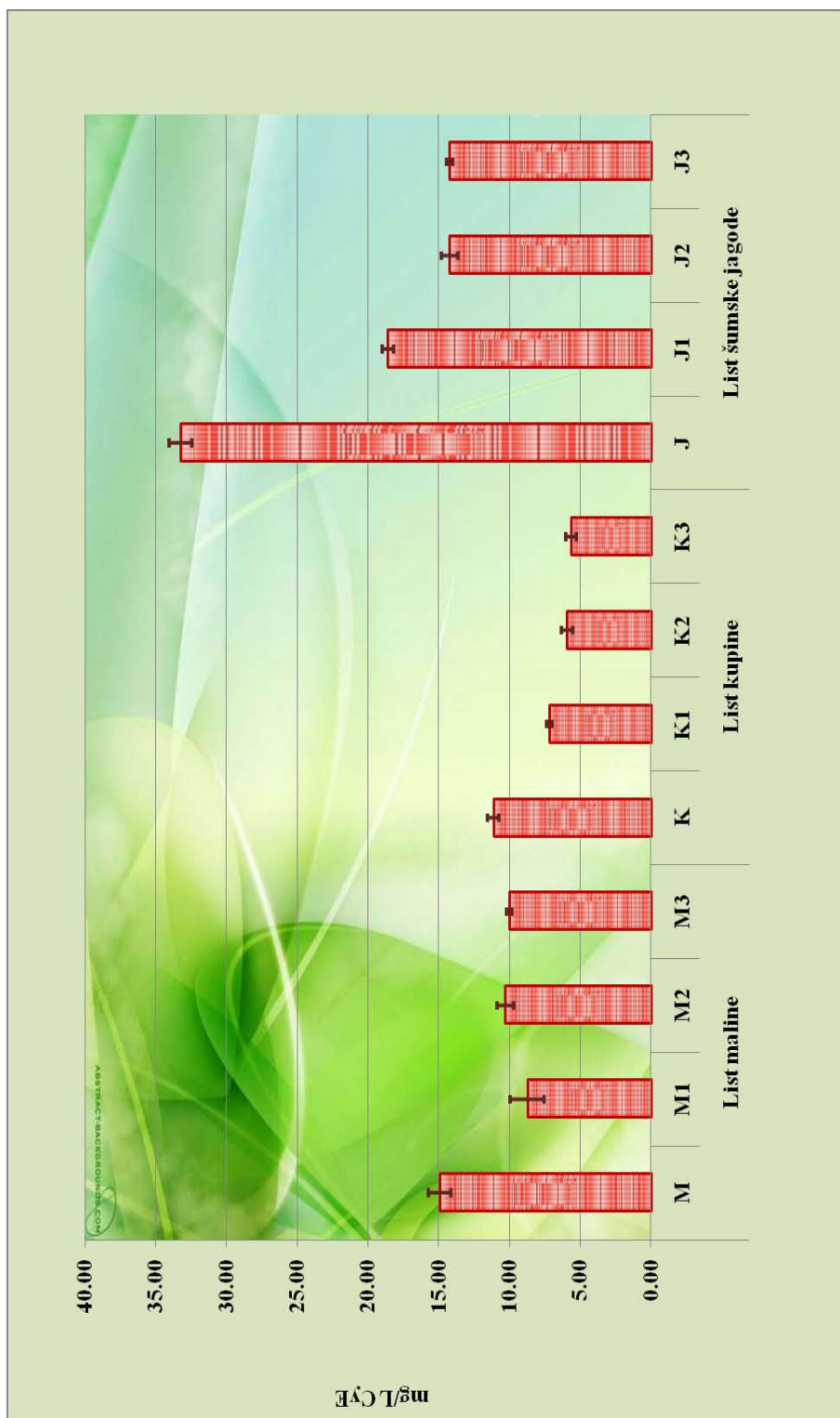
Slika 30. Udjel (mg/L GAE) ukupnih fenola u biljnim infuzijama

4.3.4. *Određivanje udjela flavan-3-ola u biljnim infuzijama*



Slika 31. Udjel flavan-3-ola određen metodom s vanilinom i p-DAC-om

4.3.5. Određivanje udjela proantocijanidina metodom po Bate – Smithu



Slika 32. Udjel (mg/L CyE) određen metodom po Bate-Smithu

4.3.6. *Određivanje udjela polifenola metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti*

Tablica 14. Udjel (mg/L) fenolnih kiselina i flavonoida u infuzijama lista maline

	<u>M</u>	<u>M 1</u>	<u>M 2</u>	<u>M 3</u>
<i>Fenolne kiseline</i>				
Σ derivata elaginske kiseline	71,90 ± 1,24	43,78 ± 0,93	41,26 ± 1,67	37,59 ± 2,19
ferulinske kiseline	/	10,44 ± 0,01	28,45 ± 1,23	/
kava kiselina	/	11,74 ± 0,09	12,48 ± 0,08	12,37 ± 0,06
klorogenska kiselina	/	148,29 ± 5,26	207,52 ± 1,21	36,63 ± 0,75
ružmarinska kiselina	/	/	/	12,59 ± 0,02
<i>Flavonoidi</i>				
Σ mg derivata kamferola	78,49 ± 3,25	67,27 ± 0,08	71,23 ± 2,46	30,95 ± 0,01
Σ mg derivata kvercetina	/	17,98 ± 0,19	57,27 ± 1,92	73,38 ± 0,06?
UKUPNO	150,39	299,50	418,21	203,51

Tablica 15. Udjel (mg/g) fenolnih kiselina i flavonoida u infuzijama lista kupine

	<u>K</u>	<u>K1</u>	<u>K2</u>	<u>K3</u>
<i>Fenolne kiseline</i>				
Σ mg derivata elaginske kiseline	28,82 \pm 0,06	23,41 \pm 1,65	18,89 \pm 0,56	15,32 \pm 0,17
ferulinska kiselina	/	9,20 \pm 0,01	11,83 \pm 0,07	/
kava kiselina	18,70 \pm 0,04	13,77 \pm 1,02	13,67 \pm 0,01	13,56 \pm 0,07
klorogenska kiselina	/	172,03 \pm 3,94	181,12 \pm 2,11	45,07 \pm 2,06
p-kumarinska kiselina	/	7,34 \pm 0,03	7,44 \pm 0,01	7,31 \pm 0,16
ružmarinska kiselina	/	/	/	14,91 \pm 0,01
<i>Flavonoidi</i>				
Σ mg derivata kamferola	31,68 \pm 0,22	25,69 \pm 0,67	27,20 \pm 0,36	28,46 \pm 0,95
Σ mg derivata kvercetina	/	16,33 \pm 0,04	49,41 \pm 0,01	7,79 \pm 0,02
UKUPNO	79,2	267,78	301,85	124,63

Tablica 16. Udjel (mg/L) fenolnih kiselina i flavonoida u infuzijama lista šumske jagode

	<u>J</u>	<u>J1</u>	<u>J2</u>	<u>J3</u>
<i>Fenolne kiseline</i>				
Σ mg derivata elaginske	30,84 ± 2,10	24,07 ± 0,14	20,19 ± 0,06	16,32 ± 1,01
mg ferulinske kiseline	/	6,11 ± 0,01	6,28 ± 0,04	/
mg kava kiseline				
mg klorogenske kiseline	/	131,35 ± 6,24	176,46 ± 3,58	65,27 ± 2,16
mg ružmarinske kiseline	/	/	/	10,83 ± 0,03
<i>Flavonoidi</i>				
Σ mg derivata apeginina	3,25 ± 0,01	2,55 ± 0,01	3,51 ± 0,02	1,43 ± 0,01
Σ mg derivata kvercetina	67,50 ± 1,07	19,36 ± 0,08	57,14 ± 0,04	45,24 ± 0,03
UKUPNO	101,59	183,44	263,58	139,09

Tablica 17. Udjel (mg/L) fenolnih kiselina i flavonoida u pojedinim sastojcima čajnih mješavina

	<u>Stevija</u>	<u>Marelica</u>	<u>Šljiva</u>	<u>Jabuka</u>	<u>Groždice</u>	<u>Smokva</u>
<i>Fenolne kiseline</i>						
Σ mg derivata elaginske kiseline	/	25,30 ± 0,28	/	64,38 ± 2,64	/	
ferulinska kiselina	54,49 ± 0,69	/	/	23,61 ± 0,66	/	
kava kiselina	25,64 ± 0,08	9,31 ± 0,06	15,59 ± 0,03	/	/	
klorogenska kiseline	101,36 ± 3,45	/	/	331,09 ± 2,47	56,25 ± 0,02	23,11
p-kumarinska kiseline			2,75 ± 0,01	19,09 ± 0,03	/	
<i>Flavonoidi</i>						
Σ mg derivata kvercetina/L	94,66 ± 3,10	/	/	/	20,63 ± 0,01	42,36 ± 0,04
UKUPNO	276,15	34,61	18,34	438,17	76,88	65,47

4.4. Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Tablica 18. Udjel (g/g) glukoze, fruktoze i saharoze u pojedinim sastojcima čajnih mješavina

	glukoza	fruktoza	saharoza	UKUPNO
Batat	0,020±0,00	0,025±0,00	0,079±0,01	0,124
Groždica	0,343±0,01	0,332±0,06	0,000±0,00	0,675
Jabuka	0,083±0,03	0,442±0,09	0,079±0,02	0,604
Marelica	0,161±0,01	0,119±0,01	0,139±0,00	0,418
Mrkva	0,085±0,03	0,185±0,08	0,718±0,04	0,988
Sladić	0,000±0,00	0,057±0,01	0,030±0,02	0,087
Smokva	0,223±0,03	0,203±0,01	0,000±0,00	0,426
Stevija	0,069±0,10	0,043±0,04	0,000±0,00	0,112
Šljiva	0,417±0,02	0,193±0,01	0,000±0,00	0,610

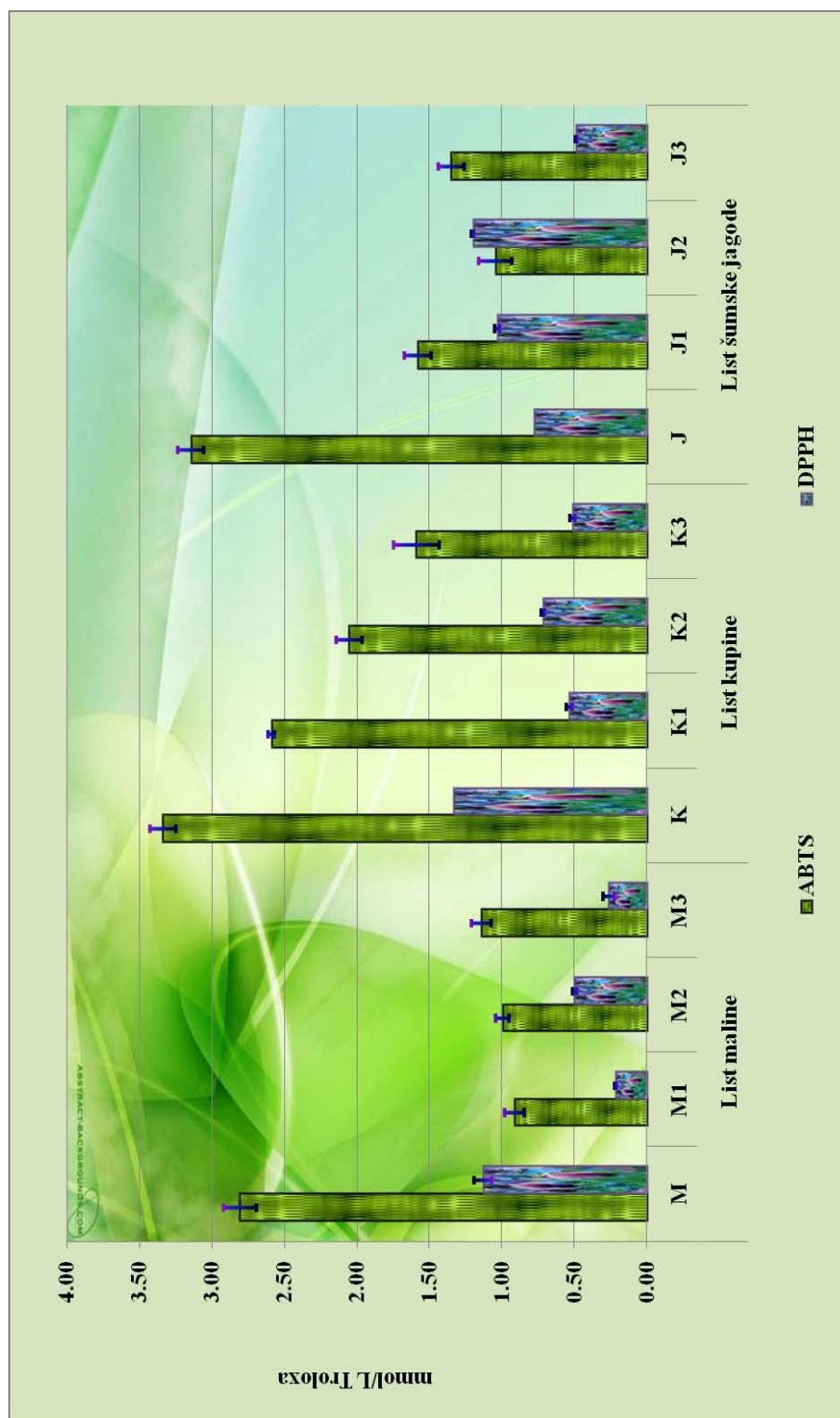
Tablica 19. Energijska vrijednost čajnih mješavina

Na osnovu rezultata tablice 19 o udjelu glukoze, fruktoze i saharoze u pojedinim sastojcima čajnih mješavina i uzimajući u obzir udio pojedinog sastojka u čajnim mješavinama izračunata je njihova energijska vrijednost (tablica 19).

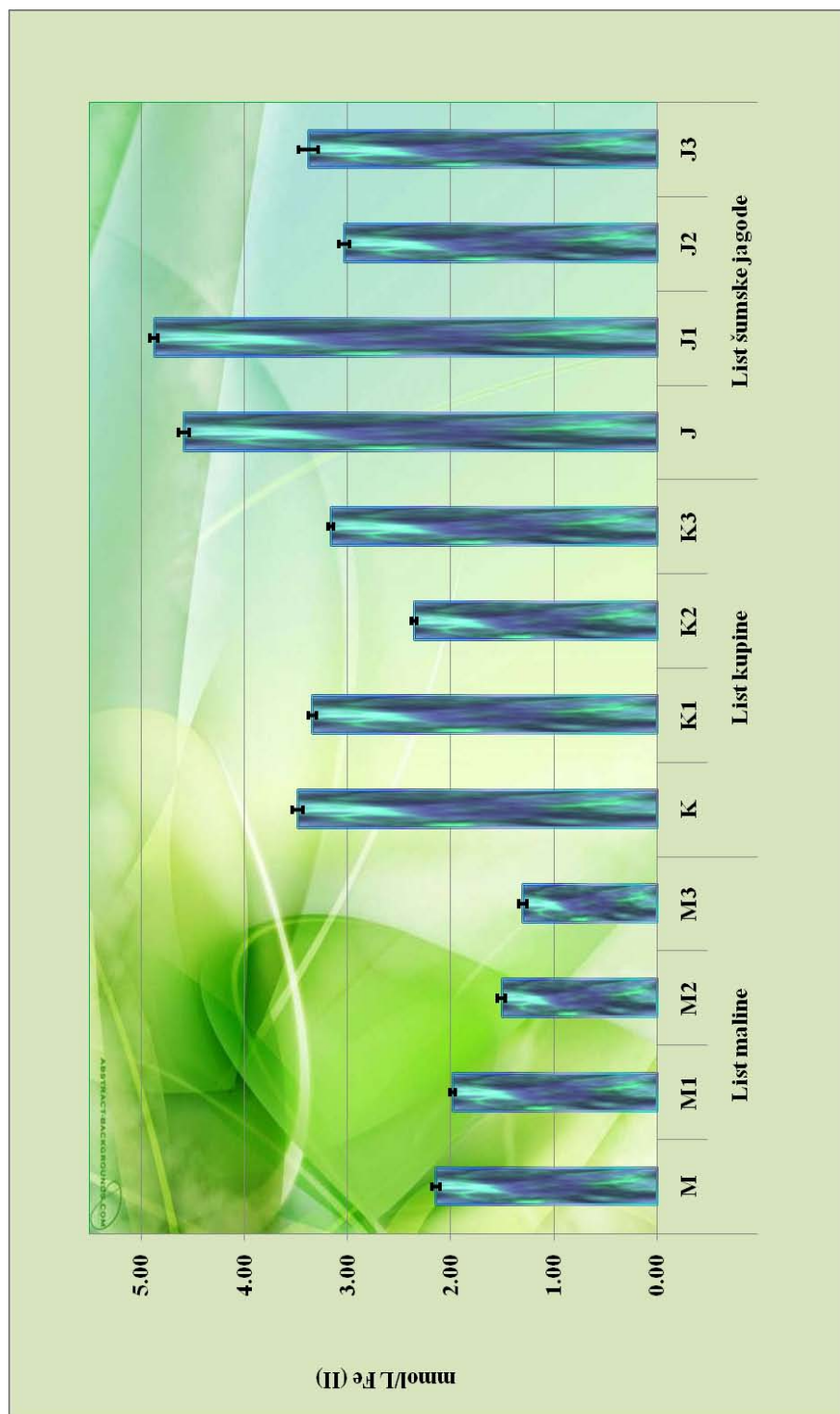
	<i>kcal/porcija</i>	<i>kJ/porcija</i>	<i>Kcal/100 g</i>
<i>M</i>	ND	ND	ND
<i>M1</i>	2,7	11,3	22,12
<i>M2</i>	3,0	12,8	25,18
<i>M3</i>	1,0	4,2	8,32
<i>K</i>	ND	ND	ND
<i>K1</i>	2,6	11,2	22,05
<i>K2</i>	2,9	12,4	24,24
<i>K3</i>	1,2	4,9	9,66
<i>J</i>	ND	ND	ND
<i>J1</i>	2,6	11,2	22,05
<i>J2</i>	2,9	12,1	23,77
<i>J3</i>	1,1	4,8	9,48

4.5. Određivanje biološke aktivnosti

4.5.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta čajnih mješavina



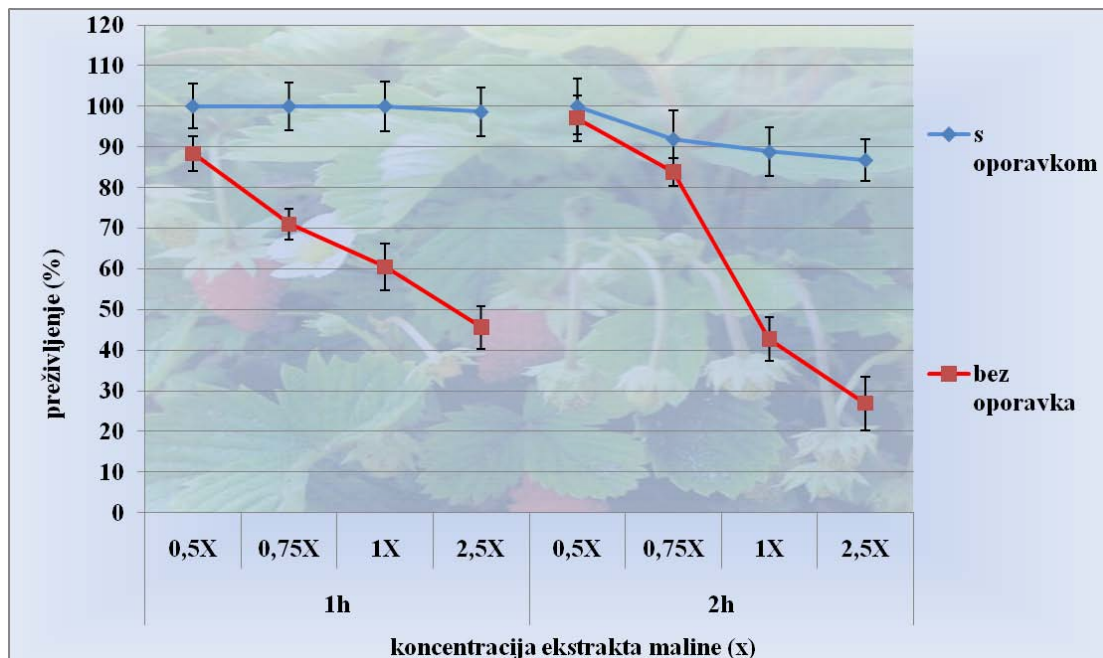
Slika 33. Antioksidacijski kapacitet (mmol/L Troloxa) biljnih infuzija određen DPPH i ABTS metodom



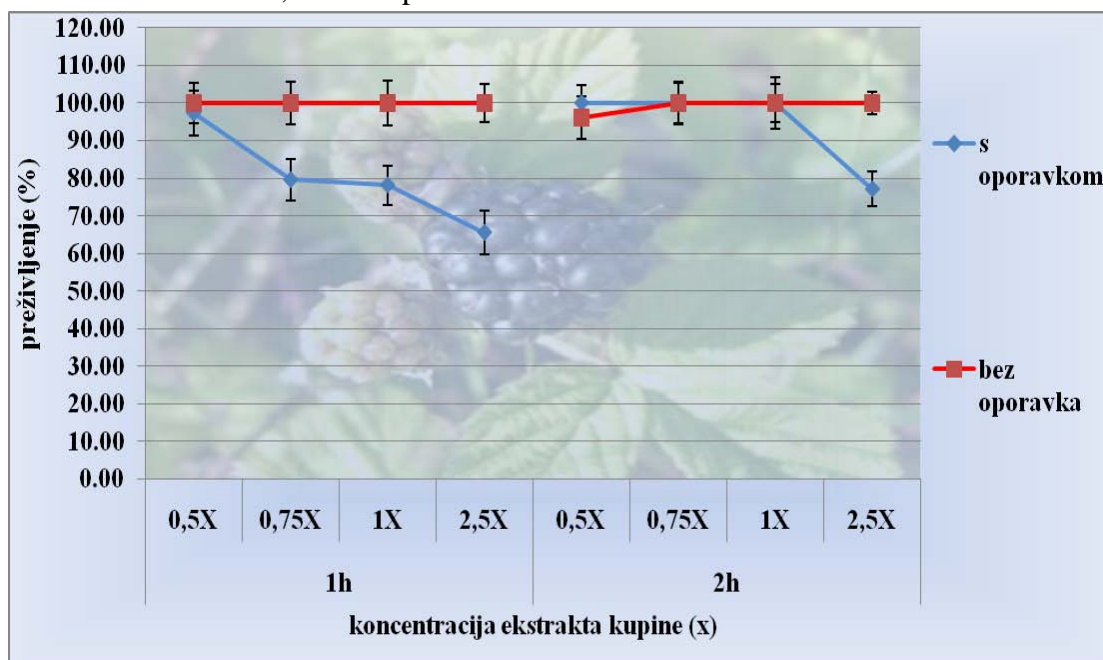
Slika 34. Antioksidacijski kapacitet (mmol/L Fe)^(II) biljnih infuzija određen FRAP metodom

4.5.2. Određivanje citotoksičnog učinka biljnih infuzija na humanu staničnu liniju karcinoma debelog crijeva

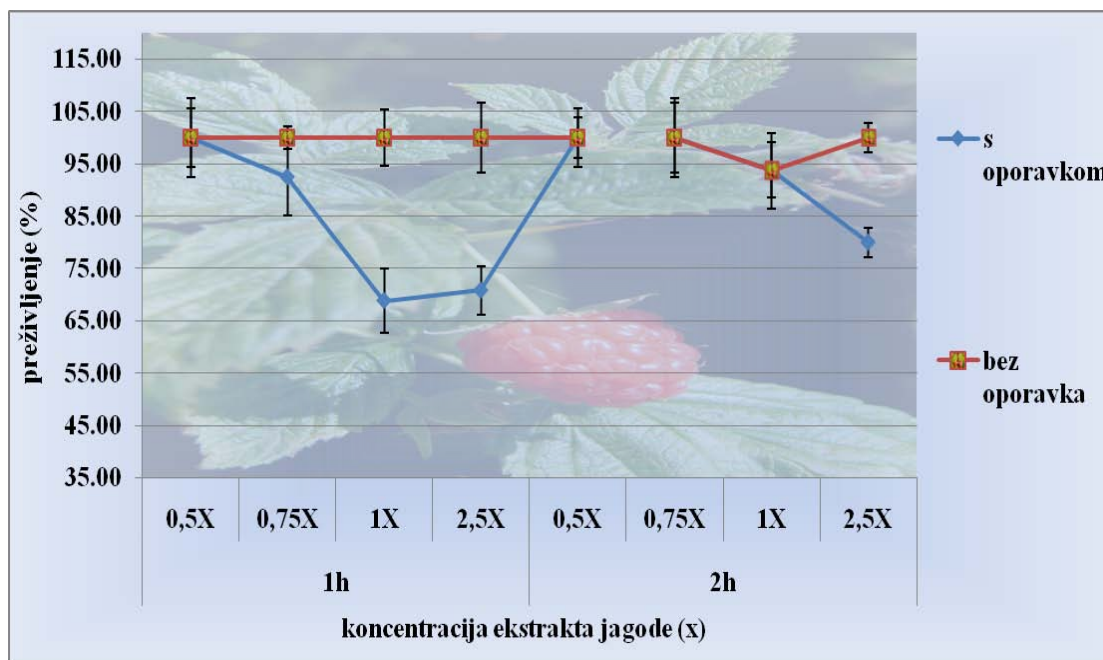
4.5.2.1. NR test



Slika 35. Krivulje preživljenja SW 480 staničnih linija nakon 1h i 2h tretmana s ekstraktom lista maline, s i bez oporavka

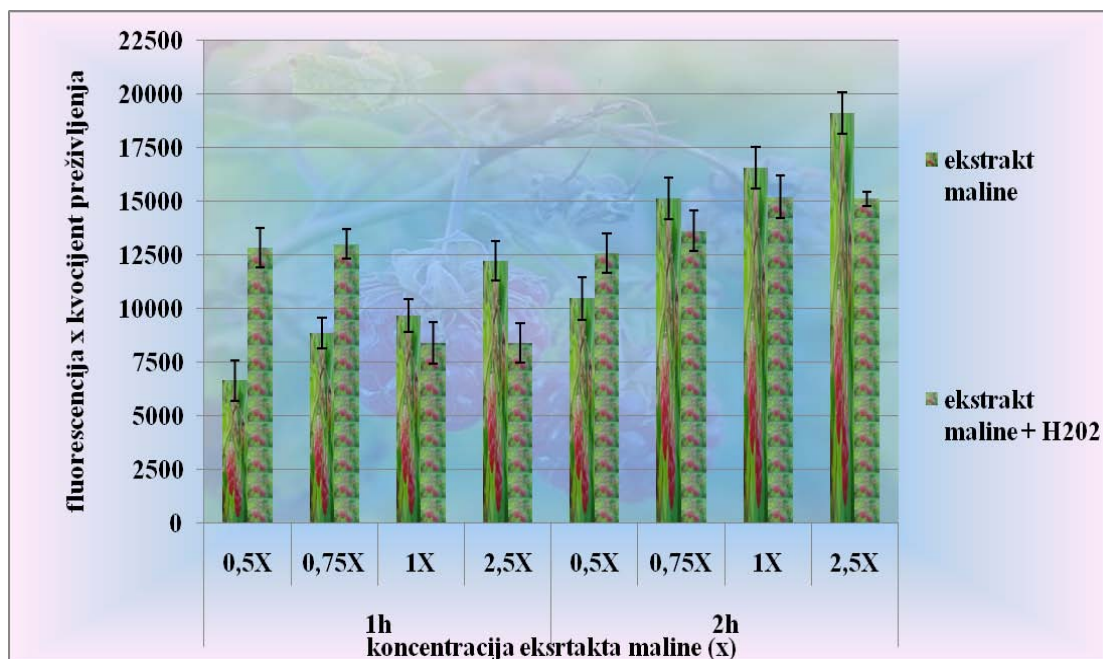


Slika 36. Krivulje preživljenja SW 480 staničnih linija nakon 1h i 2h tretmana s ekstraktom lista kupine, s i bez oporavka

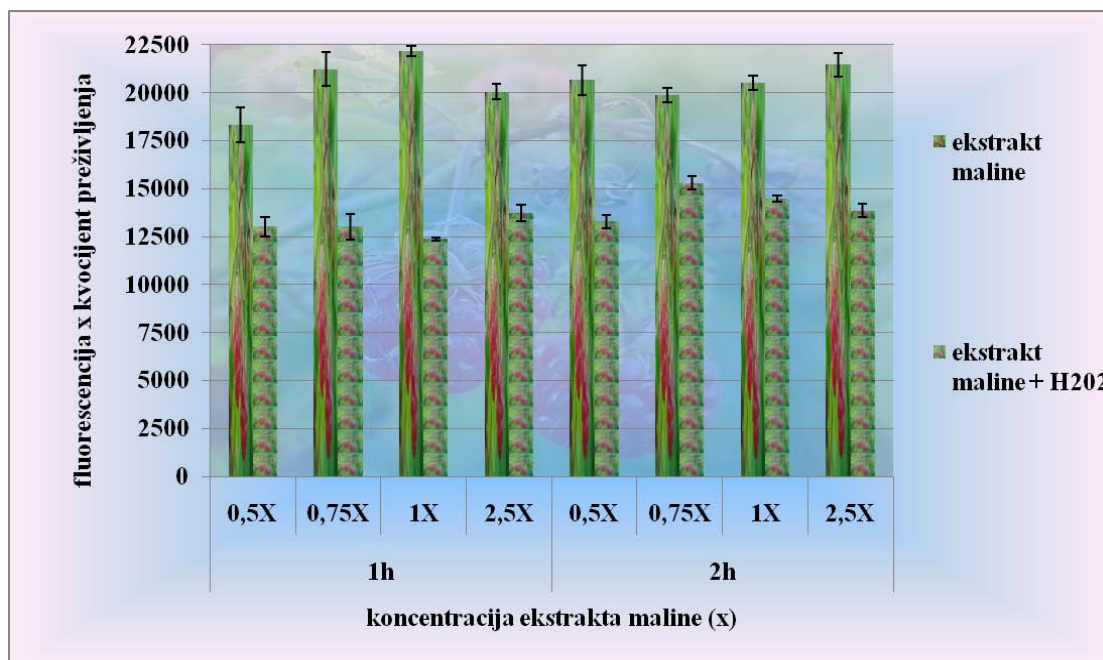


Slika 37. Krivulje preživljenja SW 480 staničnih linija nakon 1h i 2h tretmana s ekstraktom lista šumske jagode, s i bez oporavka

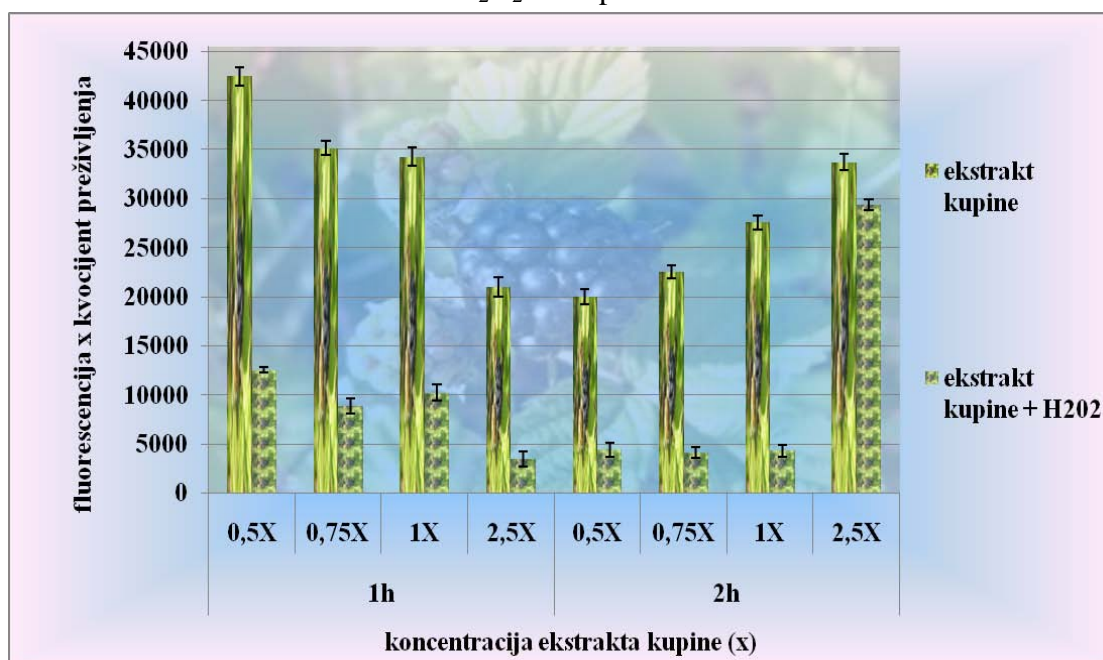
4.5.2.2. Određivanje slobodnih radikala u stanicama u monosloju



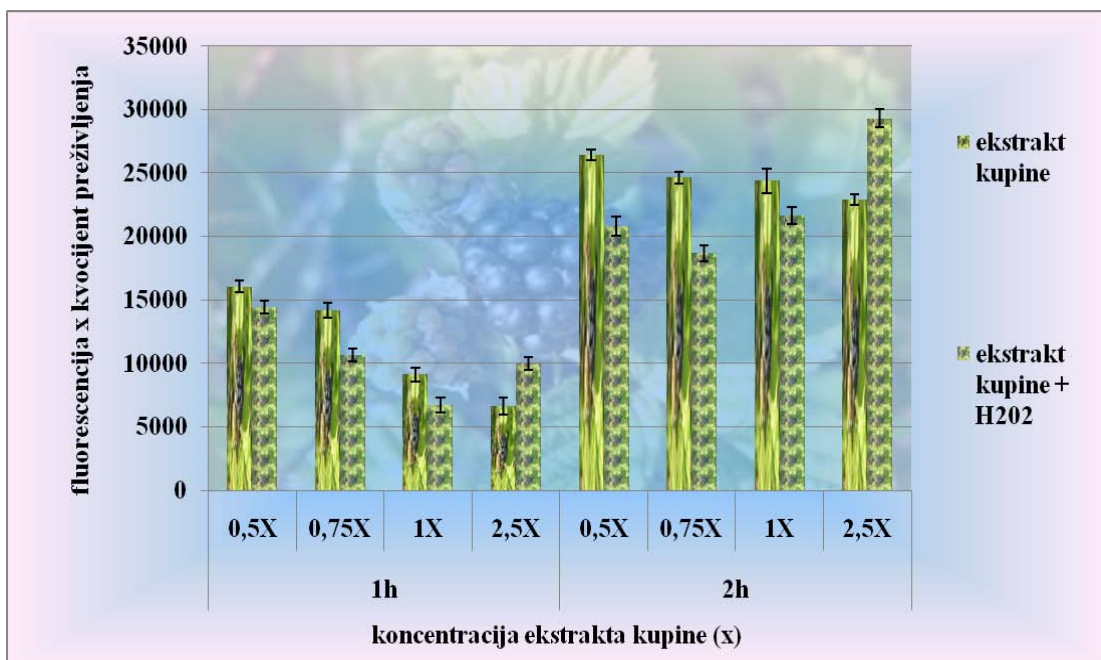
Slika 38. Izmjerene vrijednosti ROS-a u SW 480 staničnoj liniji nakon 1h i 2h tretmana ekstraktom lista maline i H₂O₂ s oporavkom



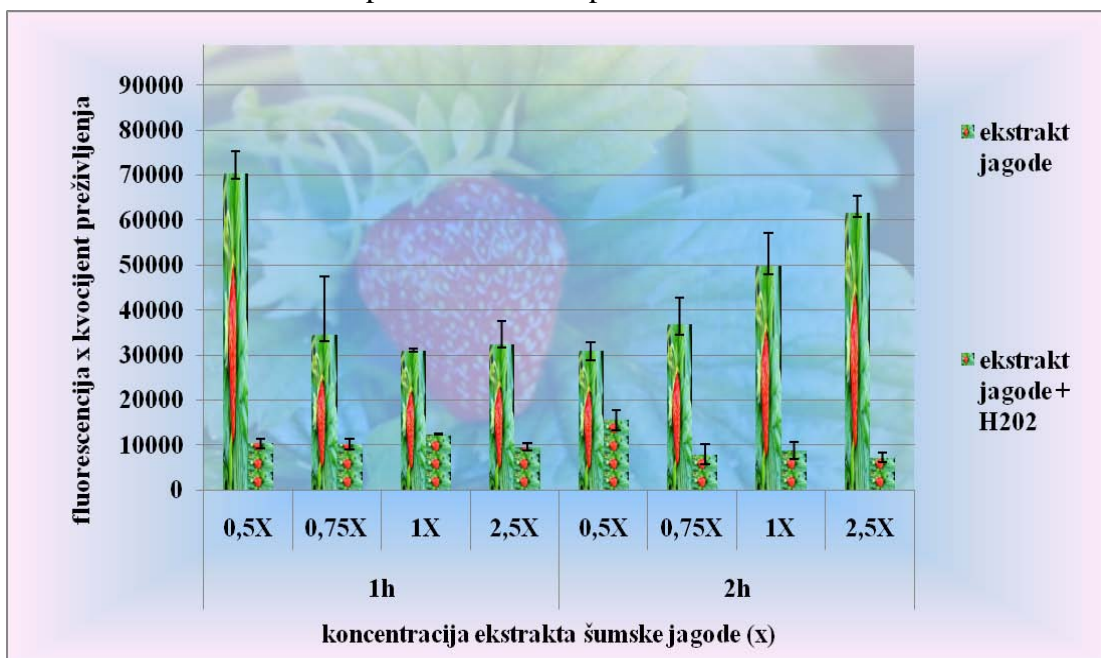
Slika 39. Izmjerene vrijednosti ROS-a u SW 480 staničnoj liniji nakon 1h i 2h tretmana ekstraktom lista maline i H₂O₂ bez oporavka



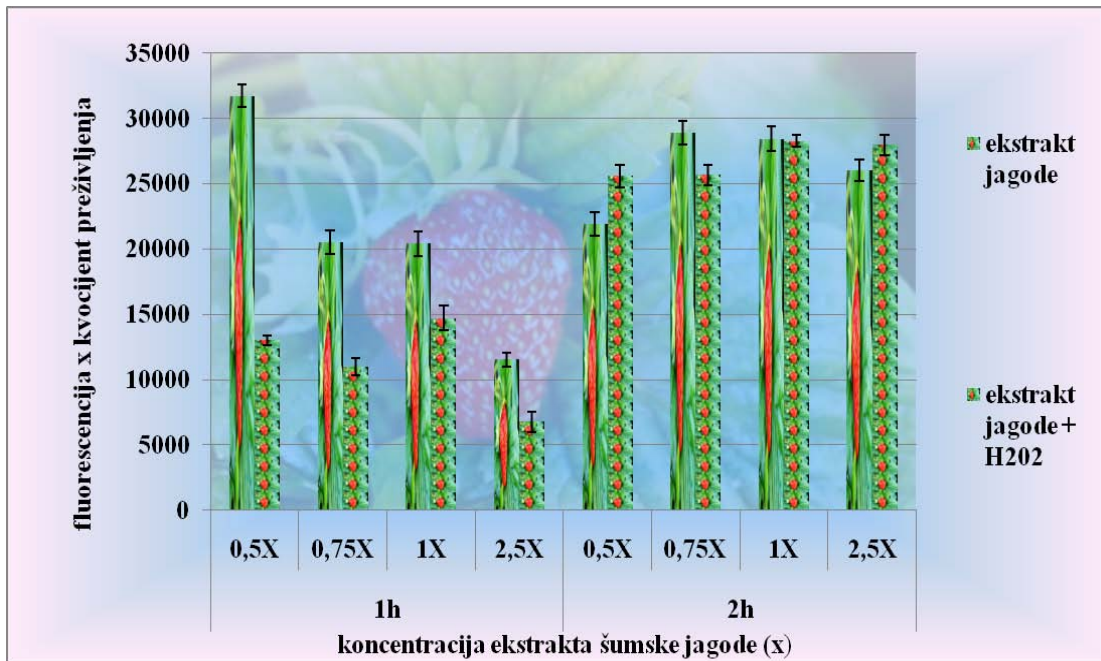
Slika 40. Izmjerene vrijednosti ROS-a u SW 480 staničnoj liniji nakon 1h i 2h tretmana ekstraktom lista kupine i H₂O₂ s oporavkom



Slika 41. Izmjerene vrijednosti ROS-a u SW 480 staničnoj liniji nakon 1h i 2h tretmana ekstraktom lista kupine i H₂O₂ bez oporavka



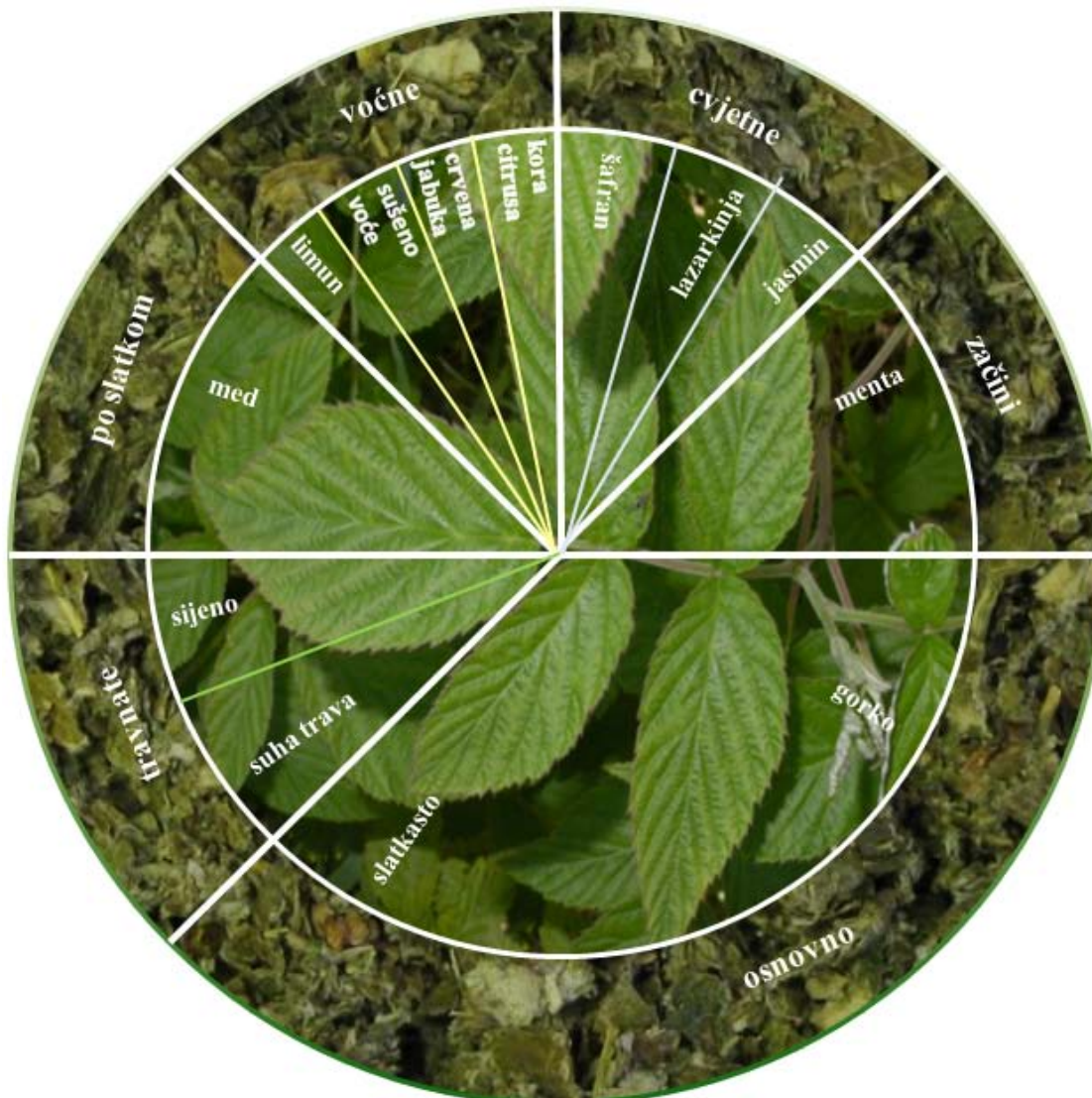
Slika 42. Izmjerene vrijednosti ROS-a u SW 480 staničnoj liniji nakon 1h i 2h tretmana ekstraktom lista šumske jagode i H₂O₂ s oporavkom



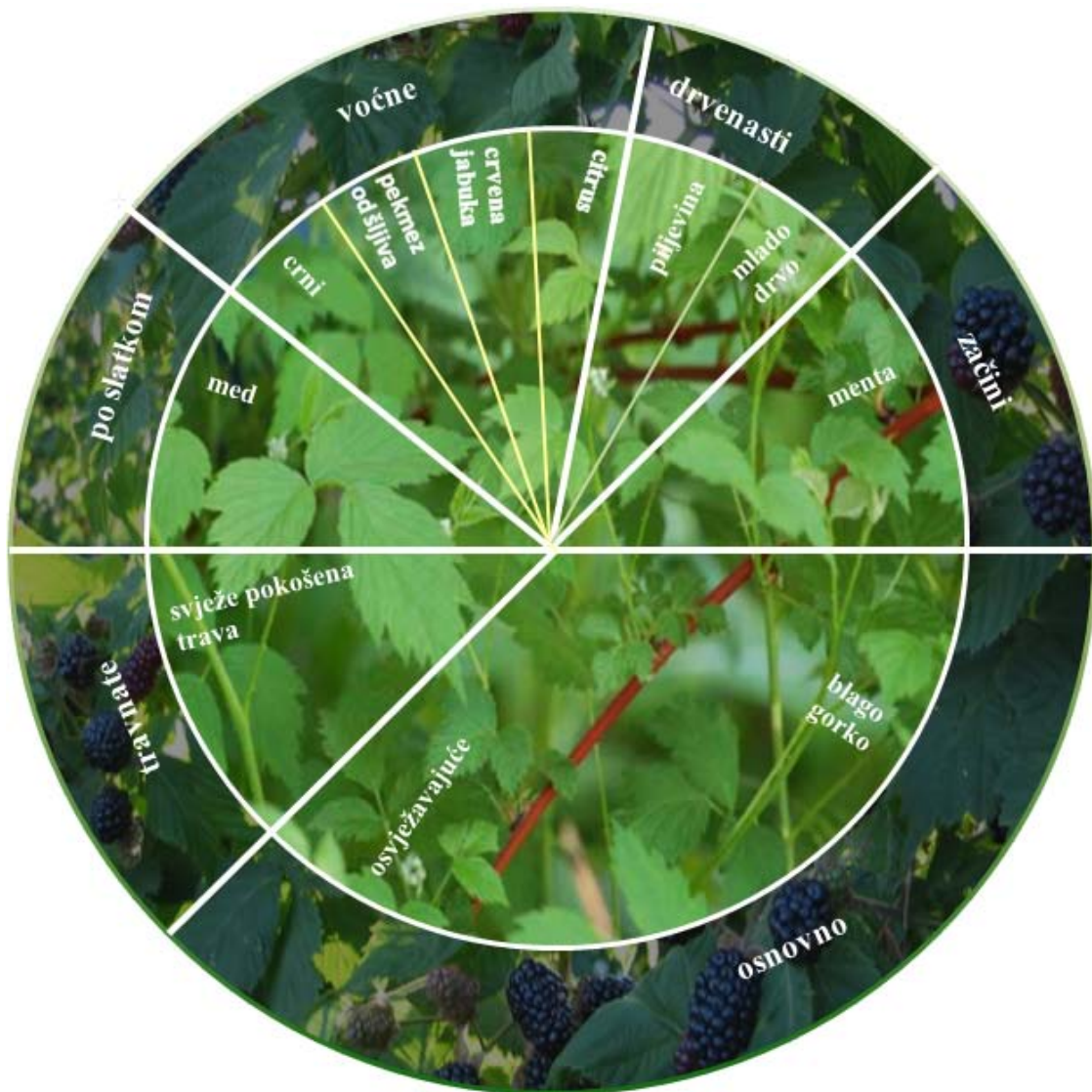
Slika 43. Izmjerene vrijednosti ROS-a u SW 480 staničnoj liniji nakon 1h i 2h tretmana ekstraktom lista šumske jagode i H₂O₂ bez oporavka

4.6. Senzorska analiza biljnih infuzija

4.6.1. Senzorska analiza biljnih infuzija lista maline, kupine i šumske jagode



Slika 44. Aromatski profil infuzije lista maline



Slika 45. Aromatski profil infuzije lista kupine



Slika 46. Aromatski profil infuzije lista šumske jagode

Tablica 20. Rezultati senzorske analize čajnih mješavina

<i>Mješavina</i>	<i>Miris</i>	<i>Okus</i>	<i>Prihvatljivost</i>	<i>Poznatost arome</i>	<i>Intenzitet arome</i>	<i>Intenzitet slatkoće</i>	<i>Ukupno:</i>
<i>M1</i>	<i>9,1±1,09</i>	<i>9,5±1,37</i>	<i>8,93±1,03</i>	<i>9,16±1,17</i>	<i>7,33±0,82</i>	<i>8,5±0,63</i>	<i>52,43</i>
<i>M2</i>	<i>8,66±1,36</i>	<i>8,66±1,21</i>	<i>8,83±1,17</i>	<i>7,83±0,75</i>	<i>7,0±0,63</i>	<i>7,33±0,82</i>	<i>48.31</i>
<i>M3</i>	<i>7,33±1,36</i>	<i>7,0±1,26</i>	<i>7,5±1,05</i>	<i>7,16±1,33</i>	<i>7,33±0,52</i>	<i>7,58±0,92</i>	<i>43.9</i>
<i>K1</i>	<i>9,0±1,26</i>	<i>8,5±1,38</i>	<i>9,0±1,05</i>	<i>8,66±1,21</i>	<i>8,66±1,37</i>	<i>8,33±1,37</i>	<i>52.15</i>
<i>K2</i>	<i>8,33±1,75</i>	<i>8,66±1,21</i>	<i>8,66±1,37</i>	<i>8,96±1,33</i>	<i>8,33±0,82</i>	<i>8,5±0,84</i>	<i>51.44</i>
<i>K3</i>	<i>7,33±1,63</i>	<i>7,66±1,37</i>	<i>7,33±1,03</i>	<i>7,33±1,50</i>	<i>7,5±0,84</i>	<i>7,17±1,17</i>	<i>44.32</i>
<i>J1</i>	<i>8,83±1,48</i>	<i>8,16±0,99</i>	<i>8,66±1,03</i>	<i>8,16±1,60</i>	<i>8,16±0,75</i>	<i>7,33±1,03</i>	<i>49.3</i>
<i>J2</i>	<i>8,83±0,98</i>	<i>9,46±1,03</i>	<i>9,83±0,98</i>	<i>8,33±1,21</i>	<i>8,50±1,38</i>	<i>7,16±1,33</i>	<i>52.11</i>
<i>J3</i>	<i>9,50±0,55</i>	<i>9,16±0,98</i>	<i>9,16±1,17</i>	<i>8,33±1,03</i>	<i>8,16±1,50</i>	<i>7,16±1,60</i>	<i>51,47</i>

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Za istraživanje je odabrano devet čajnih mješavina u kojima je udio osnovnih sastojaka (list kupine, list maline, list šumske jagode) bio 50%. Sastav preostalih 50% čine sušeno voće (jabuka, šljiva, marelica, groždica, smokva), listovi biljke stevije, batat te korijen mrkve i sladića. Infuzije svih čajnih mješavina pripremljene su prelijevanjem 300 mL kipuće vode preko 3 g čajne mješavine. U cilju karakterizacije fizikalnih svojstava mješavina određena su svojstva tečenja čajnih mješavina pomoću uređaja Powder Flow Analyzer, udjel nasipne gustoće metodom prema Murakamiu (2001), udjel pigmenata (β -karotena, likopena i klorofila) prema metodama Huang i sur. (2007) i Barrosa i sur. (2008) i boja uzoraka čajnih mješavina pomoću kolorimetra CM-3500 d (Konica – Minolta, Japan). U svrhu određivanja bioaktivnog sastava biljnih infuzija određen je udjel ukupnih fenola, ne flavonoida i flavonoida metodom s Folin-Ciocalteu reagensom, udjel flavan-3-ola pomoću reakcija s vanilin i p-DAC reagensima, udjel proantocijanidina metodom po Bate-Smith-u, antioksidacijski kapacitet pomoću metoda FRAP, ABTS i DPPH, udjel pojedinačnih polifenola i ugljikohidrata suhog voća metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, udjel mineralnih tvari u čajnim mješavinama pomoću atomske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu. Kako bi se odredila biološka aktivnost biljnih infuzija određen je citotoksični učinak i slobodni kisikovi radikali na humanoj staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva, te je naposljetku određen i senzorski profil biljnih infuzija i čajnih mješavina.

5.1. Anketa

Kao uvod u ispitivanje pripremljena je anketa koja je dala uvid u preferencije ispitanika prema biljnim infuzijama, uporabi sladila i sklonosti ispitanika isprobavanju novih čajnih mješavina. Anketa je provedena na mješovitoj populaciji od 62 ispitanika u dobi od 16 do 50 godina.

Provedenom anketom pokazalo se da 34% ispitanika konzumira čaj kao uobičajeni napitak, njih 64% konzumira kavu, dok 2% ispitanika konzumira energetske napitke.

Ispitanici koji preferiraju čaj najčešće ga konzumiraju jednom do dva puta tjedno (53%), manji postotak ispitanika konzumira ga 3 do 4 puta tjedno (29%), a manji broj ispitanika 5 do 7 puta tjedno (18%). Na dnevnoj bazi najčešće se konzumira jedna šalica čaja (85%), dok 13% ispitanika konzumira dvije šalice čaja dnevno. Među čajevima u najvećoj mjeri konzumira se voćni čaj (44%) zbog njegovog okusa i arome (73%), a slijede ga biljni (32%) i pravi čajevi (*Camellia sinensis*) (24%).

Čaj se može konzumirati u više oblika, pa su ispitanici mogli odabrati čaj pripremljen iz rinfuze, čaj iz filter vrećice, instant čaj i ledeni čaj. Pokazalo se da se u najvećoj mjeri konzumira čaj iz filter vrećice (69%), zatim čaj u rinfuzi (23%) i ledeni čaj (6 % ispitanika), dok se najmanje konzumira instant čaj (2%).

Ovisno o dodacima s kojima konzumiraju čaj, pokazalo se da najveći broj ispitanika čaj pije s medom (31%) ili bez dodataka (22%). Čaj s mlijekom konzumira 1% ispitanika, a 20% ispitanika konzumira čaj sa šećerom i limunom. Ovisno o korištenim sladilima, šećer koristi 52% ispitanika, prirodna sladila koristi 46% ispitanika dok njih 2% koristi umjetna sladila.

Na upit o intenzitetu slatkoće čaja najveći broj ispitanika odgovorio je da preferira umjereno sladak čaj (77%), dok samo 3% ispitanika konzumira nezaslađene čajeve. 31% ispitanika izrazilo je želju isprobati čajnu mješavinu s prirodnim sladilima, njih 47% voli isprobavati nove okuse, dok se u najmanjoj mjeri (22%) konzumiraju isprobani brendovi.

5.2. Određivanje fizikalnih svojstava čajnih mješavina

5.2.1. Određivanje nasipne gustoće čajnih mješavina

Čajne mješavine pokazuju relativno niske vrijednosti nasipne gustoće zbog prisutnih velikih količina zraka između čestica različitih veličina. Čajne mješavine koje sadrže sušeno voće i koje sadrže čestice ujednačenih dimenzija pokazuju veće vrijednosti nasipne gustoće. Ujedno i veća koncentracija sušenog voća u čajnoj mješavini znači i višu vrijednost nasipne gustoće. Iz dobivenih vrijednosti nasipne gustoće izračunat je Hausnerov omjer (omjer ρ_{1250}/ρ_{10}) kao indikator lakoće tečenja mješavina, s obzirom da se svojstva tečenja za većinu čajnih mješavina nisu mogla odrediti analizatorom tečenja. Vrijednosti Hausnerovog omjera blizu su ili prekoračuju vrijednost 1,25 iznad koje se čajne mješavine kategoriziraju kao loše

tečuće. Vrijednost Hausnerovog omjera potvrđuje da čajne mješavine pokazuju loša svojstva tečenja.(tablica 9).

5.2.2. Određivanje svojstava tečenja čajnih mješavina

S namjerom da se utvrdi kako se ponašaju čajne mješavine tijekom transporta i skladištenja, provedena su istraživanja na Powder Flow Analyseru (Stable Micro Systems, Godalming, UK). Iako je prvobitna namjera bila provesti tri testa vezana uz svojstva tečenja čajnih mješavina (test kohezije, test ovisnosti o brzini tečenja i test stvaranja kolača), većina se uzoraka pokazala neprikladnim za analize na analizatoru tečenja reometarskom metodom. Naime, od ukupno pripremljenih 12 uzoraka, na njih četiri (M, K, K3 i J) uspješno je proveden test kohezije. Koristeći vrijednosti dobivene u testu kohezije, izračunat je indeks kohezije prema kojem su čajne mješavine klasificirane. Mješavine M, K i K3 prema indeksu kohezije klasificirane su kao nekohezivne mješavine koje slobodno teku, dok se mješavina J pokazala izrazito kohezivnom sa vrlo visokom vrijednošću indeksa kohezije (-32,45). S obzirom na indeks kohezije, mješavine M, K i K3 slabo su kohezivne i bolje će se ponašati tijekom miješanja ili transporta kroz proizvodni pogon, što predstavlja logično saznanje s obzirom da čajne mješavine zbog velike nehomogenosti karakterizira prisustvo velikih količina zraka među česticama koji ne dozvoljava mnogo interakcije između čestica koje bi smjesu činile kohezivnom.

Na ostalim uzorcima sila koju je na bazu instrumenta nametnula oštrica krećući se kroz stupac čajne mješavine u cilindru za mjerenje bila je prevelika za očitavanje na senzoru smještenom na bazi instrumenta te zbog toga mjerenja na ostalim uzorcima nije bilo moguće provesti.

Test ovisnosti o brzini tečenja u potpunosti je proveden samo na uzorku K, dok za ostale uzorke nije dobiven kompletni profil koeficijenata sabijanja pri svim brzinama tečenja, a time nisu mogle biti dobivene niti vrijednosti indeksa stabilnosti toka za sve ostale uzorke. Uzorak K pokazao se ovisnim o brzini tečenja. Koeficijenti sabijanja padaju sa porastom brzine tečenja, što znači da mješavina bolje teče pri većim brzinama tečenja. Indeks stabilnosti toka ima vrijednost 0,55 što potvrđuje ovisnost fizikalnih svojstava o brzini tečenja mješavine.

Test stvaranja kolača moguće je bilo provesti na uzorcima M, K i J te su svi navedeni uzorci pokazali značajan porast visine stupca praha, što ujedno i znači da su jako podložni stvaranju

kolača. Vrijednosti čvrstoće kolača i prosječne čvrstoće kolača ukazuju na veliku čvrstoću i stabilnost kolača koji nastaje sabijanjem čajne mješavine što ujedno za sobom povlači i velike probleme kod rukovanja takvim praškastim smjesama. S obzirom da su mješavine izrazito nehomogene te sadrže komadiće sušenog voća, logično je za očekivati da će prisustvo ljepljivih čestica sušenog voća pridonijeti povećanju čvrstoće kolača. Općenito gledajući, testovi ovisnosti o brzini tečenja i stvaranja kolača pokazali su da čajne mješavine čine relativno problematičan materijal za miješanje i transport u proizvodnom pogonu (tablica 10).

5.2.3. Određivanje boje čajnih mješavina

Boja je određena na svježe pripremljenim uzorcima i uzorcima nakon 24 sata stajanja. Svježe pripremljeni uzorci su svjetliji od 24 sata starih uzoraka, što vidimo iz raspona L-parametra koji je za svježe pripremljene uzorke (83-94) viši nego za 24 sata odstajale (79-84).

Najsvjetlija biljna infuzija je malina, a najtamnija kupina. Infuzije čajnih mješavina maline svjetlije su od infuzija čajnih mješavina kupine i šumske jagode. Infuzije čajnih mješavina kupine su tamnije od infuzija čajnih mješavina maline i šumske jagode.

A-parametar za svježe pripremljene infuzije se kreće u rasponu od -3 do -4, a za 24 sata odstajale čajeve od -0,7 do 4. Takve vrijednosti pokazuju da u čajevima dominira zelena boja u odnosu na crvenu, te se stajanjem čajnih infuzija zelena boja počinje gubiti. Najviše izražen zeleni ton kod svježih uzoraka pokazuje uzorak J2, a najmanje izražen uzorak K, no razlika je nezamjetna. Najnižu vrijednost, odnosno najjače izraženu zelenu boju kod odstajalih uzoraka ima uzorak J1, a najnižu uzorak M. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da stajanjem infuzije gube zelenu boju i poprimaju smeđkast ton.

B-parametar za svježe pripremljene čajeve kreće se u rasponu 21 do 37, a za dan odstajale čajeve od 41 do 60. Prema tome u svježim uzorcima kao i u odstajalim, prevladava žuta boja koja se lagano gubi stajanjem. Od svježih uzoraka, M2 ima najviše izraženu žutu boju, a K3 najmanju. Kod odstajalih uzoraka najizraženiji žuti ton imaju infuzije čajnih mješavina maline, a najmanje izražen žuti ton infuzije čajnih mješavina kupine. Prema dobivenim vrijednostima može se zaključiti da su najsvjetliji uzorci maline, dok su uzorci kupine najtamniji, a u čajevima dominira žut i zelen ton (tablica 11).

Zbog nedostatka literaturnih podataka o određivanju boje biljnih infuzija lista maline, kupine i jagode za usporedbu može poslužiti istraživanje Huanga i suradnika (2011) koji su ispitivali boju infuzije zelenog, žutog i crnog čaja. Zeleni, žuti i crni čaj imaju viši L-parametar (zeleni čaj $L= 99,25 \pm 0,05$; žuti čaj= $98,89 \pm 0,05$; crni čaj= $96,22 \pm 0,11$) od biljne infuzije lista maline, kupine i šumske jagode (srednja vrijednost L-parametra za infuzije čajnih mješavina lista maline je 94,68; kupine 87,24; a jagode 91,79), odnosno zeleni, žuti i crni čaj su svjetliji od čajnih mješavina lista maline, kupine i jagode.

A-parametar zelenog ($-0,44 \pm 0,03$), žutog ($-0,25 \pm 0,03$), i crnog čaja ($-1,91 \pm 0,01$) je viši nego prosječna vrijednost a-parametra kod infuzije čajnih mješavina lista maline ($-3,63$), kupine ($-3,59$) i šumske jagode ($-4,06$). Odnosno infuzije čajnih mješavina lista maline, kupine i šumske jagode imaju neznatno izraženiju zelenu boju od zelenog, crnog i žutog čaja, no u svim navedenim uzorcima prevladava zeleni ton u odnosu na crveni.

Prosječna vrijednost b-parametra infuzije lista maline (26,47), kupine (37,01) i šumske jagode (31,38) je veća prema vrijednostima zelenog ($3,76 \pm 0,31$), žutog ($4,63 \pm 0,03$) i crnog ($19,99 \pm 0,54$) čaja, stoga čajne mješavine lista maline, kupine i šumske jagode imaju jače izražen žut intenzitet boje u odnosu na zeleni, žuti i crni čaj. U svim navedenim infuzije čajnih mješavina i čajevima prevladava žuti ton u odnosu na plavi.

Iz prethodno navedenog možemo zaključiti da su infuzije ispitivanih čajnih mješavina, po svim kolorimetrijskim parametrima najbliži crnom čaju.

5.3. Određivanje bioaktivnog sastava čajnih mješavina

5.3.1. Određivanje pigmenata

5.3.1.1. Određivanje udjela ukupnog klorofila

Usitnjeni dijelovi čajnih mješavina ekstrahirani su s 80 %- tnim acetonom te je filtratu izmjerena apsorbanacija. Intenzitet zelenog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 663 nm (za klorofil a) i 645 nm (za klorofil b) (Huang i sur., 2007). Udjeli klorofila u biljnim ekstraktima prikazani su na slici 29 a rezultati su izraženi kao $\mu\text{g/g}$ uzorka.

Najveći udjel klorofila među ispitivanim uzorcima određen je u listu maline (M) (1107,69 $\mu\text{g/g}$ uzorka), a najmanji u listu kupine (736,78 $\mu\text{g/g}$ uzorka). Pokazalo se da dodatkom sušenog voća u čajnim mješavinama raste udjela klorofila.

Pokazalo se da je mala razlika u udjelu klorofila između čajne mješavine lista kupine (K3) (636,29 \pm 0,04 $\mu\text{g/g}$ uzorka) i čajne mješavine lista šumske jagode (J3) (599,59 $\mu\text{g/g}$ uzorka) te između čajne mješavine lista maline (M2) (809,32 \pm 0,12 $\mu\text{g/g}$ uzorka) i čajne mješavine lista kupine (K3) (636,29 \pm 0,04 $\mu\text{g/g}$ uzorka) u čijem su sastavu prisutni listovi biljke stevije koja je bogata klorofilom. (slika 29).

King i suradnici (2001) koji su ispitivali utjecaj vanjskih čimbenika temperature skladištenja i čuvanja na udjel klorofila u blanširanom i neblanširanom uzorku listova špinata. U neblanširanom uzorku odredili su udjel klorofila a (6,75 \pm 0,53 mg/g suhe tvari) i klorofila b (2,56 \pm 0,18 mg/g suhe tvari) čiji je zbroj vrijednosti 9,31 mg/g suhe tvari što je u redu veličine u sklopu ovog istraživanja, budući da zbroj vrijednosti klorofila a i klorofila b u listovima čajnih mješavina iznosi 8,85 mg/g uzorka. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da listovi maline, kupine i šumske jagode kao i njihove čajne mješavine predstavljaju odličan izvor klorofila a i b.

5.3.1.2. Određivanje udjela ukupnih karotenoida

Ukupni karotenoidi (β - karoten i likopen) čajnih mješavina određeni su spektrofotometrijski. Uzorci su ekstrahirani mješavinom acetona i heksana u omjeru 4:6 te je filtratu izmjerena apsorbancija na valnim duljinama od 456 nm, 505 nm i 663 nm (Barros i sur., 2008). Udjeli ukupnih karotenoida prikazani su na slici 29, a rezultati su izraženi kao $\mu\text{g/g}$ uzorka.

Najveći udjel β - karotena određen je u listu kupine (K) (495.24 \pm 14.47 $\mu\text{g/g}$ uzorka) dok je najveći udio likopena određen u čajnoj mješavini lista maline (M3) (27.933 \pm 0,01 $\mu\text{g/g}$ uzorka). Najmanji udjel β - karotena određen je u čajnoj mješavini lista šumske jagode (J3) (72.46 \pm 1.82 $\mu\text{g/g}$ uzorka), što pokazuje da je razlika između najvećeg i najmanjeg udjela β - karotena 6,83 puta. Najmanji udjel likopena određen je u čajnoj mješavini lista kupine (K2) (1.282 \pm 0,01 $\mu\text{g/g}$ uzorka) što je čak 21,78 puta manje od najvećeg izmjenog udjela (M3). Vrlo je mala razlika u udjelu likopena između čajne mješavine lista maline (M2)

($19.614 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ uzorka) i čajne mješavine lista šumske jagode (J2) ($19.188 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$ uzorka) u čijem se sastavu nalazi sušena mrkva za koju je poznato da obiluje karotenoidima.

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da na udjel karotenoida značajno utječe sastav čajnih mješavina, zbog prisustva raznovrsnih biljnih supstrata koji su bogat izvor biljnih pigmenata.

5.3.2. Određivanje mineralnih tvari u čajnim mješavinama

U čajnim mješavinama određeno je 15 mineralnih tvari koje su prikazane u tablici 12 i 13, a rezultati su izraženi u mg/g (Al, Ca, K, Mg) i $\mu\text{g/g}$ (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Na, Ni, Pb, Zn). Na temelju dobivenih rezultata, pokazalo se da čajne mješavine lista maline, kupine i šumske jagode sadrže značajan udio mineralnih tvari.

Zbroj vrijednosti Al, Ca, K i Mg u listu maline iznosi $12,53 \text{ mg/g}$, listu kupine $13,66 \text{ mg/g}$, a u listu šumske jagode $18,42 \text{ mg/g}$. U listu maline zbroj vrijednosti mikroelemenata iznosi $158,32 \mu\text{g/g}$, u listu kupine $403,56 \mu\text{g/g}$, a u listu šumske jagode zbroj vrijednosti mikroelemenata iznosi $628,59 \mu\text{g/g}$, iz čega se jasno može zaključiti da list šumske jagode sadrži najveću količinu mineralnih tvari, nakon čega slijedi kupina i naposljetku list maline. Takav je poredak također primijećen i kod udjela makroelemenata čajnih mješavina lista jagode, kupine i maline.

List šumske jagode i pripadajuće čajne mješavine sadrže u odnosu list maline i kupine značajnu količinu Al ($6,05 \text{ mg/g}$), K ($8,41 \text{ mg/g}$), Cr ($23,6 \mu\text{g/g}$), Cu ($6,82 \mu\text{g/g}$), Pb ($12,4 \mu\text{g/g}$) i Zn ($25,3 \mu\text{g/g}$). List kupine (K) najbogatiji je mineralima: Mn ($233 \mu\text{g/g}$), Fe ($45,6 \mu\text{g/g}$) i Ni ($39,4 \mu\text{g/g}$), dok čisti list maline (M) sadrži najviše Mg ($2,07 \text{ mg/g}$). Nadalje, list čajne mješavine maline (M2) sadrži najviše Na ($205 \mu\text{g/g}$); list čajne mješavine kupine (K₃) najviše Cd ($0,371 \mu\text{g/g}$), a list čajne mješavine šumske jagode (J2) najviše Ba ($68,6 \mu\text{g/g}$). Također, mineral Co izmjeren je samo u dva uzorka: listu čiste šumske jagode (J) ($0,817 \text{ mg/g}$) i listu čajne mješavine maline (M2) ($0,472 \mu\text{g/g}$), dok u ostalim uzorcima njegova prisutnost nije detektirana.

Količina Al veća je u čajnim mješavinama M3 ($4,33 \mu\text{g/L}$), K₃ ($4,94 \mu\text{g/L}$) i J3 ($4,96 \mu\text{g/L}$) u odnosu na ostale čajne mješavine lista maline, kupine i šumske jagode. Isto tako količina K

veća je u uzorcima M3 (4,41 µg/L), K₃ (5,45) µg/L i J3 (6,02 µg/L) u odnosu na čajne mješavina broj 1 i 2, a značajna količina Fe je detektirana u K₃ (35,9 µg/L) i J3 (34,8 µg/L), te značajne količine Mn i Mg u M3 (121 µg/L) i J3 (134 µg/L) što možemo pripisati nutritivnim svojstvima batata i korijena sladića. Količina Ca je veća u uzorcima čajnih mješavina broja 1 i 2 u odnosu na čisti list i čajne mješavine broja 3, a isti trend rasta prate i Ba i Cd. Udio Na je znatno viši u čajnim mješavinama nego u čistom listu maline i kupine. List šumske jagode kao što je već navedeno obiluje Na, čiji udjel se u čajnim mješavinama lista šumske jagode dodatno povećava kao posljedica dodatka suhog voća, povrća, korijena sladića te lista stevije. Jedino je udio Zn veći u čistom listu kupine ili jagode u odnosu na čajne mješavine kupine i jagode broja 1, 2 ili 3.

Marshall i suradnici (2006) su proveli istraživanje na listu maline u svrhu određivanja mineralnih tvari atomskom spektrometrijom. U usporedbi sa rezultatima u ovom radu Marshall i sur. (2006) odredili su veći udjel Ca (4,83 mg/g u odnosu na naših 1,92 mg/g), Cu (5,00 µg/g; 1,97µg/g), Fe (22,76µg/g ; 4,77 µg/g), Mg (4.53 mg/g, u odnosu na 2,07mg/g), K (25,85mg/L u odnosu na 4,28 mg/L), Zn (21,90µg/L; 5,36 (µg/g)). Prema našim rezultatima list maline sadrži veću koncentraciju Mn (43,50L; 121) i Na (1,52 (µg/g) ; 9,37) u usporedbi sa tim istraživanjem.

Kara, D. (2009) je istraživao udio pojedinih mineralnih tvari u listu kupine, te su odstupanja manja u usporedbi sa prethodno navedenim rezultatima. Zabilježene su sljedeće koncentracije u µg/g: Mg (2786), Zn (7,4), Cu (6,6), Mn (54), 6, Ba (9,7), Ni (4,5), relativno značajnije odstupanje je zabilježeno kod Fe (165) i Na (44,0). Primijećene razlike u udjelima pojedinih makro- i mikro-elemenata između uzoraka lista maline i kupine u ovom istraživanju te onima drugih autora, mogu se objasniti utjecajem geografske lokacije, klimatskih uvjeta, varijeteta biljke ili pak drugim utjecajima koji utječu na biosintezu i udjel mineralnih tvari u proizvodima biljnog podrijetla.

Možemo zaključiti da su čajne mješavine kvalitativno vrijedan izvor mineralnih tvari, te da se količina mineralnih tvari povećava uz korištenje već spomenutih dodataka.

5.3.3. Određivanje udjela ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida

Udjeli ukupnih fenola, neflavonoida i flavonoida svih ispitivanih čajnih mješavina prikazani su tablici 30 i izraženi su kao mg GAE/L.

Najveći udjeli ukupnih fenola određeni su u infuzijama lista maline (M) (572,73±38,57 mg GAE/L), lista kupine (K) (568,18±45,00 mg GAE/L) i listu šumske jagode (J) (531,82±6,43 mg GAE/L). Vrlo je mala razlika u udjelu ukupnih fenola između infuzije mješavine lista maline (M2) (277,27±6,43 mg GAE/L) i infuzije mješavine lista kupine (K1) (259,09±6,43 mg GAE/L), kao i između infuzije mješavine lista kupine (K2) (350,00±6,43 mg GAE/L) i infuzije mješavine lista šumske jagode (J1) (340,91± 6,43 mg GAE/L) iz čega se može zaključiti da se smanjenjem udjela listova maline, kupine i šumske jagode u čajnim mješavinama smanjuje udjel ukupnih fenola kao što je prikazano na slici 30.

Prema dobivenim rezultatima vidljiv je opadajući niz udjela ukupnih fenola: $M > K > J > J2 > K2 > J1/J3 > K3 > M2 > K1 > M1 > M3$.

Najveći udjel ukupnih flavonoida pokazuje infuzija lista kupine (K) (232,73±21,86 mg GAE/L), a najmanji infuzija lista maline (M) (194,09±0,64 mg GAE/L), što pokazuje da je razlika između najvećeg i najmanjeg udjela ukupnih flavonoida 1,19 puta. Vrlo je mala razlika u udjelu ukupnih flavonoida između infuzije mješavine lista kupine (K2) (143,64±10,29 mg GAE/L) i infuzije mješavine lista šumske jagode (J1) (132,73±11,57 mg GAE/L) koje sadrže list stevije i sušenu mrkvu, kao i između infuzije mješavine lista maline (M2) (184,09±0,64 mg GAE/L) i infuzije mješavine lista kupine (K1) (171,82±3,86 mg GAE/L). Sastav infuzija čajnih mješavina obogaćen je suhim voćem (smokva, šljiva, marelica), pa je tako u slučaju infuzije čajne mješavine lista kupine (K2) (143,64±10,29 mg GAE/L) i infuzija čajne mješavine lista maline (M2) (184,09±0,64 mg GAE/L) vidljivo da su mješavine bogatije polifenolnim spojevima.

Najmanji udio ukupnih neflavonoida ima infuzija lista maline (M1) (194,09±0,64 mg GAE/L), a najveći infuzija lista kupine (K) (232,73±21,86 mg GAE/L), što čini razliku od 1,19 puta između najvećeg i najmanjeg udjela ukupnih neflavonoida.

Venskutonis i suradnici (2007) ispitivali su sastav ukupnih fenola te rezultate izrazili kao mg/g GAE. Za istraživanje su koristili 41 uzorak lista maline čije su vodene ekstrakte pripremili tako što su 1 g suhih listova maline ekstrahirali u 96%-tnom etanolu kroz 2 h uz

stalno miješanje. Najveći udio ukupnih fenola određen je za uzorke (23) ($12 \pm 0,3$ mg/g GAE), (26) ($11,9 \pm 0,1$ mg/g GAE) i (31) ($11,8 \pm 0,3$ mg/g GAE) što pokazuje da su rezultati ovog istraživanja u redu veličine s provedenim istraživanjem.

5.3.4. *Određivanje udjela flavan-3-ola*

Udjeli flavan-3-ola određeni u ispitivanim biljnim infuzijama prikazani su na slici 31 i izraženi su kao mg/L (+)-katehina. Udjeli su određeni primjenom metode s vanilin i p-DAC reagensima.

Prema metodi s vanilinom, najveći udjel flavan-3-ola određen je u infuziji lista šumske jagode (J) ($73,57 \pm 0,41$ mg/L (+)-katehina), a najmanji u infuziji lista kupine (K2) ($30,53 \pm 0,82$ mg/L (+)-katehina), što predstavlja razliku od 2,41 puta. Infuzija mješavine lista maline (M3) ($31,12 \pm 1,23$ mg/L (+)-katehina) u sastavu sadrži batat i sušenu smokvu te je u njoj određen veći udjel flavan-3-ola od infuzije mješavine lista kupine (K3) ($22,39 \pm 0,82$ mg/L (+)-katehina) koja u svom sastavu sadrži korijen sladića i sušenu šljivu. List šumske jagode (J) ima značajno veći udjel flavan-3-ola od svih drugih infuzija: 1,44 puta više od infuzije lista šumske jagode (J3) koja je na drugom mjestu prema njihovom udjelu, a u sastavu sadrži batat, korijen sladića i sušeno voće (smokva i šljiva).

Prema metodi s p-DAC reagensom, najveći udjel flavan-3-ola određen je u listu šumske jagode (J) ($16,47 \pm 0,36$ mg/L (+)-katehina).

Prema dobivenim rezultatima udjela flavan-3-ola koristeći metodu s p-DAC reagensom, može se definirati slijedeći opadajući niz infuzija: $J > J1 > J3 > J2 > M > M3 > M3 > M1 > K > K1 > K3 > K2$.; odnosno za metodu s vanilinom: $J > J3 > J1 > J2 > M > M3 > K > M3 > K1 > M3 > K2 > K3$.

5.3.5. *Određivanje proantocijanidina hidrolizom po Bate – Smith-u*

Udjeli proantocijanidina prikazani su na slici 32, a rezultati su izraženi kao mg CyE/L. Najveći udjel proantocijanidina izmjeren je u infuziji lista šumske jagode (J) ($33,24 \pm 0,80$ mg

CyE/L), a najmanji u infuziji lista kupine (K) ($11,13 \pm 0,40$ mg CyE/L), što pokazuje da je razlika između najvećeg i najmanjeg udjela proantocijanidina 2,98 puta.

Nadalje, vrlo je mala razlika u udjelu proantocijanidina između infuzije mješavine lista maline (M1) ($8,73 \pm 1,20$ mg CyE/L) i infuzije mješavine lista kupine (K1) ($7,18 \pm 0,20$ mg CyE/L) koje u svom sastavu sadrže listove stevije, sušenu mrkvu, smokvu i marelicu.

5.3.6. Određivanje udjela polifenola metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Rezultati su provedeni na infuzijama čajnih mješavina lista maline, kupine i stevie (3 g/300mL vode) te na svim korištenim dodacima i prikazani su u tablicama: 14,15,16 i 17.

Infuzija lista maline u odnosu na kupinu i jagodu sadrži više polifenola te su posljedično i čajne mješavine maline bogatije polifenolnim spojevima u odnosu na čajne mješavine kupine i jagode.

Elaginsku kiselinu sadrže sve infuzije čajnih mješavina lista maline pri čemu očekivano infuzije čajne mješavine lista maline (71,90 mg/L) imaju najveći udio elaginske kiseline u usporedbi sa infuzijama čajnih mješavina kupine (28,82 mg/L) i šumske jagode (30,84 mg/L).

Kao posljedica dodatka stevije i sušenog voća koji u svom sastavu sadrže kava-kiselinu (stevija (52,64 mg/L), marelica (9,31 mg/L), šljiva (15,59 mg/L) i klorogensku kiselinu (stevija (101,36 mg/L, smokva (23,11 mg/L), jabuka 331,09 mg/L, groždica (56,25 mg/L) sve infuzije čajnih mješavina broja 1, 2 i 3 sadrže ove polifenolne spojeve, te kvercetin koji najvećim dijelom potječe od stevije (94,66 mg/L) i smokve (42,36 mg/L).

Uzorci čajnih mješavina broja 1 i 2 sadrže ferulinsku kiselinu koja najvećim dijelom potječe od stevije (54,49 mg/L) kao što se jasno vidi iz tablice 17

Kamferol sadrži čajne mješavine lista kupine (31,68 mg/L) i maline (78,49 mg/L), dok šumska jagoda sadrži kvercetin (67,50 mg/L) i apigenin (3,25 mg/L). Apigenin isključivo potječe od lista šumske jagode, a kvercetin osim od lista šumske jagode potječe i iz stevije, smokve i groždica te ga upravo iz tog razloga ima najviše u čajnim mješavinama broja 2.

U uzorcima broja 3 svih čajnih mješavina detektirana je ružmarinska kiselina koja potječe od dodanih listića mente (M3 (12,59 mg/L), K3 (14,91 mg/L), J3 (10,83 mg/L). Ružmarinska kiselina jedan je od glavnih polifenolnih spojeva iz skupine hidroksicimetnih kiselina, a može se smatrati predstavnikom i taksonomskim markerom biljaka iz porodice usnjača. Zahvaljujući iznimnim antioksidativnim svojstvima ružmarinska kiselina pokazuje brojne pozitivne učinke na ljudski organizam, uključujući antikancerogeno, anivirusno i antiupalno djelovanje (Wang i sur.).

Veberić i sur. (2008) određivali su polifenolne spojeve smokve, ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji (1h) dodatkom metanola i 1 % BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol) te su detektirani rutin (28.7 mg/100 g uzorka), (+)-katehin(4.03 mg/100 g), klorogenska(1.71 mg/100 g), (epikatehin 0.97 mg/100 g), galna to 0.38 mg/100 g i siringinska kiselina (0.10 mg/100 g). Koncentracija klorogenske kiseline (23.11 mg/L) je u skadu sa rezultatima istraživanja po Veberiću i sur. (2008).

Martini i suradnici (2009) odredili su polifenolni sastav kupine te su detektirali galnu kiselinu, kava kiselinu, ferulinsku kiseline, elaginsku kiselinu, rutin, kvercetin, kvercetin 3-O- β -D glukopiranozida i kamferola pomoću HPLC i ESI-MS analize.

U odnosu na istraživanje Martini i sur., (2009) ,(elaginska kiselina (166,76 μ g/100 g), kamferol (1,03 μ g/100g), kava kiselina(4,73 μ g/100 g)) infuzija kupine ispitivana u ovom radu sadržavala je veći udio udio elaginske kiseline (28,82 mg/L), kamferola(18,70) i kava kiseline(31,68).

Boban i suradnici (2008) ispitivali su ekstrakt lista šumske jagode koncentracije 6 g/100 mL te su identificirani sljedeći fenolni spojevi:katehin (245,72 mg/L), epikatehin (259,36 mg/L), epigalokatehin (325,98 mg/L), procijanidin B₁ (175,06 mg/L), procijanidin B₂ (14,80 mg/L),kvercetin-4'-glukozid (39,93 mg/L),apigenin (165,04 mg/L),trans-resveratrol (1,95 mg/L), epikatehin-3-galat (120,50 mg) dok smo mi indentificirali samo tri fenolna spoja, elaginsku kiselinu(30,84 mg/L), kvercetin (67,50 mg/L) i apigenin (3,25 mg/L) u usporedbi s tim rezultatima list šumske jagode korišten u ovom istraživanju sadrži veći udjel kvercentina i znantno manji udjel apigenina.

Buričova i suradnici (2011) određivali su udjel polifenolnih spojeva u listu maline, kupine i šumske jagode. U listu maline je osim elaginske kiseline nađen i (+) -katehin i (-)-epikatehin koje mi nismo detektirali. U prethodnim istraživanjima u mesu jabuke kao dominantni spojevi

nađeni su procijanidin B₁ (81,40 µg/g), procijanidin B₂ (54,35µg/g), klorogenska kiselina (52,93µg/g), epikatehin (44,69 µg/g) i katehin (10,42 µg/g) (Zhang i sur., 2010), nije u skladu s našim istraživanjima budući da smo mi detektirali navedene spojeve znatno većim koncentracijama. U šljivi je pronađena klorogenska i kava kiselina (Chun & Kim, 2004), u sljedećim koncentracijama kava kiselina (1,11 mg/100 g uzorka), p-kumarinska kiselina (1,11 mg/100 g uzorka), kvercetin3-O-rutinozid (2,50 mg/100 g uzorka) (<http://www.phenol-explorer.eu/>), koncentracija kava-kiseline je u skladu s navedenim mjerenjima, dok je količina p-kumarinske kiseline manja u odnosu na ta mjerenja. U grožđicama su u prethodnim radovima detektirani kvercetin i kamferol (Williamson & Carughi, 2010), dok je u marelici pronađena klorogenska kiselina, katehin, epikatehin, rutin, ferulinska kiselina i elaginska kiselina (Erdogan-Orhan, & Kartal, 2010; Clifford & Scalbert, 2000).

5.3.3.4. Određivanje udjela ugljikohidrata metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Udio šećera odnosno saharoze, fruktoze i glukoze određen je u suhom voću (grožđici, jabuci, smokvi, marelici i šljivi), suhom povrću (mrkvi i batatu) te u steviji i sladiću što je prikazano u tablici 18.

Saharozu ne sadrže grožđice, smokva, stevija i šljiva. Najveći udjel saharoze uočen je u mrkvi (0,988 g/g), a najmanji u sladiću (0,087 g/g). Udio saharoze u pojedinim uzorcima možemo prikazati u padajućem nizu:

mrkava > marelica > batat > jabuka > sladić.

Saharozu, u odnosu na druge šećere prevladava u uzorcima batata(0,079 mg/g) i mrkve.

Svi uzorci sadrže fruktozu, najviše fruktoze detektirano je u jabuci(0,422 g/g), a najmanje u batatu (0,025g/g), što možemo prikazati u padajućem nizu:

jabuka > grožđice > smokva > šljiva > mrkva > marelica > sladić > stevija > batat.

Fruktoza je najzastupljeniji šećer u jabuci i sladiću.

Glukozu sadrže svi uzorci osim sladića, najmanji udjel glukoze ima batat (0,020 mg/L), a najveći šljiva (0,4174 mg/L). Udjel glukoze možemo prikazati u padajućem nizu: šljiva > grožđice > smokva > marelica > mrkva > jabuka > stevija.

U odnosu na saharozu i fruktozu, glukoza prevladava u marelici 0,161 g/g smokvi, (0,069 g/g), šljivi (0,417 g/g) i steviji.

Najviše ukupnih šećera sadrži mrkva (0,988 g/g), a najmanje sladić (0,087), što možemo prikazati u padajućem nizu: mrkva > grožđica > šljiva > jabuka > smokva > marelica > batat > stevija > sladić.

5.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija

5.5.1. FRAP metoda

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određeni FRAP metodom prikazani su na slici 34 i izraženi su kao mmol/L Fe(II).

Najveći antioksidacijski kapacitet određen je u infuziji mješavine lista šumske jagode (J1) (4,88 mmol/L FeII), a najmanji u infuziji mješavine lista maline (M3) (1,30±0,03 mmol/L FeII), što je očekivano budući da infuzija lista šumske jagode (4,59 mmol/L FeII) ima veći antioksidacijski kapacitet nego infuzija lista maline (2,14 mmol/L FeII) i lista kupine (3,34 mmol/L FeII). Najmanju vrijednost antioksidacijskog kapaciteta pokazuju infuzije čajnih mješavina lišće maline, a najveću infuzije čajnih mješavina lista jagode. U uzorcima infuzija čajnih mješavina broja 3 i 1 povećana je vrijednost antioksidacijskog kapaciteta, te možemo zaključiti da je to prvenstveno od prisutnosti sladića.

Pokazalo se da je vrlo mala razlika u antioksidacijskom kapacitetu između infuzije lista maline (M) (2,14±0,04 mmol/L FeII) koja sadrži grožđice i korijen sladića i infuzije mješavine lista kupine (K2) (2,36±0,03 mmol/L FeII) koja sadrži list stevije i jabuku, kao i između infuzije mješavine lista kupine (K1) (3,48±0,04 mmol/L FeII) i infuzije mješavine lista šumske jagode (J3) (3,38±0,09 mmol/L Fe^{II}).

Mudnić i suradnici (2008) ispitali su sastav ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijski kapacitet vodenih ekstrakata lišća šumske jagode (*Fragaria vesca*). Sadržaj ukupnih fenola dobivenih ekstrakata određen je kolorimetrijski pomoću Folin-Ciocalteu metode. Mjerenja su obavljena u 3 probe, a rezultati su izraženi kao ekvivalenti GAE/L ($9297,53 \pm 24,57$). Postotak flavonoida izračunat je iz razlike ukupnih fenola i neflavonoida ($7908,27 \pm 106,30$). Antioksidativni kapacitet ekstrakta izmjeren je FRAP metodom. Mjerenja su provedena u 3 probe, a rezultati su izraženi kao mmol/l TE ($43,29 \pm 0,29$).

Katalinić i suradnici (2006) su određivali antioksidacijski kapacitet ekstrakta kupine ($12211 \mu\text{mL Fe(II)/L}$) koji se je pokazao većim od ekstrakta maline ($10025 \mu\text{mL Fe(II)/L}$). U ovom radu određen je antioksidacijski kapacitet u čaju od lista kupine ($3,48 \text{ mmol Fe(II)/L}$) koji se također pokazao većim od antioksidacijskog kapaciteta lista maline ($2,14 \text{ mmol Fe(II)/L}$), te su dobivene vrijednosti u skaldu sa ovim istraživanjem.

5.5.2. ABTS metoda

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog ABTS metodom prikazani su na slici 33 i izraženi su kao mmol/L Troloxa.

Najveći antioksidacijski kapacitet, prema ABTS metodi, određen je u infuziji lista kupine (K) ($3,34 \pm 0,09 \text{ mmol/L Troloxa}$) koja sadrži korijen sladića i mrkvu, a najmanji u infuziji mješavine lista maline (M1) ($0,91 \pm 0,07 \text{ mmol/Troloxa}$) koja sadrži list stevije i marelicu, što predstavlja razliku od 3,67 puta. Sličan antioksidacijski kapacitet određen je između infuzije mješavine lista kupine (K3) ($1,99 \pm 0,16 \text{ mmol/L Troloxa}$) i infuzije mješavine lista šumske jagode (J1) ($1,58 \pm 0,09 \text{ mmol/L Troloxa}$).

Prema dobivenim rezultatima antioksidacijskog kapaciteta primjenom ABTS metode, može se definirati slijedeći opadajući niz: $K > J > M > K1 > K2 > K3 > J1 > J3 > M3 > J2 > M3 > M1$.

Martini i suradnici (2009) odredili su antioksidacijski kapacitet kupine ABTS metodom. Antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista kupine određen je obzirom na Trolox (TEAC vrijednost) a rezultati su pokazali da antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista kupine potječe

većinom od elaginske kiseline koja je prisutna u visokoj koncentraciji i ima povišenu TEAC vrijednost.

5.5.3. DPPH metoda

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određenog DPPH metodom prikazani su na slici 33 i izraženi su kao mmol/L Troloxa.

Najmanji antioksidacijski kapacitet, prema DPPH metodi, određen je u infuziji lista šumske jagode (J) ($0,77 \pm 0,00$ mmol/L Troloxa), a najveći u infuziji lista kupine (K) ($1,33 \pm 0,00$ mmol/L Troloxa) koja sadrži list stevije i sušenu smokvu, što predstavlja razliku od 1,73 puta.

Pokazalo se da je vrlo mala razlika u antioksidacijskoj aktivnosti između infuzije mješavine lista maline (M2) ($0,50 \pm 0,02$ mmol/L Troloxa) i infuzije mješavine lista šumske jagode (J3) ($0,249 \pm 0,01$ mmol/L Troloxa), kao i između infuzije mješavine lista kupine (K2) ($0,72 \pm 0,01$ mmol/L Troloxa) i infuzije mješavine lista šumske jagode (J1) ($1,03 \pm 0,02$ mmol/L Troloxa) koje u svom sastavu sadrže korijen sladića i sušene grožđice.

Prema dobivenim rezultatima antioksidacijskog kapaciteta primjenom DPPH metode, može se definirati slijedeći opadajući niz: $K > J2 > M > J1 > J > K2 > K1 > K3 > M3 > J3 > M3 > M1$,

Venskutonis i suradnici (2006) ispitali su sastav lišća maline i njihov antioksidacijski kapacitet. Listovi maline su ekstrahirani etanolom, a za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta koristile su se ABTS i DPPH metode. Rezultate su prikazali kao postotak inhibicije tj. postotak smanjenja apsorpcije ABTS i DPPH radikala. Dobiveni rezultati potvrđuju da je udio fenola u ekstraktima lista maline u korelaciji sa antioksidacijskim kapacitetom. Koeficijent korelacije između udjela ukupnih fenola i DPPH radikala ($R=0,800$) pokazao se znatno višim nego kod ABTS radikala ($R=0,668$) što je slučaj i za p Tako je primjenom DPPH metode najveći antioksidacijski kapacitet određen u uzorcima (23)

5.5.4. Određivanje citotoksičnog učinka biljnih infuzija na humanu staničnu liniju karcinoma debelog crijeva

Citotoksičnost ekstrakta maline, kupine i šumske jagode određivala se „neutral red“ metodom na staničnoj liniji SW 480 u četiri različite koncentracije ekstrakta koji je na stanice djelovao 1 ili 2 sata, sa i bez oporavka nakon tretmana u trajanju od 24 sata.

Slike 37. prikazuju preživljenje SW 480 staničnih linija nakon 1h i 2h, sa i bez oporavka. U slučaju tretmana 1 h i 2 h bez oporavka, ekstrakt šumske jagode nije pokazao citotoksični učinak. Nakon 24-satnog oporavka, pokazalo se da dolazi do smanjenja preživljenja staničnih linija u ovisnosti o koncentraciji s time da ni najveća koncentracija, u slučaju tretmana nakon 1 h i 2 h, ne izaziva 50%-tno odumiranje stanica.

U slučaju tretmana s oporavkom nakon 1h, citotoksični učinak ekstrakta kupine javlja se pri koncentraciji od 0,75 x (slika 36) te on raste u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta. U slučaju tretmana nakon 2 h citotoksični učinak je slabije izražen te je prva koncentracija (0,5 x) ujedno i najtoksičnija (vjerojatno zbog indukcije detoksificirajućih enzima). Za razliku od ekstrakata kupine i šumske jagode, citotoksični efekt ekstrakta maline uočljiv je u slučaju kada su stanice izložene ekstraktu nakon 1 h i 2 h bez oporavka. Produljenjem vremena tretmana, lagano se povećava i toksični utjecaj ekstrakta lista maline na stanične linije. U slučaju tretmana s oporavkom nakon 1 h tretiranja (slika 35), nije uočen citotoksični učinak, dok nakon 2 h tretiranja u koncentraciji većoj od 0,75 x, dolazi do pojave blagog citotoksičnog učinka.

Količina reaktivnih kisikovih skupina u stanicama određivala se DCFH-DA fluorimetrijskim testom na staničnoj liniji SW 480 u četiri različite koncentracije ekstrakta maline, kupine i šumske jagode koji je na stanice djelovao 1 ili 2 sata. Također, praćen je i učinak ekstrakata na stanice u kojima je prethodno izazvan oksidacijski stres pomoću netoksične koncentracije vodikovog peroksida (250 μ M).

U slučaju maline s oporavkom nakon 1 h, stanice koje su prethodno bile tretirane vodikovim peroksidom pokazuju najmanji antioksidacijski kapacitet pri koncentraciji od 1 x, dok je pri istoj koncentraciji tretiranih stanica nakon 2 h, izmjerena najveći antioksidacijski kapacitet (slika 38). U slučaju maline bez oporavka, najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena je u slučaju netretiranih stanica nakon 1 h u koncentraciji od 1 x, dok je kod stanica tretiranih

vodikovim peroksidom, najveća antioksidacijska aktivnost izmjerena nakon 2 h pri koncentraciji od 0,75 x (slika 39).

Smatra se da je biološka aktivnost polifenola povezana s njihovim antioksidacijskim svojstvima koja su uglavnom posljedica njihove sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i slobodnih kisikovih skupina te stvaranja kompleksa s metalnim ionima, čime se sprječava oksidacija metala s kisikom (Schmalhausen et al., 2007; Sergediene et al., 1999).

Pokazalo se da nakon jednog sata, u stanicama koje su prethodno tretirane ekstraktom maline u koncentracijama od 0,5 x i 0,75 x i vodikovim peroksidom, H_2O_2 uzrokuje značajno povećanje slobodnih kisikovih skupina dok je taj učinak smanjen nakon tretmana stanica s višom koncentracijom ekstrakta. Ovaj je efekt zamijećen kod mnogih spojeva, pa tako primjerice dopamin, u koncentracijama manjim od 500 μM , smanjuje intenzitet fluorescencije iskazujući svoja antioksidativna svojstva, dok pri koncentraciji od 1 mM povećava intenzitet fluorescencije ponašajući se kao prooksidans (Wang and Joseph, 1999).

Ekstrakt kupine nakon 24-satnog oporavka i 1 h tretmana, pokazuje jaku antioksidacijsku aktivnost. U stanicama prethodno tretiranim vodikovim peroksidom ekstrakt kupine pokazuje antioksidacijski kapacitet pri najvećoj koncentraciji (2,5 x). Najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren je u netretiranim stanicama nakon 1 h pri koncentraciji od 0,5 x (slika 40). Za razliku od tih rezultata, nakon 2h tretmana, ekstrakt kupine izaziva peroksidacijski učinak koji se postepeno povećava porastom koncentracije ekstrakta, a uzrok tome vjerojatno leži u činjenici da produljenom inkubacijom dolazi do nastanka metaboličkih produkata koji posjeduju prooksidativno djelovanje.

Stanice tretirane ekstraktom kupine nakon 1 h pokazuju značajno smanjenje razine reaktivnih kisikovih skupina (ROS), a u slučaju stanica prethodno tretiranih vodikovim peroksidom, blago povećanje ROS-a vidljivo je pri najvećoj koncentraciji ekstrakta kupine (2,5 x). Nakon 2 h tretmana, nije vidljiva nikakva promjena u količini slobodnih radikala, osim u stanicama prethodno tretiranim vodikovim peroksidom kao i pri najvećoj koncentraciji ekstrakta kupine (2,5 x), pri čemu dolazi do postepenog rasta ROS-a (slika 41).

Kod stanica tretiranih s ekstraktom jagode i nakon 24-satnog oporavka, nije vidljiv antioksidacijski kapacitet osim što je u stanicama tretiranim najnižom koncentracijom ekstrakta (0,5 x), došlo do blagog porasta reaktivnih kisikovih skupina (slika 42.) Kod stanica

izloženih 2 h, koncentracija 1 x izazvala je nagli porast razine reaktivnih kisikovih skupina, da bi koncentracija 2,5 x uzrokovala njihovo smanjenje.

Kod ne tretiranih stanica i onih tretiranih vodikovim peroksidom nakon 1 h, uočeno je da ekstrakt jagode djeluje kao antioksidans te da izaziva značajno smanjenje reaktivnih kisikovih skupina (slika 43). Nakon 2 h tretmana, antioksidacijski kapacitet više nije zapažen, a najmanja koncentracija ekstrakta (0,5 x) izaziva ROS-ove.

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da se poželjna antioksidacijska svojstva postižu u prvih sat vremena od izlaganja, pa s obzirom na tu činjenicu treba voditi računa o načinu pripreme, trajanju ekstrakcije i vremenu unutar kojeg se konzumira pripravljena infuzija čajnih mješavina.

3.6. Senzorska analiza biljnih infuzija

Budući da su literaturni podaci o senzorskim karakteristikama biljnih čajeva veoma oskudni, cilj ovog ocjenjivanja je bio utvrditi senzorske parametre koji karakteriziraju miris i okus čajeva.

Biljne infuzije čistih biljaka karakteriziraju miris po travi ili sijenu, te gorak ili slatkast okus. Biljne infuzije ovih biljaka imaju kompleksan, ugodan i poželjan miris, pomalo gorak okus, a list šumske jagode posjeduje i adstringentnu komponentu. Svi čajevi posjeduju voćnu notu, infuzija lista maline i kupine ima blag citrusni miris prožet sa tonom crvene jabuke, dok infuzija šumske jagode ima topliji, intenzivniji miris na suho voće, kruške i marelice. Infuzija lista maline i kupine također posjeduju miris na mentu i med, a infuzija lista šumske jagode bazgu, lipu te orašaste plodove. Najblažu aromu ima infuzija lista maline, a najintenzivniju infuzija lista šumske jagode, dok infuzija lista kupine djeluje osvježavajuće zbog prisustva kiselina (slike 45, 46, 47).

Novokreirane formulacije čajnih mješavina bazirane na listu kupine, listu maline i listu šumske jagode potom su ocjenjene 10-bodovnom hedonističkom skalom. Ocjenjivano je 6 svojstava: okus, miris, sveukupna prihvatljivost, poznatost arome, intenzitet slatkoće te intenzitet arome.

Najbolji miris pokazuje uzorak J3, te je općenito prepoznato da mješavine lista jagode posjeduju najbolji miris, dok čajne mješavine maline i kupine imaju podjednako dobro ocijenjen miris. Čajnu mješavinu M1 karakterizira najbolji miris, a M3 najnepoželjniji miris, nadalje čajne mješavine lista maline broja 3 su prepoznate kao lošije u odnosu na M1, M2 odnosno K₁ i K₂ što možemo obrazložiti jednostavnijim sastavom, smanjenim udjelom suhog voća te nedostatkom stevije koja osim slatkoće i zaokružuje aromu čajne mješavine. Hedonistička skala prikazuje da su svi čajevi prihvatljivi te da imaju poznatu aromu uz minorne razlike u broju bodova. Čajne mješavine koje su najintenzivnije slatke imaju najveći broj bodova sveukupno, što ne iznenađuje jer dodatak prirodnih sladila osim što daje osjet slatkoće i znatno pridonosi okusu i mirisu, tako je kao najbolja čajna mješavina prepoznat uzorak M1, iza kojih odmah slijede K1 i J2 (tablica 20).

Zaključno, novokreirane formulacije čajnih mješavina uz dodatak prirodnih sladila imaju kompleksan, ugodan miris, pun, sladak okus bez zaostajanja slatkoće, te zaokruženu aromu, odnosno kombiniranjem tradicionalnog ljekovitog bilja i prirodnih sladila postignut je više nego zadovoljavajući senzorski profil.

6. ZAKLJUČCI

6. Zaključci

Na osnovu velikog broja provedenih analiza definirana su fizikalna svojstva, nutritivni sastav, biološka učinkovitost, biološka aktivnost infuzija lista kupine, šumske jagode i maline čajnih mješavina pripremljenih na osnovu njihovog 50%-tnog udjela pri čemu su dobiveni sljedeći zaključci:

1. Novokreirane čajne mješavine kategoriziraju se kao loše tečuće. Čajne mješavine zbog velike nehomogenosti karakterizira prisustvo velikih količina zraka među česticama koji ne dozvoljava mnogo interakcije između čestica koje bi smjesu činile kohezivnom. Testovi ovisnosti o brzini tečenja i stvaranja kolača pokazali su da čajne mješavine čine relativno problematičan materijal za miješanje i transport u proizvodnom pogonu.
2. Svježe pripremljene infuzije mješavina bile su svjetlije, zelenije i izraženije žute boje u odnosu na iste nakon 24 sata stajanja na sobnoj temperaturi
3. Najveći udjel klorofila određen je u čajnim mješavinama baziranim na listu maline, posebice u čajnim mješavinama koje sadrže značajan udjel stevije. Najviše beta-karotena ima u lista kupine (495.24 $\mu\text{g/g}$), a dodatak suhog voća i posebice mrkve pozitivno utječe na rast udjela ovog pigmenta. Likopen nije detektiran u infuzijama čistih listova maline i kupine, no, dodatak suhog voća, povrća i stevije pozitivno utječe na njegovo povećanje.
4. List šumske jagode sadrži najveću udjel mineralnih tvari: Al (6,05 mg/g), K (8,41 mg/g), Cr (23,6 $\mu\text{g/g}$), Cu (6,82 $\mu\text{g/g}$), Pb (12,4 $\mu\text{g/g}$) i Zn (25,3 $\mu\text{g/g}$), dok je list kupine (K) najbogatiji izvor Mn (233 $\mu\text{g/g}$), Fe (45,6 $\mu\text{g/g}$) i Ni (39,4 $\mu\text{g/g}$), a list maline (M) sadrži najviše Mg (2,07 mg/g).

Zbog kompleksnog sastava novokreirane čajne mješavine predstavljaju izrazito vrijedan izvor mineralnih tvari.

5. Najveći udjeli ukupnih fenola određeni je u infuzijama čistih listova maline (572,73 \pm 38,57 mg GAE/L), kupine (568,18 \pm 45,00 mg GAE/L) i šumske jagode (531,82 \pm 6,43 mg GAE/L). Infuzija lista šumske jagode predstavlja najbogatiji izvor flavan-3-ola (73,57 i 16,47mg/L (+)-katehina) i proantocijanidina (33,24 \pm 0,80 mg CyE/L). Zbog smanjenog udjela listova maline, kupine i šumske jagode u čajnim mješavinama smanjen je i udjel ispitivanih polifenolnih sastojaka.

6. Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u čistim infuzijama lista kupine, maline i šumske jagode kao i u infuzijama mješavina kvantificirani su pojedini flavonoidi i fenolne kiseline. Sve tri čiste infuzije sadrže elaginsku kiselinu, najviše infuzija lista maline (71,90 mg/L), slijedi infuzija lista jagode (30,84 mg/L) te infuzija lista kupine (28, 82 mg/L), smanjenjem udjela bazne biljne komponente u čajnoj mješavini smanjen je i udjel elaginske kiseline. Prisutnost pojedinih polifenolnih spojeva poput ružmarinske kiseline, kalorogenske i kava kiseline rezultat je kompleksnog sastava čajnih mješavina, posebice dodatka suhog voća.
7. Najveći udjel ukupnih šećera sadrži mrkva (0,988 g/g), a najmanji sladić (0,087). Grožđice, suha smokva i šljiva ne sadrže saharozu, za razliku od batata i mrkve. Svi sastojci čajnih mješavina, izuzev baznog biljnog materijala, sadrže fruktozu. Najviše fruktoze detektirano je u suhoj jabuci (0,422 g/g), a najmanje u batatu (0,025g/g). Glukozu sadrže svi uzorci osim sladića, najmanji udjel glukoze ima batat (0,020 mg/L), a najveći šljiva (0,4174 mg/L).
8. Sukladno najvećem udjelu polifenola određenom u čistim baznim infuzijama iste su karakterizirane i najvećim antioksidacijskim kapacitetom, određen primjenom ABTS, FRAP i DPPH metode. Smanjenjem udjela lista kupine, lista maline i lista šumske jagode te povećanjem udjela ostalih sastojaka novokreirane čajne mješavine su karakterizirane jednakim ili neznatno većim antioksidacijskim kapacitetom u odnosu na čiste bazne infuzije, što ukazuje na posebice izraženo antioksidacijsku aktivnost čistog baznog biljnog materijala.
9. Za razliku ekstrakata lista kupine i šumske jagode, ekstrakt lista maline pokazuje značajan citotoksični efek nakon što je stanična linija SW-480 izložena ekstraktu nakon jedan i dva sata bez oporavka. Produljenjem vremena tretmana povećava se citotoksični učinak ekstrakta lista maline.
10. Profil arome infuzije lista kupine karakterizira osvježavajuća nota svježe pokošene trave i miris pekmeza od šljiva. U profilu arome lista maline dominiraju cvijetne arome (šafiran, lazarkinja i jasmin) dok u profilu arome lista jagode posebno je izražena aroma orašastog voća marelice i kruške te lipe i bazge.
11. Novokreirane formulacije čajnih mješavina uz dodatak prirodnih sladila imaju kompleksan, ugodan miris, puni okus uravnotežene slatkoće, bez naknadne pojave slatkoće. Kombinacija tradicionalnog ljekovitog bilja i prirodnih zamjenskih sladila rezultirala je atraktivnim senzorskim profilom.

12. Sve novokreirane čajne mješavine predstavljaju nutritivno visokovrijedne proizvode bogatog sastava bioaktivnih komponenata, izražene biološke aktivnosti, atraktivne su arome te je njihovu konzumaciju potrebno popularizirati među svim generacijama potrošača.

7. LITERATURA

7. Literatura

Abu-hardan, M., Hill, S E. (2010) Handling properties of cereal materials in the presence of moisture and oil, *Powder Technol.* **198**, 16 – 24.

Afri, M., Frimer, A., Cohen, Y. (2004) Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer, *Chem. Phys. Lipids*, **131**, 123-133.

Anonymous 1, <<http://www.teazaanti.com/teas-tisanes/functional-teas.html>>. Pristupljeno 22. travnja.

Anonymous 2, <<http://www.healthalternativesonline.com/images/Stevia.jpg>>. Pristupljeno 22. travnja 2011.

Anonymous 3, <<http://www.scientific-web.com/en/Biology/Plants/Magnoliophyta/images/IpomoeaBatatas1.jpg>>. Pristupljeno 22. travnja 2011.

Anonymous 4, <<http://www.val-znanje.com/images/stories/ljekovitobilje/65-sladic2.jpg>>. Pristupljeno 22. travnja 2011.

Anonymous 5, <http://www.drhauschkabolt.hu/files/site/honapnovenye/Daucus_carota_koehler.jpg>. Pristupljeno 22. travnja 2011.

Anonymous 6, <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/48/Rubus_ideaus_-_raspberry_-_Himbeere.jpg>. Pristupljeno 24. travnja 2011.

Anonymous 7, <http://www.awl.ch/heilpflanzen/rubus_fruticosus/brombeere_2.jpg>. Pristupljeno 24. travnja 2011.

Anonymous 8, <http://www.bh-froe.com/ZC/images/Fragaria-vesca_1.jpg>. Pristupljeno 24. travnja 2011.

Anton, S. D., Martin, C. K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W.T., Geiselman, P., Williamson, D.A. (2010) Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, **55**, 37–43.

Babich, H., Borenfreund, E. (1990) Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology (Review), *ATLA*, **18**, 129-144.

Barros, L., Falcao, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas- Boas, M., I. C. F. R. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus* sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays, *Food Chem.* **111**, 61-66.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, J. I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion, (u objavi)

Bender, D. V. (2008) < <http://www.vitamini.hr/4400.aspx>>. Pristupljeno 26. travnja 2011.

Benković, M., Bauman, I. (2009) Flow characteristics of powdered infant formula. *Journal on Processing and Energy in Agriculture.* **13** (1), 67-70.

Bennett, L. E., Jegasothy, H., Konczak, I., Frank, D., Sudharmarajan, S., Clingeleffer, P.R. (2011) Total polyphenolics and anti-oxidant properties of selected dried fruits and relationships to drying conditions. *J. Func. Foods.* **3**, 115-124.

Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Beuchat, L.R., Golden, D.A. (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* **43**, 132-142.

Blois, M S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199-1200.

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

Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermakova, A., Reblova, Z., Jurček, O., Kolehmainen, E., Verhe, R., Kvasnička, F. (2011) Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. *J. Food Sci.* **29**, 181–189.

Byamukama, E., Gibson, R. W., Aritua, V., Adipala, E. (2004) Within-crop spread of sweet potato virus disease and the population dynamics of its whitefly and aphid vectors, *Crop Prot.* **23**, 109–116.

Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. (2009) Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness, *Pharmacol. Therapeut.* **121**, 41-54.

Chen, Y., Liu, B., Chang, Y. (2009) Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process. *J. Biosci. Bioeng.* **109**, 557-563.

Chuen, L.K., Sin, L.K. (2002). Way of tea (the sublimatic art of oriental tea drinking), Barron's Educational Series, NY, str.116-117.

Chun, O. K., Kim, O. D. (2004) Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums, *Food Res. Int.* **37**, 337-342.

Chew, S. H., Huda, N., Karim, A. A., Fazilah, A. (2011) Effect on fermentation on the composition of Centella asiatica teas, *Am. J. Food Tec.* **6**, 581-593.

Clifford, M. N. and Scalbert, A. (2000), Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sc. Food Agric.* **80**, 1118–1125.

Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O., Puoci, F., Iemma, F., Spizzirri, U. G., Restuccia, D., Picci, N. (2010) Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots, *Food Chem.* **125**, 1058–1063.

Cock, P., Bechert, C.L. (2002) Erythritol. Functionality in noncaloric functional beverages. *Pure Appl. Chem.* **74** (7), 1281-1289.

Corti, A. (1999) *Low-Calorie Sweeteners: Present and Future*, Published by Karger, Switzerland, Basel.

Cuartero, M., et al. Voltammetric behaviour and square-wave voltammetric determination of the potent antioxidant and anticarcinogenic agent ellagic acid in foodstuffs. *Food Chem.* (2011).

Cutler, H.G. (1995) Natural product flavour compounds as potential antimicrobials, insecticides and medicinal. *Agro Food Ind. Hi-tech.* **6**, 19-23.

Di Stefano, R., Cravero, M. C., Gentilini, N. (1989) Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnio*, **25**, 83-89.

Dingell, J. (1995) *Food safety and quality*, DIANE Publishing Company, Washington, USA.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* **97**, 654-660.

Erdogan-Orhan, I., Kartal, M. (2010) Insights into research on phytochemistry and biological activities of *Prunus armeniaca* L. (apricot), *Food Res. Int.*, (u objavi).

Escarpa, A., Gonzalez, M. C. (2001) An overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **31**, 57-139.

Fnimh, A.C. (1996) *Encyclopedia of medicinal plants*, 1.izd., A Dorling Kindersley Book, London.

Gallahera, R. N., Gallaherb, K., Marshalla, A. J., Marshall, A.C. (2006) Mineral analysis of ten types of commercially available tea, *J. Food Comp. Anal.* **19**, S53-S57.

Ghosal, S., Indira, T.N., Bhattacharya, S. (2010) Agglomeration of a novel food powder : Effect of maltodextrin and gum Arabic dispersions on flow behaviour and compacted mass, *J. Food Eng.* **96**, 222 – 228.

- Gökmen, V., Sügüt, I. (2007) Computer-vision based analysis of colour as a tool for food process control. U: Focus on food engineering research and developments, (Pletney, V.N., ured.), Nova Publishers, New York, str. 17-27.
- Grenby, T. H. (1991) Intense sweeteners- for the food industry: an overview, *Trends Food Sci. Technol.* **5**, 2-6.
- Haugaard Sørensen, I., Krag, J., Pisecky, J., Westergaard, V. (1978) Analytical methods for dry milk products, Fourth Edition, A/S niro Atomizer, Copenhagen, Denmark, str. 20 – 21.
- Huang, Y., Sheng, J., Yang, F., Hu, Q. (2007) Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea, *J. Food. Eng.* **78**, 687-692.
- Kara, D. (2009) Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis, *Food Chem.* **114**, 347-354.
- Karathanos, T. V. (1999) Determination of water content of dried fruits by drying kinetics, *J. Food Eng.* **39**, 337-344.
- Kim, Y., Hertzler, S. R., Byrne, H. K., Mattern, C. O. (2008) Raisins are a low to moderate glycemic index food with a correspondingly low insulin index, *Nutr. Res.*, **28**, 304–308.
- King, V. A., Liu, C. F., Liu, Y. (2001) Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low-temperature vacuum dehydration. *Food Res. Int.* **34**, 167-175.
- Koca, I., Karadeniz, B. (2009) Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey, *Sci. Hort.* **121**, 447–450.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, H. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am J. Med.* **113** (9), 71-88.
- Kulier, I. (2001) Što jedemo? (Tablice kemijskog sastava namirnica), Impress, Zagreb, str. 81-82.

Lamble, K. J., Hill, S. J. (1998) Microwave digestion procedures for environmental matrices, *Analyst*, **123**, 103R-133R.

Li Day et al., Seymour et al., Pitts (2008) Incorporation of functional ingredients into foods, *Trends in Food Science & Technology, Pure Appl. Chem.* **74**, 1281–1289.

Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., Rossi, C. (2009) Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **34**, 50-59.

Menrad, K. (2002) Market and marketing of functional food in Europe, *J. Food Eng.* **56**, 181–188.

Mermel, V. (2004) Old paths new directions: the use of functional foods in the treatment of obesity, *Trends Food Sci. Tec.* **15**, 532–540.

Mitchell, H. (2006) *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Muanda, F., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. (2010) Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves, *LWT – Food Sci. Tec.* (2010).

Mudnić, I., Modun, I., Brizić, I., Vuković, J., Generalić, I., Katalinić, V., Bilušić, T., Ljubenkoy, I., Boban, M. (2008) Cardiovascular effects in vitro of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves, *Phytomedicine* **16**, 462–469.

Mullen, W., McGinn, J., Lean, M.E., MacLean, M.R., Gardner, P., Duthie, G.G., Crozier, A., (2002b). Ellagitannins, flavonoids and other phenolic in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5191-5196.

Murakami, H., Yoneyama, T., Nakajima, K., Kobayashi, M. (2001) Correlation between loose density and compactibility of granules prepared by various granulation methods. *Int. J. Pharm.* **216**, 159-164.

Nakatani, N. (1994) Antioxidative and antimicrobial constituents of herb and spices. U: Spices, Herbs and Edible Fungi (Charalambous, G., ured.). Elsevier Science, New York, str. 251-271.

Ough, C. S., Amerine, M. A. (1988) Methods for analysis of musts and wine, 2. izd., John Wiley & Sons, New York.

Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., Scheller, C. (2007) Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **460**, 1-9.

Porter, L. J., Ma, Z., Chan, B. G. (1991) Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, **25**, 223-230.

Prakash, S., Jha, S. K., Datta, N. (2003) Performance evaluation of blanched carrots dried by three different driers, *J. Food Eng.* **62**, 305–313.

P. W. J. M. Boumans, Basic Concepts and Characteristics of ICP-AES, Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy. Part I, Methodology, Instrumentation, and Performance, ed. P. W. J. M. Boumans, Wiley, New York, 1987, ch. 4.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.

Renwick, A. G. (2008) The use of a sweetener substitution method to predict dietary exposures for the intense sweetener rebaudioside A. *Food Chem. Tox.* **46**, 61–69.

Rinzler, C. A. (1999) The New Complete Book of Food: A Nutritional, Medical and Culinary Guide, 2 izd., New York, USA.

Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., Rivas, B., Felipe, F.L., Cordovés, C., Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2009) Food phenolics and lactic acid bacteria, *Int. J. Food Mic.* **132**, 79–90.

Safi, N. E., Cheynier, V., Moutounet, M. (2003) Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties, *J. Food Comp. Anal.* **16**, 535–553.

Shadidi, F., Naczk, M. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food, *J. Chromatog. A.* **1054**, 95–111.

Shafner, W., Hafelfinger, B., Ernst, B. (2004) Ljekovito bilje Kompendij, 1. izd. (preveli Maršanić-Jovanović, R., Jovanović, M.) Leo-Commerce d.o.o., Rijeka.

Sherman, C. (2003) *The Best of All Worlds - A Complete Culinary Guide to Feeling Great, Staying Young and Saving the Earth*, Lincoln, NE, USA.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144–158.

Solis, H. M., Santoyo, M. C., Martinez, P. G., Galindo, S. S., Sanchez, J. A. (2007) Discrimination of eight varieties of apricot (*Prunus armeniaca*) by electronic nose, LLE and SPME using GC–MS and multivariate analysis, *Sensors Actuat. B.* **125**, 415–421.

Soria, A. C., Sanz, M. L., Villamiel, M. (2008) Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC–MS, *Food Chem.* **114**, 758–762.

Sousa, R., Baccan, N., Cadore, S. (2010) Determination of elemental content in solid sweeteners by slurry sampling and ICP OES. *Food Chem.* **124**, 1264–1267.

Teow, C., Truong, V. D., McFeeters, R., Thompson, R., Pecota, K., Yencho, G. (2007) Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem.* **103**, 829–838.

United States Department of Agriculture (2011) Food composition.

<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Pristupljeno 28. travnja 2011.

United States Department of Agriculture (2011) USDA Natural Conservation Centre. Plants Database. <<http://plants.usda.gov/index.html>>. Pristupljeno 25. travnja 2011.

Veberić, R., Colarić, M., Stampar, F. (2008) Phenolic Acids and Flavanoids of Fig fruit (*Ficus carica* L.) in the Mediterranean region. *Food Chem.* **1**, 153-157.

Venskutonis, P. R., Dvaranauskaite, A., Labokas, J. (2006) Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania, *Fitoterapia* **78**, 162–165.

Wang, H., Provan, G. J., Helliwel, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chem.* **87**, 307-311.

Wang, H., Joseph, J. A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 612-616.

Wang, S. Y., Lin, H. S. (2000) Antioxidant activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 140-146.

Williamson, G., Carughi A. (2010) Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutr. Res.*, **30**, 511-519.

Wittschier, N., Falle, G., Hensel, A. (2009) Aqueous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa, *J. Ethn.* **125**, 218–223.

Wyk, B. E., Wink, M. (2004) Medicinal plants of the world, Timber Press, Portland, Oregon, USA.

Yen, Y. H., Shih, C. H., Chang, C. H. (2007) Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot, *Food Chem.* **107**, 265–272.

Zafrilla, P., Federico, F., Tomas-Barberan, F. A. (2001) Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3651-3655.

Zhang, Y., Li, P., Cheng L. (2010) Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh., *Food Chem.* **123**, 1013-1018.

Zygler, A., Wasik, A., Namies'nik, J. (2009) Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, *Trends An. Chem.* **28**, (9).

