

Sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) u različitim razvojnim stadijima

Dujmović, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:606780>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Mia Dujmović

SADRŽAJ FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKI
KAPACITET PEKINŠKOG KUPUSA (*Brassica rapa* L.
subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) U RAZLIČITIM RAZVOJNIM
STADIJIMA

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za fitokemiju pri Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Šola i neposrednim vodstvom dr. sc. Valerije Vujčić Bok, te je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Ovim putem želim se zahvaliti svima koji su mi bili podrška tijekom studiranja i koji su pridonijeli nastanku ovog diplomskog rada.

Prvenstveno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac uz čiju sam pomoć, savjete i podršku upisala Eksperimentalnu biologiju modul Botanika, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Najveće hvala mentorici doc. dr. sc. Ivani Šola, što mi je izašla u susret u trenutku kada sam bila u teškoj i nepovoljnoj situaciji glede studiranja. Iznimno sam joj zahvalna za sav uloženi trud, nesebičnu pomoć, predan rad, savjete i stručno mentorstvo tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Posebnu zahvalu upućujem asistentici dr. sc. Valeriji Vujčić Bok za stručno vodstvo, podršku, savjete, svu pruženu pomoć i strpljenje tijekom laboratorijskog rada.

Zahvaljujem i tehničarkama Darinki, Svjetlani i Barbari što su zalijevale moje biljčice kada ja nisam stizala, te 'informatičaru' Želji Staniću na tehničkoj podršci.

Naposljetku najveću zahvalu upućujem svojoj obitelji; majci Mirjani, ocu Davorinu i bratu Luki koji su mi neizmjerne podrške i uvijek su uz mene, te posebnu zahvalu svom najvećem osloncu, najboljem dečku na svijetu, dugogodišnjem partneru Juraju koji je zajedno sa mnom pretrpio sav stres i neprospavane noći tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

SADRŽAJ FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET PEKINŠKOG KUPUSA (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) U RAZLIČITIM RAZVOJNIM STADIJIMA

Mia Dujmović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sadržaj fenolnih spojeva, kao i njihov antioksidacijski kapacitet, ovise o razvojnom stadiju biljke. Do sada su u dostupnoj literaturi informacije o sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) zabilježene za odrasle biljke, no ne postoje usporedni podaci o kvalitativnom i kvantitativnom sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu različitih razvojnih stadija ove vrste. Stoga je u ovom radu ispitano pet različitih razvojnih stadija pekinškog kupusa; prvi stadij su činile mlade biljke s otvorenim kotiledonama, drugom stadiju pripadale su biljke s razvijenim dvjema kotiledonama i dva prava lista, trećem biljke s četiri lista, a biljke četvrtog i petog stadija imale su po šest, odnosno deset razvijenih listova. Spektrofotometrijski je određen sadržaj ukupnih fenola, flavonola i hidrokscimetnih kiselina, metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja su identificirani i kvantificirani najzastupljeniji pojedinačni flavonoidi i fenolne kiseline, te je određen antioksidacijski kapacitet pet razvojnih stadija pekinškog kupusa metodama koje se temelje na redukciji radikala 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) i 2,2-difenil-pikrilhidrazila, te metodom određivanja antioksidacijske jakosti redukcijom željeza. Rezultati su pokazali da se najraniji stadij (samo kotiledone) pekinškog kupusa na razini količine ukupnih fenola, flavonola, hidrokscimetnih kiselina i kvercetina, kao i antioksidacijskog kapaciteta statistički ne razlikuje ($p \leq 0.05$) od stadija sa šest ili deset listova. Ova tri stadija ujedno imaju i značajno veće vrijednosti spomenutih parametara u odnosu na stadij s kotiledonima i dva prava lista ili stadij s četiri lista.

(50 stranica, 21 slika, 3 tablice, 82 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: ferulična kiselina, izoramnetin, kempferol, kvercetin, sinapinska kiselina
Voditelj: Dr. sc. Ivana Šola, doc.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Valerija Vujčić Bok

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivana Šola, doc.; Dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.; Dr. sc. Ivana Buj, doc.;

Zamjena: izv. prof. Dr. sc. Ines Radanović

Rad prihvaćen: 19. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF CHINESE CABBAGE (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES

Mia Dujmović
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Phenolic compounds content so as their antioxidant capacity depend on plant development stage. In the present literature, informations on the phenolic compounds content and antioxidant capacity of Chinese cabbage have been reported for mature plants, but there are no comparative data on the qualitative and quantitative phenolic compounds content and antioxidant capacity of Chinese cabbage different development stages. Therefore, in this study, five different development stages of Chinese cabbage were investigated; the first stage consisted of plants with developed cotyledones, the second stage were plants with developed two cotyledones and two leaves, the third stage consisted of plants with four leaves, and the plants of the fourth and fifth stages had six or ten developed leaves. Content of total phenols, flavonols and hydroxycinnamic acids was measured spectrophotometrically, most abundant individual flavonoids and phenolic acids were identified and quantified using High-Performance Liquid Chromatography method, and antioxidant activity of five different stages of Chinese cabbage were determined using methods based on a reduction of radicals 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, and Ferric reducing/Antioxidant power method. The results showed that the earliest stage (containing cotyledones only) of Chinese cabbage, at the level of total phenols, flavonols, hydroxycinnamic acids and quercetin as well as antioxidant capacity does not statistically differ ($p \leq 0.05$) from the stages with six or ten leaves. These three stages also have significantly higher values of the mentioned parameters compared to the stage with the cotyledons and two leaves or the stage with four leaves.

(50 pages, 21 figures, 3 tables, 82 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: ferulic acid, isorhamnetin, kaempferol, quercetin, sinapic acid

Main supervisor: Ivana Šola, PhD, Assist. Prof.

Assistant supervisor: Valerija Vujčić Bok, PhD

Reviewers: Ivana Šola, PhD, Assist. Prof, Sofia Ana Blažević, PhD, Assist. Prof.; Ivana Buj, PhD, Assist. Prof.; Backup Reviewer Ines Radanović, PhD, Assoc. Prof.

Thesis accepted: September 19th, 2018

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Porodica Brassicaceae i rod <i>Brassica</i>	1
1.1.1. <i>Brassica rapa</i> L. subsp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt - pekinški kupus.....	2
1.2. Rast i razvoj biljaka.....	4
1.3. Specijalizirani metaboliti.....	5
1.3.1. Fenolni spojevi.....	5
1.3.1.1. Flavonoidi.....	9
1.3.1.2. Fenolne kiseline.....	13
1.4. Antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva.....	14
2. CILJ RADA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijali	17
3.2. Metode	19
3.2.1. Priprema ekstrakata.....	19
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola.....	20
3.2.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola.....	21
3.2.4. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja.....	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS.....	24
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH.....	25
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP.....	26
3.2.8. Statistička obrada podataka.....	27
4. REZULTATI	28
4.1. Ukupni fenoli.....	28
4.2. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli.....	29
4.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja.....	31
4.4. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS.....	36
4.5. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH.....	37
4.6. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP.....	38
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČAK	43
7. LITERATURA	44
8. ŽIVOTOPIS	50

1. UVOD

1.1. Porodica Brassicaceae i rod *Brassica*

Krstašice ili kupusnjače (Brassicaceae) su velika i ekonomski značajna biljna porodica raširena po svim naseljenim kontinentima, a najviše u gusto naseljenim područjima Europe i Sjeverne Amerike (Jurišić i sur. 2017). Porodica je, dakle, kozmopolitski rasprostranjena, a prema Warwick i sur. (2006) uključuje 338 rodova te 3709 vrsta. Među njima su i vrste od znanstvenog značaja poput onih unutar rodova *Arabidopsis* i *Brassica*, koje se često koriste kao modelni organizmi u istraživanjima (Koch i Mummenhoff 2006). Predstavnici ove porodice su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje (Taiyan i sur. 2001); zeljaste, grmolike i drvenaste biljke, a brojne se uzgajaju u poljoprivredi. Od kultiviranih biljaka uglavnom su to povrtne kulture, ali ima i ratarskih, ljekovitih, začinskih i ukrasnih biljaka (Parađiković 2009). Biljke se odlikuju velikom raznolikošću u morfologiji vegetativnih dijelova i velikom sličnosti reproduktivnih organa (Jurišić 2015). Za cijelu porodicu je karakteristična ljutina koja dolazi od glukozinolata, a novija istraživanja upućuju na mogućnost prevencije raka i degenerativnih bolesti konzumacijom određenih krstašica, zahvaljujući glukozinolatima i fenolnim spojevima (Van Poppel i sur. 1999, Velasco i sur. 2011, Abdull Razis i Mohd Noor 2013, Dos Reis 2015, Royston i Tollefsbol 2015).

Većina vrsta iz roda *Brassica* potječe iz Sredozemlja, Kine i Japana. Vrste su dvogodišnje, rjeđe jednogodišnje zeljaste biljke, vjerojatno nastale mutacijama, prilagodbama ekološkim uvjetima i djelovanjem čovjeka (Parađiković 2009). Rod obuhvaća oko 40 vrsta, među kojima su najznačajnije povrtne vrste i uljarice. U Kini je ljudskom selekcijom i uzgojem proizveden najveći broj kultivara (Taiyan i sur. 2001).

Zajedničke osobine roda *Brassica* su debeli, mesnati i krupni listovi, koji su u početku vegetacije prekriveni voštanom prevlakom i formiraju rozetu. U generativnoj fazi se pojavljuje razgranata cvjetna stabljika koja na vrhovima grana nosi grozdaste cvatove. Cvjetovi su žuti, sastoje se od 4 lapa, 4 latice, 6 prašnika (4 duža, 2 kraća) i plodnice s tučkom. Plod je komuška koja sadrži sitno, okruglo, sivosmeđe sjeme koje se u vrstama i varijetetima morfološki ne razlikuje. U jednom gramu sadržano je 220 – 350 sjemenki (Parađiković 2009).

Ove vrste su široko rasprostranjene u uzgoju zbog dobre adaptacije na različite agroklimatske uvjete. Uzgajaju se kao povrće, začini, za dobivanje ulja, a značajan su izvor dijetalnih vlakana, vitamina C i protutumorskih spojeva. U svijetu je šest najčešće kultiviranih vrsta ovog roda; *B. rapa*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. napus* i *B. carinata* (Park i sur. 2005), a u čovjekovoj prehrani najveći značaj ima kupus (Jurišić 2015). Kod nas se iz roda *Brassica*, kao povrće, uzgajaju sljedeće kulture: *Brassica oleracea* var. *capitata* – kupus,

Brassica oleracea var. *sabauda* – kelj, *Brassica oleracea* var. *gemmifera* – kelj pupčar, *Brassica oleracea* var. *acephala* – raštika, *Brassica oleracea* var. *gongylodes* – korabica, *Brassica oleracea* var. *botrytis* – cvjetača, *Brassica oleracea* var. *italica* – brokula, *Brassica rapa* var. *pekinensis* – pekinški kupus, *Brassica rapa* var. *chinensis* – kineska raštika, *Brassica rapa* var. *rapifera* – postrna repa, *Brassica napus* var. *napobrassica* – podzemna koraba (Paradićević 2009). *Brassica rapa* L. obuhvaća jednogodišnje ili dvogodišnje podvrste, visoke 30-120 cm (Taiyan i sur. 2001).

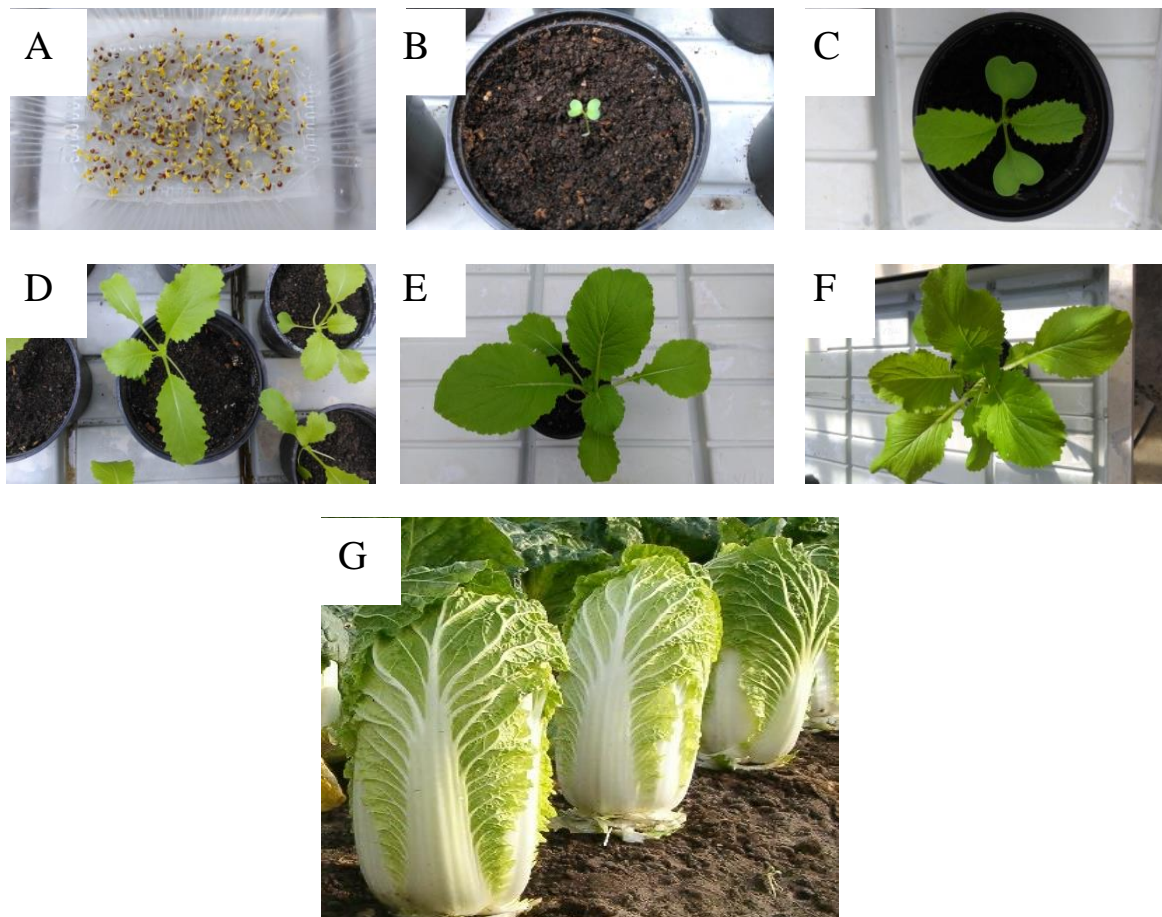
1.1.1. *Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt - pekinški kupus

Pekinški kupus (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) porijeklom je iz Kine, gdje se kultivira od 5. stoljeća, te je do danas ostao jedno od najpopularnijih povrća Azije (Lešić i sur. 2002). Usjevi pekinškog kupusa najrašireniji su u sjeveroistočnoj Aziji, posebice u Kini, Japanu i Koreji, gdje je ta vrsta i jedna od najčešće uzgajanih povrtnih kultura (Park i sur. 2005). U Europu su ga donijeli misionari u 19. stoljeću. Isprva se koristilo originalno ime pe-tsai, što na mandarinskom kineskom jeziku znači bijelo povrće. Nastao je spontanim križanjem postrne repe (*Brassica rapa* ssp. *rapifera*) i kineske raštike (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) (Lešić i sur. 2002). Danas se široko kultivira, te se često koristi u znanstvenim istraživanjima (Wang i sur. 2011).

Pekinški kupus ima tanak, žiličast i plitki korijen, a cijela biljka je visoka oko 30 cm. Ovalni listovi imaju izraženo središnje rebro bijele boje (Sl. 1). Postoje stotine različitih varijeteta različitih oblika, od kompaktnih okruglih, do izduženih cilindričnih. U Europi se najviše uzgajaju tipovi koji stvaraju glavicu ovalnog ili cilindričnog, izduženog oblika svijetlozelene do tamnozeleno boje (Lešić i sur. 2002).

Pekinški kupus je jednogodišnja, brzorastuća biljka s kratkom vegetacijom. Iako većina varijeteta uspijeva u hladnijim predjelima, mogu se uzgajati i u toplijim područjima, poput Australije. Pri temperaturama višim od 25 °C odgađa se glavičenje i smanjuje kakvoća, pa nastaju rahle glavice i razvija se rubna palež lišća. Optimalne temperature za vegetativni rast su između 12 i 22 °C, dok je za formiranje glavice potreba temperatura između 16 i 20 °C. Veći intenzitet svjetla pospješuje razvoj šireg lišća i ranije glavičenje. Pri nižem intenzitetu svjetla listovi su uži, što smanjuje prinos. Zbog brzog rasta i velike mase listova kineski kupus traži mnogo vode, pa je potrebno redovito zalijevanje. Bere se i konzumira u vrijeme

tehnološke zrelosti, prije nego što počne prorastati, kada postigne potrebnu veličinu i kompaktnost glavice mase od 1 – 2 kg (Lešić i sur. 2002, Jurišić 2015).



Slika 1. Razvojni stadiji pekinškog kupusa (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). (A-F – vlastite fotografije, G - izvor: <http://www.holmesseed.com/chinese-cabbage/>)

U ljudskoj prehrani se koristi zbog niske kalorijske vrijednosti i spojeva koje sadrži (bjelančevine, vitamini, minerali, dijetalna vlakana, glukozinolati i fenolni spojevi) (Cartea i sur. 2011). Bogat je vitaminom C i mineralima poput kalija, kalcija, magnezija i cinka. Boja unutarnjih listova ovisi o sastavu karotenoida, a mogu biti bijeli, žuti ili narančasti. Žuta boja unutarnjih listova dolazi od luteina i β -karotena, koji su ujedno i dominantni karotenoidi pekinškog kupusa. Žuti listovi imaju veću nutritivnu vrijednost od bijelih, zbog čega se u Aziji preferiraju žuti kultivari. Karotenoidi imaju značajnu nutritivnu vrijednost jer su izvori vitamina A, a putem antioksidacijske aktivnosti smanjuju rizik od raka i kardiovaskularnih bolesti (Jung i sur. 2014). U pekinškom kupusu prisutni su i glukozinolati koji imaju ulogu u smanjenju rizika od degenerativnih bolesti kao što su rak, kardiovaskularne i

neurodegenerativne bolesti (Björkman i sur. 2011) a kao i ostale vrste iz roda *Brassica* bogat je fenolnim spojevima (Cartea i sur. 2011, Seong i sur. 2016).

Pekinški kupus ima blagi, slatkasti okus koji se dosta razlikuje od gorkastog europskog kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Dok zeleni listovi mogu biti malo papreni, debele bijele peteljke su slatke i sočne. Unutarnji listovi su zaštićeni od sunca, pa su naročito blagog okusa i sočni. U Aziji se tradicionalno koristi u kulinarstvu, ali i kod nas je sve češće u upotrebi. Mogućnosti uporabe su široke zahvaljujući blagom slatkastom okusu i hrskavoj teksturi. Može se konzumirati sirov, u sendvičima ili salatama, ili termički obrađen u juhama, gulašima, rolama, složencima, pržen, u kombinaciji s mesom ili ribom, kao prilog, a lisna rebra se mogu pohati. Ipak se najčešće priprema svjež kao salata, s različitim začinima (Lešić i sur. 2002, Jurišić 2015).

1. 2. Rast i razvoj biljaka

Biljka svoj razvoj započinje kao sjemenka. U sjemenci su sadržani svi dijelovi potrebni za razvoj korijena, izdanka i kotiledona biljke. Kada nastupe povoljni uvjeti sjeme klija i razvija se klijanac. Kod dvosupnica hipokotilna kuka izbija iz tla, kotiledone se razdvajaju te se dalje iz epikotila razvijaju listovi. Slijedi rast i razvoj biljke koji je pod utjecajem okolišnih i biljnih endogenih čimbenika. Rast je ireverzibilno povećanje obujma stanice, organa ili cijele biljke. Tijekom svog rasta i razvoja biljka prolazi kroz mnoge razvojne faze; razvoj vegetativnih organa (listova, stabljike i korijena) i generativnih organa (formiranje pupova, cvjetova, plodova) (Leopold 1964). Pekinški kupus se konzumira u vegetativnoj fazi te su u literaturi većinom dostupni podaci o sadržaju fitokemikalija odraslih vrsta roda *Brassica* (Ramos dos Reis i sur. 2015). No u ljudskoj su upotrebi sve češće mlade biljke i biljne klice za koje je također dokazan bogat sadržaj fitokemikalija, pa posljedično i povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Beans i sur. (2012) su istraživanjem klijanaca devet vrsta porodice Brassicaceae ustanovili visok sadržaj glukozinolata, ukupnih fenola i visoku antioksidacijsku aktivnost kod brokule, korabe i crvenog kupusa, a Rochfort i sur. (2006) predlažu nezrele mlade listove kineske raštike kao dobar izvor kempferola i izoramnetina. Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni, a njihova zastupljenost ovisi o vrsti, organu i razvojnom stadiju biljke te okolišnim uvjetima (Björkman i sur. 2011, Petrusa i sur. 2013).

1.3. Specijalizirani metaboliti

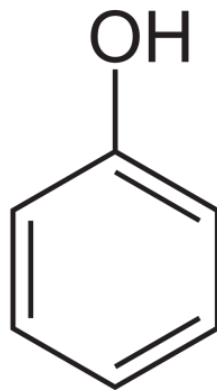
Metabolizam ili izmjena tvari je skup kemijskih reakcija koje se odvijaju u živom organizmu kako bi održale sve stanice i organizam na životu. Ti procesi omogućuju organizmu da raste, da se razmnožava, održava svoju strukturu i reagira na okolinu (Vukobratović 2009). Primarni biljni metaboliti (ugljikohidrati, aminokiseline, masne kiseline, nukleinske kiseline) su nužni za život biljke. To su funkcionalne tvari zajedničke svim organizmima koje sudjeluju u procesima fotosinteze, disanja, primanja hranjivih tvari, prijenosa otopljenih tvari, asimilacije i diferencijacije (Verpoorte 2000).

Biljke proizvode brojne organske spojeve koji nemaju neposrednu ulogu u primarnom metabolizmu, a nazivaju se specijaliziranim (sekundarnim) metabolitima. Za razliku od primarnih, specijalizirani produkti nemaju ulogu u navedenim procesima, ali su važni za prilagodbu biljaka na okolišne uvjete (Bourgaud 2001). Često su karakteristični za samo jednu biljnu vrstu ili taksonomski srodne vrste. Procijenjeno je da postoji između 100000 i 200000 različitih specijaliziranih metabolita (Pereira i sur. 2009). Imaju važnu ekološku ulogu u biljkama jer ih štite od herbivora (otrovni za herbivore, ili ih svojim mirisom i okusom odvrćaju), štetočina i patogena (Bennett i Wallsgrove 1994). Također služe za primamljivanje oprašivača i životinja koje rasprostranjuju sjemenke, te kao tvari koje posreduju u kompeticiji biljka-biljka. Tijekom evolucije ove su tvari bile vrlo značajne za biljke, a mnoge se koriste u proizvodnji lijekova, polimera, boja, vlakna, ljepila, ulja, voskova i mirisa (Verpoorte 2000, Bourgaud 2001, Akula i Ravishankar 2011). Temeljem načina biosinteze specijalizirani (sekundarni) metaboliti mogu se podijeliti u tri skupine: terpene, fenolne spojeve i spojeve koji sadrže dušik (Pevalek-Kozlina 2003).

1.3.1. Fenolni spojevi

Iako su fenolni spojevi prisutni i u biljkama i životinjama, većina ih je biljnog podrijetla (Van Sumere 1989). Fenolni spojevi su specijalizirani sekundarni metaboliti prisutni u svim biljkama (Lattanzio 2013) koji imaju zaštitnu ulogu kako u biljaka tako i u čovjeka koji ih u svoj organizam unosi hranom i pićem biljnog porijekla. Najvažnija su grupa specijaliziranih biljnih metabolita koncentrirani u sjemenkama, listovima, cvjetovima, kori drveća, pokožici i mezokarpu voća i povrća, žitaricama, začinskom i aromatskom bilju (Alok i sur. 2014). Biološki učinci ovih spojeva najčešće se objašnjavaju njihovim snažnim antioksidacijskim

svojevremena (Seong i sur. 2016). Antioksidansi u biljkama sprečavaju oksidativni stres, a njihova konzumacija ima povoljan učinak na ljudsko zdravlje (usporavaju starenje, snižavaju razinu kolesterola, smanjuju rizik od nastanka raka, štite srce i krvne žile) (Soory 2009, Alok i sur. 2014). Do danas je poznato preko 8000 različitih struktura fenolnih spojeva (Nićiforović i Abramović). Osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Sl. 2), a prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijelimo ih na: flavonoide i neflavonoide (fenolne kiseline i srodni spojevi) (Cartea i sur. 2011). Fenolni spojevi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten, a strukturno su građeni u rasponu od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva (Bravo 1998). Na temelju osnovnog kostura (broj C-atoma) kategorizirani su u nekoliko skupina: C6 – jednostavni fenoli i benzokinoni (npr. katehol i hidrokino), C6-C1 – fenolne kiseline (npr. galna i salicilna kiselina), C6-C2 – acetofenoni i feniloctena kiselina, C6-C3 – hidroksicimetne kiseline (derivati cimetine kiseline), fenilpropani, kumarini, izokumarini, kromoni (npr. kavina i ferulinska kiselina, umbeliferon), C6-C4 – naftokinoni (npr. juglon), C6-C1-C6 – ksantoni, C6-C2-C6 – stilbeni, antrakinoni (npr. resveratrol), C6-C3-C6 – halkoni, flavonoidi, izoflavonoidi, neoflavonoidi (npr. kvercetin, cijanidin, genistein), (C6-C3)₂ – lignani i neolignani, (C6-C3-C6)₂ – biflavonoidi, (C6-C3)_n – lignini, (C6)_n – kateholski melanini, (C6-C3-C6)_n – kondenzirani tanini (Tablica 1) (Harborne 1989 i Reis Giada 2013).



Slika 2. Osnovna kemijska struktura fenolnih spojeva. (izvor: https://www.researchgate.net/figure/Typical-structure-of-a-resole-phenol-formaldehyde-resin-reproduced-from-Gogotov-et-al_fig2_306077598)

Tablica 1. Podjela fenolnih spojeva prema broju ugljikovih atoma, prema Harborne (1989) i Reis Giada (2013).

Broj ugljikovih atoma	Osnovni ugljikov kostur	Skupina fenolnih spojeva
6	C ₆	Jednostavni fenoli i benzokinoni
7	C ₆ -C ₁	Fenolne kiseline
8	C ₆ -C ₂	Acetofenoni i feniloctene kiseline
9	C ₆ -C ₃	Hidroksicimetne kiseline, fenilpropani i kumarini
10	C ₆ -C ₄	Naftokinoni
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantoni
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbeni i antrakinoni
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignani i neolignani
n	(C ₆ -C ₃) _n	Lignini

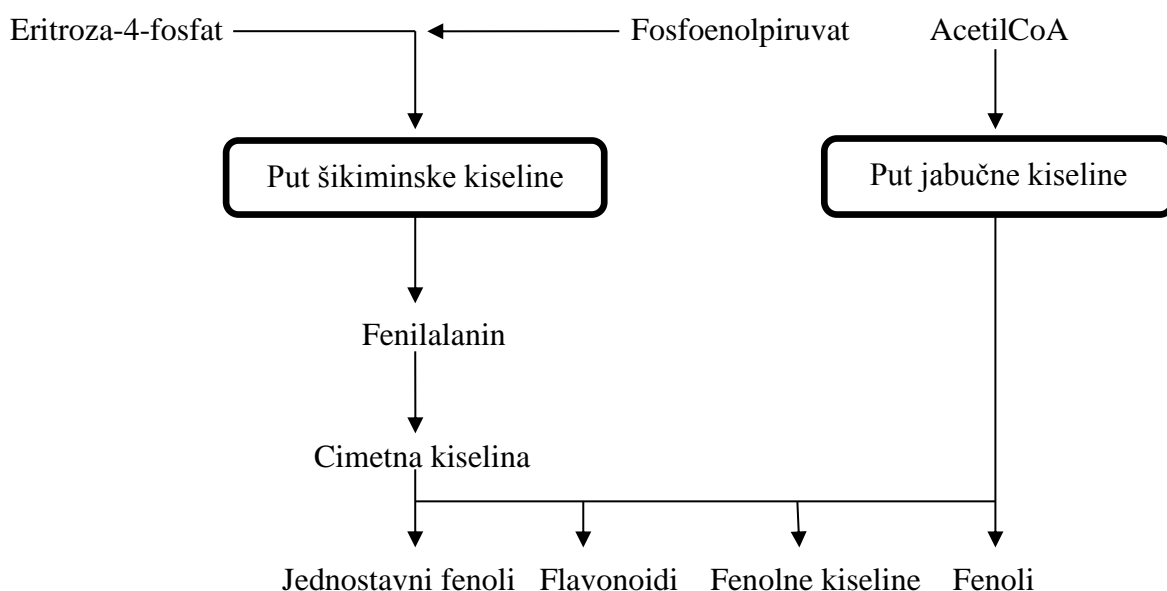
Fenolni spojevi imaju izraženu antioksidacijsku i aktivnost smanjivanja količine slobodnih radikala (Agati 2012). Zaštitna uloga fenolnih spojeva u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ('hvatanja') elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih metala (Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ i Mg²⁺), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza. Zato se fenolnim spojevima i pripisuju mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antivirusno i antikancerogeno, a značajno utječu i na boju i okus hrane (Ayaz i sur. 2008, Falcone Ferreyra i sur. 2012).

Fenolne spojeve često nalazimo otopljene u vakuoli u obliku glikozida ili estera. Kada su u čistom obliku jednostavni fenoli su bezbojni, ali lako oksidiraju, pa prilikom izloženosti zraku potamne i poprime smečkastu boju (Van Sumere 1989). Biljni fenoli su heterogena skupina spojeva, od kojih su neki topivi samo u organskim otapalima, neki u vodi, a neki su veliki netopivi polimeri (Pevalek-Kozlina 2003). Topivi su u polarnim organskim otapalima, osim ako nisu potpuno esterificirani, eterificirani ili glikozilirani. Topivost u vodi se povećava s brojem hidroksilnih grupa. U alkalnoj sredini njihova oksidacija je pojačana, pa se tretmani s alkalnim otapalima trebaju izbjegavati. Većina fenolnih glikozida je topiva u vodi, ali odgovarajući aglikoni su slabije topivi. Fenolni spojevi koji imaju samo par hidroksilnih grupa topivi su u eteru, kloroformu, etilacetatu, metanolu i etanolu, a fenoli s jednim ili više alifatskim postranim lancem topiviji su u manje polarnim otapalima. Fenolne tvari su aromatske, zbog čega intenzivno apsorbiraju unutar UV spektra (Van Sumere 1989).

Mnogi fenolni spojevi imaju ulogu u obrani od herbivornih organizama, dok drugi sudjeluju u mehaničkoj potpori, privlačenju oprašivača i rasprostranjivača plodova, redukciji

rasta susjednih biljaka, te općenito zaštititi od abiotički i biotički stresnih utjecaja (Cheynier 2013). Neki fenoli pokazuju alelopatsku aktivnost, reducirajući rast susjednih biljaka što im omogućava bolju izloženost svjetlosti, te veću dostupnost vode i mineralnih tvari. Kavena i ferulična kiselina u laboratorijskim uvjetima inhibiraju klijanje i rast mnogih biljaka (Pevalek-Kozlina 2003).

Fenolni se spojevi mogu sintetizirati na različite načine. Dva najvažnija puta biosinteze uključuju put šikiminske kiseline (Bennett i Wallsgrove 1994) i put jabučne kiseline (Sl. 3). Put šikiminske kiseline sudjeluje u biosintezi većine fenola, dok put jabučne kiseline nema veliki značaj u sintezi biljnih fenola, ali ima kod bakterija i gljiva. Put šikiminske kiseline počinje od jednostavnog ugljikohidrata i nastavlja se do aromatskih aminokiselina. Jedan od međuspojeva je šikiminska kiselina, po kojoj je put nazvan. Većina fenolnih tvari nastaje iz fenilalanina i tirozina, a ključni korak tih sinteza je transformacija fenilalanina u cimetnu kiselinu eliminiranjem jedne molekule amonijaka. Tu reakciju katalizira enzim fenilalanin-amonij-lijaza (PAL) čija je aktivnost pod kontrolom mnogih okolišnih i unutarnjih čimbenika (regulatora rasta, opskrbe hranivima, svjetlosti, gljivične infekcije i ranjavanja). Produkt PAL-a je *trans*-cimetna kiselina (Dixon i Paiva 1995, Pevalek-Kozlina 2003, Cartea 2011, Falcone Ferreyra i sur. 2012).

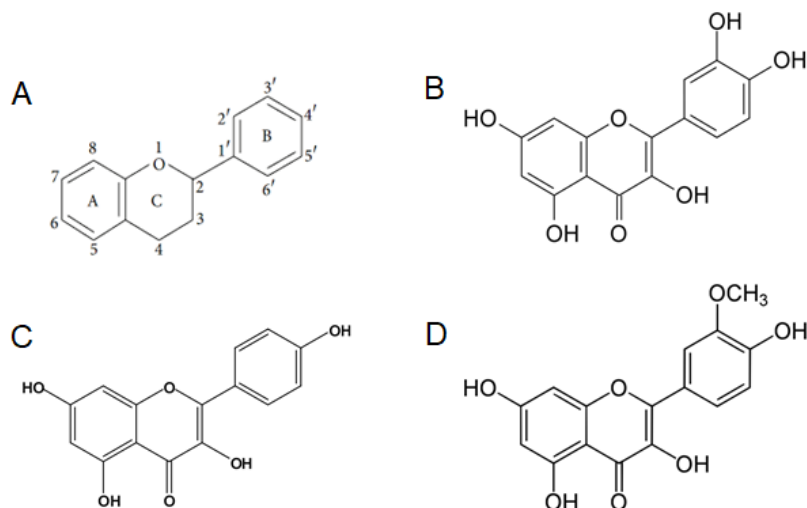


Slika 3. Biosintetski putevi fenolnih spojeva (preuzeto i prilagođeno iz izvora Pevalek-Kozlina, 2003).

Fenolni sastav podvrsta i varijeteta vrste *B. rapa* slabije je istražen od podvrsta i varijeteta vrste *B. oleracea* no mogu se smatrati dobrim izvorom polifenola. Glavni identificirani polifenoli su acilirani mono-, di-, tri- i tetraglukozidi kvercetina, kempferola i izoramnetina te esteri hidroksicimetnih kiselina s glikozidima, jabučnom i kiničnom kiselinom (Cartea 2011). Osnovna razlika između podvrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je prisutnost derivata izoramnetina kod podvrsta *B. rapa*, koji je uvijek odsutan kod *B. oleracea* podvrsta (Romani 2006). U dostupnoj literaturi je do sada zabilježena samo količina ukupnih fenola pekinškog kupusa u stadiju s razvijenim kotiledonama (Šamec i sur. 2018) i odrasloj biljci (Seong i sur. 2015), no nisu zabilježeni usporedni podaci o fenolnom sastavu i antioksidacijskom kapacitetu mlade biljke i njenih različitih razvojnih stadija, koji bi upućivali može li se ova vrsta u tim ranijim stadijima također smatrati dobrim izvorom fenolnih spojeva.

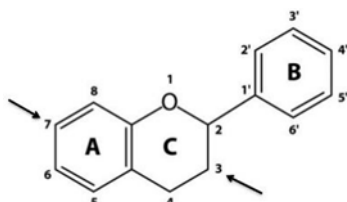
1.3.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su jedna od najvećih i najznačajnijih skupina biljnih fenolnih spojeva, koncentrirani pretežito u sjemenkama, koži voća, kori drveća, listovima i cvjetovima. Značajan su potporni materijal biljnih stanica u kojima u obliku lignina i suberina grade staničnu stijenku i doprinose mehaničkoj potpori. Neki flavonoidi, poput antocijana, zajedno s flavonima i flavanolima doprinose boji cvjetova i plodova, što je važno za privlačenje životinja za oprašivanje i raznošenje sjemena (Von Elbe i Schwartz 1996, Davies 2000). Do danas je identificirano preko 6000 različitih flavonoida (Falcone Ferreyra i sur. 2012), a opisano više od 10000 struktura flavonoida (Agati i sur. 2012). Najraširenija su skupina fenolnih spojeva čija se temeljna struktura sastoji od C15 (C6-C3-C6) flavonskog kostura, odnosno dva benzenska prstena povezana piranskim koji sadrži kisik (Schmidt 2010), (Sl. 4). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren.



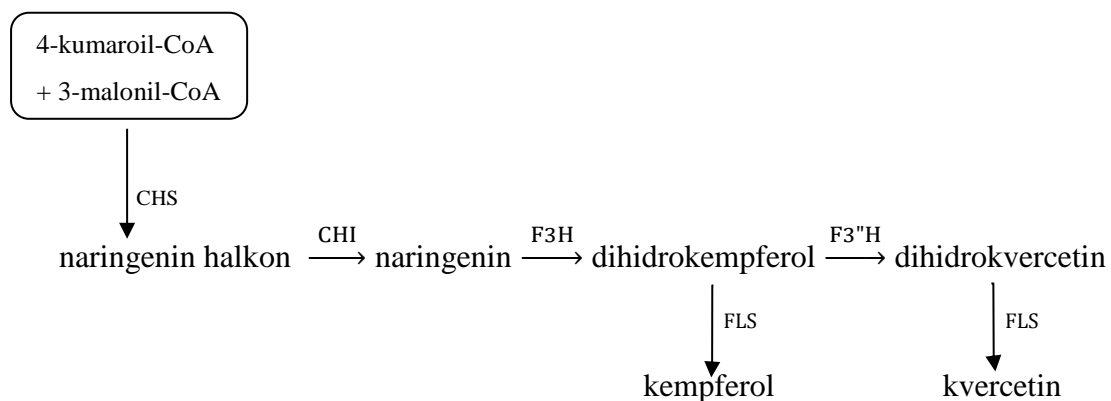
Slika 4. Osnovna kemijska struktura flavonoida (A) i prikaz struktura flavonoidnih aglikona najzastupljenijih u vrstama roda *Brassica*: kvercetin (B), kempferola (C) i izoramnetina (D) (preuzeto i prilagođeno iz izvora Cartea i sur. (2011)).

Osnovni kostur flavonoida može imati supstituente – hidroksilne skupine i šećere (većina flavonoida prirodno postoje kao glikozidi) (Pevalek-Kozlina 2003, Tsao 2010), pa mogu biti hidroksilirani, metoksilirani, glikozilirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su i esterificirani organskim kiselinama. Glikozilacija kod flavonoida uglavnom se događa na položaju 3, a rjeđe na položaju 7. Šećer koji se najčešće veže na aglikonski dio je glukoza, no pojavljuju se i galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza te neki disaharidi kao što je rutinoza (Sl. 5). Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C prstena, flavonoidi se dijele u brojne podskupine: antocijanidini, flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavan-3-oli, flavonoli, procijanidini i dihidrohalkoni. Prema topivosti dijele se na lipofilne i hidrofilne flavonoide, a najčešće su prisutni u obliku O- i C- glikozida (Von Elbe i Schwartz 1996). U vrstama roda *Brassica* flavonoidi se pojavljuju u složenim oblicima, s pet ili više šećernih grupa koji mogu biti supstituirani hidroksicimetnim skupinama (Francisco 2009).



Slika 5. Položaji glikozilacije flavonoida (izvor: <https://www.solvobiotech.com/science-letter/effects-of-flavonoids-on-p-glycoprotein-activity>).

Osnovni kostur sadrži 15 C-atoma raspoređenih u dva aromatska prstena međusobno povezana mostom od tri C-atoma, a takva struktura rezultat je dva različita biosintetska puta, jer se sintetiziraju iz produkata puta šikiminske i jabučne kiseline. Kao model za proučavanje biosinteze flavonoida koristi se vrsta *Arabidopsis thaliana* (Falcone Ferreyra i sur. 2012, Petrusa i sur. 2013). Most i jedan aromatski prsten se sintetiziraju iz fenilalanina u putu šikiminske kiseline, dok drugi prsten potječe od tri acetatne jedinice iz puta jabučne kiseline (Sl. 6). Spajanje ova dva dijela katalizira enzim halkon-sintetaza, koja daje halkon iz kojeg potječu svi flavonoidi; fenilalanin se transformira u 4-kumaroil-CoA koji ulazi u biosintetski put flavonoida; djelovanjem enzima halkon sintaza 4-kumaroil-CoA se transformira u halkon, iz kojeg dalje potječu svi flavonoidi; aglikonski oblici kvercetina, kempferola i apigenina se sintetiziraju u prvim koracima biosinteze (Falcone Ferreyra i sur. 2012). Iz halkona enzimom halkon izomeraza (CHI) nastaje flavanon naringenin koji se enzimom flavanon-3-hidroksilaza (F3H) oksidira u dihidrokempferol koji se pak hidroksilira u dihidrokevcetin. Unatoč detaljnom razumijevanju biosintetskog puta flavonoida, mehanizmi njihova transporta kroz membrane i nakupljanje u različitim dijelovima stanice trenutno nisu dovoljno poznati. Smatra se da je glavna pokretačka sila transporta flavonoida u vakuolu i staničnu stijenu protonski gradijent između citosola i vakuole odnosno stanične stijenke kojeg osigurava H⁺-ATP-aza (Petrussa i sur. 2013).



Slika 6. Biosintetski put flavonoida; CHS = halkon-sintaza, CHI = halkon-izomeraza, F3H = flavanon-3-hidroksilaza, F3'H = flavonoid-3'-hidroksilaza, FLS = flavonol-sintaza (preuzeto i prilagođeno iz izvora Falcone Ferreyra i sur. 2012).

U biljkama flavonoidi imaju različite uloge, u pigmentaciji i obrani. Antocijani su obojeni flavonoidi prisutni u cvjetovima i plodovima, koji pomažu primamljivanju životinja za oprašivanje i rasprostranjivanje sjemenki (Von Elbe i Schwartz 1996). Neki izoflavonoidi imaju snažnu insekticidnu aktivnost, a drugi pak antiestrogeni učinak koji uzrokuje neplodnost sisavaca (Pevalek-Kozlina 2003). Također služe za zaštitu od UV zračenja, stimulaciju dušik fiksirajućih bakterija, mušku fertilitnost, prijenos auksina (Kun i sur 2011, Falcone Ferreyra i sur. 2012).

Ljekovitost velikog broja biljaka bazira se upravo na sadržaju flavonoida koji imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost i sposobnost čišćenja slobodnih radikala (Rice-Evans i sur. 1996) zbog čega im se pripisuju mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antivirusno i antikancerogeno (Orhan i sur. 2010). Procijenjeno je da prosječnom prehranom čovjek dnevno u organizam unese između 20 mg i 500 mg flavonoida (Giuliani i sur. 2014, Rakers i sur. 2014). Zbog izrazite farmakološke učinkovitosti danas se flavonoidi sve više koriste u medicini, kozmetici i prehrambenoj industriji.

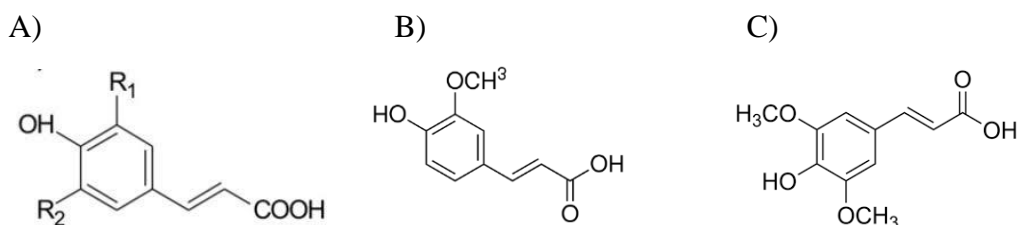
Flavoni i flavonoli su dvije skupine flavonoida koji nisu vidljivi ljudskom oku, ali ih kukci i pčele mogu vidjeti, jer apsorbiraju svjetlost kraćih valnih duljina nego antocijani. Prisutni su uglavnom u cvjetovima i listovima svih zelenih biljaka, a nakupljaju se u epidermi listova i stabljike gdje štite biljku od UV-B zračenja. Apsorbiraju u UV-B području spektra, a propuštaju fotosintetski aktivne valne duljine. Flavonol kvercetin (i flavon apigenin) su regulatori polarnog prijenosa auksina (Pevalek-Kozlina 2003, Kuhn 2011).

Kvercetin i kempferol su najzastupljeniji flavonoli povrća, a slijedi ih izoramnetin. Kvercetin je često predmet istraživanja u *in vitro* uvjetima i dokazano je njegovo antikancerogeno djelovanje, a poznat je i kao dobar hvatač slobodnih radikala, antioksidans, te štiti od kardiovaskularnih bolesti. Kempferol također pokazuje jaku antioksidacijsku aktivnost i zajedno s kvercetinom sinergijski djeluje na inhibiciju proliferacije stanica raka debelog crijeva (Rochfort i sur. 2006, Schmidt i sur. 2010). Francisco i sur. (2009) su svojim istraživanjem utvrdili da su kempferol, kvercetin i izoramnetin, glikozilirani ili acilirani drugim hidroksicimetnim kiselinama, najčešći flavonoli podvrsta *Brassica rapa*. A Lin i Harnley (2010) su istraživanjem također *B. rapa* podvrsta ustanovili da su glikozidi kempferola i kvercetina najzastupljeniji, a u manjoj mjeri i izoramnetina glavni flavonoli pekinškog kupusa.

1.3.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su sljedeća najvažnija skupina fenolnih spojeva, a dijelimo ih u dvije glavne skupine – derivati hidroksibenzojeve i derivati hidroksicimetne kiseline (Tsao 2010). Sastoje se od najmanje jednog aromatskog prstena na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Seong i sur. 2015). Prisutne su u svim biljkama (Hermann 1989); dok voće i povrće uglavnom sadrži slobodne fenolne kiseline, u žitaricama i ostalim sjemenkama dolaze u vezanom obliku (Tsao 2010). Hidroksicimetne kiseline najčešće dolaze u obliku jednostavnih estera s hidroksikarboksilnim kiselinama ili glukozom, dok su hidroksibenzojeve kiseline uglavnom prisutne u obliku glukozida. Nadalje, fenolne kiseline se u hrani biljnog podrijetla mogu pojavljivati kao esteri ili glikozidi konjugirani s drugim spojevima poput flavonoida, alkohola, sterola, hidroksimasnih kiselina i glukozidima (Hermann 1989, Lattanzio 2013). Predstavljaju 1/3 fenolnih spojeva ljudske prehrane, a pokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost koja ovisi o broju hidroksilnih skupina (Res Giada 2013). Predmet su mnogih kemijskih, bioloških, agronomskih i medicinskih istraživanja.

Hidroksicimetne kiseline, kao podskupina fenolnih kiselina, su hidroksilirani derivati cimetne kiseline (Sl. 7). Osnovna strukturna jedinica im je C6-C3 (Dewick 2007). Hidroksicimetne kiseline su, od fenolnih spojeva, najznačajniji fitoaleksini i alelopatski spojevi. Fitoaleksini su antibiotici slabe potentnosti koji mogu djelovati protiv mikroorganizama, životinjskih stanica i drugih biljnih stanica, doprinose otpornosti biljke na bolesti, te štite od predatora (Ahuja i sur. 2010). Imaju jaku antioksidacijsku aktivnost zbog mogućnosti hvatanja slobodnih radikala i inaktivacije lipidne peroksidacije. Derivati hidroksicimetnih kiselina, kao što su sinapinska, kavena, ferulična i *p*-kumarinska, često su zastupljeni u zelenoj salati, rajčici, kineskoj raštici i pekinškom kupusu (Seong i sur. 2015). A u vrstama roda *Brassica* najčešće su *p*-kumarinska, sinapinska i ferulična, često prisutne u spojevima sa šećerom ili drugom hidroksicimetnom kiselinom (Cartea 2011).



Slika 7. Osnovna kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (A), ferulične (B) i sinapinske kiseline (C) (izvori redom: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-hydroxycinnamic-acid-14_fig1_265476582 <https://www.mpbio.com/product.php?pid=05213110&country=223> i [http://www.wikiwand.com/en/Sinapinic acid](http://www.wikiwand.com/en/Sinapinic_acid))

Prema Seong i sur. (2015) dominantne hidroksicimetne kiseline pekinškog kupusa su kavena, sinapinska, *p*-kumarinska i ferulična. Sinapinska kiselina široko je rasprostranjena u biljnom carstvu i često zastupljena u ljudskoj prehrani. Njeni izvori su voće, povrće, žitarice, uljarice i ljekovito bilje. Može se pojavljivati u slobodnom obliku, ali kao većina hidroksicimetnih kiselina dolazi i u obliku estera. Pokazuje antioksidacijsko, antimikrobno, protutumorsko, protuupalno i protuanksiozno djelovanje, no pretežito zbog antioksidacijske aktivnosti ima potencijalnu upotrebu u preradi hrane, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Ima bolju antioksidacijsku aktivnost od ferulične. Smatra se da sinapin djeluje kao inhibitor acetilkolinesteraze, pa ima terapijsku primjenu kod Alzheimerove, Parkinsonove bolesti i demencije (Nićiforović i Abramović 2014).

1.4. Antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprečavaju oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji, doniranjem elektrona ili vodikova atoma, čime u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala (oksidansa) kad su oni u štetnom suvišku tj. kad je koncentracija slobodnih radikala veća nego što je potrebno za odvijanje normalnih fizioloških procesa. Antioksidansi inaktiviraju djelovanje slobodnih radikala pa tako zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprečavaju njihovo štetno djelovanje. Osim što sprečavaju neželjene procese oksidacije, antioksidansi mogu doprinijeti smanjenju oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala (Krishnaiah 2011).

Slobodni radikali su molekule koje imaju nespareni elektron i stoga su izuzetno reaktivni. U živom organizmu proizvode se pri normalnim fiziološkim procesima te imaju vrlo važnu ulogu u odvijanju brojnih funkcija, osobito u međustaničnoj komunikaciji gdje uvelike potpomažu u obrani od bakterija i drugih štetnih agenasa. Kada se nađu u suvišku narušavaju stabilnost drugih molekula u okolini da bi postigli vlastitu ravnotežu, pokreću nepoželjne lančane reakcije koje dovode do oksidativnog stresa, zbog čega nastaju oksidativna oštećenja biomolekula, oštećenja tkiva, smrt stanica i različite bolesti. Radikali se obično stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom (Lobo i sur. 2010, Sisein 2014).

Tvari kao što su vitamin C, vitamin E, karoteni, fenolni spojevi, estrogeni biljnog podrijetla imaju antioksidacijsku sposobnost, a prirodni izvor antioksidacijskih tvari su

uljarice, cjelovite žitarice, povrće, voće, zeljaste biljke, začinsko bilje, listovi, korijen. Fenolni spojevi su grupa specijaliziranih aromatskih metabolita biljke za koje se zna da posjeduju višestruka biološka djelovanja kao što su antioksidativna (Cartea 2011) i antimikrobna aktivnost (Ayaz i sur. 2008). Neke studije su pokazale da su mnogi biljni fenolni spojevi znatno učinkovitiji antioksidansi *in vitro* nego što je to vitamin E ili C, te da je njihova konzumacija povezana sa smanjenim rizikom od pojave karcinoma (Caristi i sur. 2003).

Da bi se odredio antioksidacijski kapacitet razvijen je velik broj metoda koje se temelje na različitim mehanizmima obrambenog sustava antioksidansa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili keliranja metalnih iona, koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koriste se različite metode temeljene na redukciji radikala ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil), te metoda određivanja antioksidacijske jakosti redukcijom željeza (FRAP; eng. *ferric reducing/antioxidant power*), a zbog kompleksnih oksidacijskih procesa poželjno je paralelno koristiti više metoda jer na osnovi samo jedne dobiveni rezultati ne mogu biti precizno interpretirani. Metode temeljene na redukciji radikala (ABTS i DPPH) te metoda određivanja antioksidacijske jakosti redukcijom željeza (FRAP) su široko rasprostranjene metode koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnog materijala. Baziraju se na prijenosu elektrona iz uzorka na reaktivni radikal i mjere se spektrofotometrijski temeljem promjene boje (Seong i sur. 2015). Dok se metode ABTS i DPPH temelje na redukciji slobodnih radikala dodatkom antioksidacijskih spojeva prisutnih u uzorku, metodom FRAP se mjeri redukcija Fe³⁺ iona koji se iz Fe³⁺ - TPTZ kompleksa (2,4,6-tripiridil-s-triazin) reduciraju do iona Fe²⁺ djelovanjem antioksidacijskih spojeva uzorka.

2. CILJ RADA






Sadržaj (kvalitativni i kvantitativni) fenolnih spojeva, kao i njihov antioksidacijski kapacitet, ovise o razvojnem stadiju biljke (Petropoulos i sur. 2018). Do sada su u dostupnoj literaturi informacije o sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu pekinškog kupusa zabilježene za odrasle biljke (Seong i sur. 2015), no ne postoje usporedni podaci o kvantitativnom i kvalitativnom sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu različitih razvojnih stadija ove vrste koji također mogu biti značajan izvor navedenih spojeva. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio I) odrediti količine ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina (podskupina fenolnih kiselina), II) identificirati i kvantificirati najzastupljenije pojedinačne flavonoide i fenolne kiseline, te III) odrediti antioksidacijski kapacitet pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (prvi stadij su činile mlade biljke s otvorenim kotiledonama, drugom stadiju pripadale su biljke s razvijenim dvjema kotiledonama i dva prava lista, trećem biljke s četiri lista, a biljke četvrtog i petog stadija imale su po šest, odnosno deset razvijenih listova) s ciljem utvrđivanja koji od testiranih razvojnih stadija bi se, s obzirom na navedene parametre, moglo predložiti za daljnje istraživanje potencijala u prehrambenoj industriji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Sve postupke uzgoja i pripreme biljnog materijala kao i laboratorijske metode, u sklopu ovog diplomskog rada, osobno sam odradila. Kao modelni organizam za istraživanje sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta ovisno o razvojnem stadiju biljke korištena je podvrsta pekinški kupus (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt). Sjemenke pekinškog kupusa nabavljene su iz firme International Seeds Processing GmbH, Quedlinburg (Njemačka). Sjemenke su naklijavane na vlažnom filter papiru pri kontroliranim uvjetima svjetlosti, temperature i vlage, tj. u mraku, pri temperaturi od 23 °C i udjelu vlage od 65%. Nakon četiri do pet dana naklijavanja klijanci su presađeni u teglice s univerzalnim supstratom za bilje Stender B400 (Schermbek, Njemačka) koji je prethodno prosijan i steriliziran, te dalje uzgajani do trenutka sakupljanja u stakleniku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pri konstantnim uvjetima (temp. 22-25 °C, svjetlosni režim 16 h dan/8 h noć, vlaga 65%) uz kontrolirano zalijevanje. Biljni materijal sakupljan je u pet različitih razvojnih stadija: 1 – razvijene dvije kotiledone, 2 – razvijene 2 kotiledone i 2 lista, 3 – razvijena 4 lista, 4 – razvijeno 6 listova, 5 – razvijeno 10 listova. Biljke u stadiju broj 1 sabirane su u starosti tri do pet dana, a dalje su sakupljane u razmacima od sedam do dvanaest dana ovisno o brzini razvoja listova (između svakog razvojnog stadija prošao je period od desetak dana) (Tablica 2). Na isti način uzgojene su tri biološke replike. Uzgoj i sakupljanje nadzemnih dijelova biljaka proveden je u periodu od veljače do svibnja 2018. godine. Biljke su rezane sterilnim škarama ispod donjih listova, očišćene od zaostale zemlje, isprane u tekućoj vodovodnoj i destiliranoj vodi, te odmah korištene za izradu ekstrakata. Višak biljnog materijala je usitnjen pod tekućim dušikom i uskladišten na -80 °C.

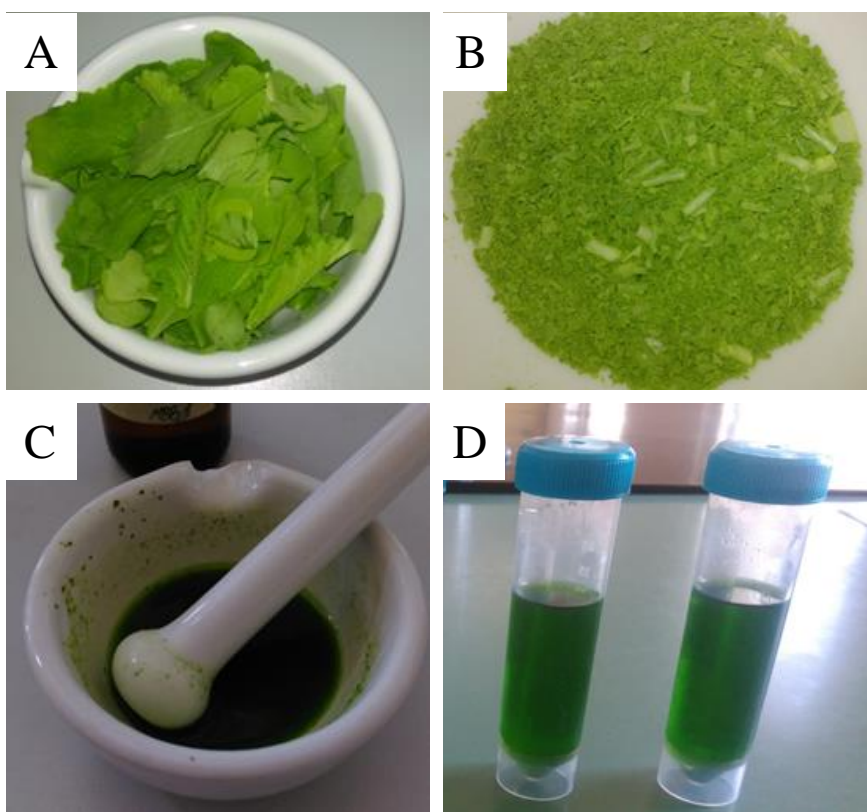
Tablica 2. Oznaka, slika i opis pet odabranih razvojnih stadija pekinškog kupusa korištenih za analizu fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta.

Oznaka razvojnog stadija	Slika razvojnog stadija	Opis razvojnog stadija
1		- starost biljaka 3-5 dana (razvijene dvije kotiledone)
2		- starost biljaka 10-16 dana (razvijene dvije kotiledone i dva lista)
3		- starost biljaka 17-26 dana (razvijena četiri lista)
4		- starost biljaka 24-40 dana (razvijeno šest listova)
5		- starost biljaka 31-46 dana (razvijeno deset listova)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema ekstrakata

Sakupljen i očišćen biljni materijal smrznut je tekućim dušikom i usitnjen u tarioniku. Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 70%-tni etanol (EtOH). Ekstrakti konačne koncentracije 150 mg/mL pripremljeni su u epruvetama na sljedeći način: usitnjeno biljno tkivo preliveno je određenim volumenom ekstrakcijskog otapala te pri sobnoj temperaturi 60 minuta inkubirano na vrtložnoj miješalici pri 50 okretaja u minuti. Dobiveni ekstrakti centrifugirani su 5 minuta pri 13000 g u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5804R, te su supernatanti odvojeni u nove epruvete i spremljeni na -20 °C do daljnjih analiza (Sl. 8). Navedena metoda izrade ekstrakta optimizirana je u Laboratoriju za fitokemiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 8. Postupak izrade ekstrakta: A) sakupljanje, čišćenje i priprema biljnog tkiva, B) smrzavanje i usitnjavanje tekućim dušikom, C) dodavanje 70%-tnog etanola i homogeniziranje u tarioniku, D) pročišćeni supernatanti.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Fenolni spojevi mogu se analizirati primjenom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. U usporedbi s kromatografskim, spektrofotometrijske metode su jednostavne i praktične, a za određivanje ukupnih fenola najčešća je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom. Sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima određen je spektrofotometrijski, mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 740 nm, modificiranom metodom prema Zhishen i sur. (1999). Metoda se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji predstavlja smjesu fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koje se pri oksidaciji fenolnih spojeva reduciraju u plavo obojeni volfram-oksidi i molibden-oksidi (Ough i Amerine 1998).

Sadržaj ukupnih fenola u pojedinim uzorcima određen je očitavanjem baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina galne kiseline. Za očitavanje baždarnog pravca prvo je pripremljena matična etanolna otopina galne kiseline konačne koncentracije 2 mg/mL; 100 mg galne kiseline otopljeno je u 50 mL 96%-tnog EtOH. Iz matične otopine pripremljen je niz razrjeđenja (0,1 - 1 mg/mL) u konačnom volumenu 1 mL. Baždarni dijagram za određivanje sadržaja ukupnih fenola, kao ekvivalenata galne kiseline, prikazuje ovisnost apsorbancije otopine pri 740 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline.

Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu:

$$y = 0,6381x - 0,0468; R^2 = 0,9966$$

Prvo je pripremljena 1,88 M otopina natrijevog karbonata. Smjese otopina rađene su na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica pri čemu je svaka reakcija rađena u tri ponavljanja. U 53 jažice otpipetirano je po 158 μ L deionizirane vode (dH_2O) i 10 μ L Folin-Ciocalteu (FC) reagensa u koje je redom dodavano: 2 μ L 70%-tnog EtOH kao slijepa proba ili 2 μ L galne kiseline otopljene u 70%-tnom EtOH u različitim koncentracijama ili 2 μ L ekstrakta pekinškog kupusa. Sve smjese su desetak puta promiješane pipetom. Potom je u sve jažice dodano po 30 μ L 1,88 M Na_2CO_3 (natrijevog karbonata) te još jednom promiješano. Smjese otopina inkubirane su 30 minuta na 45 °C. Nakon inkubacije očitane su apsorbancije na spektrofotometru FLUORstar Optima na valnoj duljini od 740 nm. Sadržaj ukupnih fenola u pojedinim uzorcima pekinškog kupusa odredio se očitavanjem baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina galne kiseline poznatih koncentracija (0,1 - 1

mg/mL) te izrazio u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu svježe mase uzorka (mg EGK/g svm).

U Excelu je izrađen baždarni pravac, a sadržaj ukupnih fenola izračunat je prema formuli:

$$[\text{Fenoli}] = \frac{A-b}{a} \quad (\text{mg/mL})$$

pri čemu je:

A – apsorbancija pri 740 nm

a – ekstincijski koeficijent

b – odsječak na osi y

3.2.3. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli izmjereni su na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c. Za određivanje ukupnih spojeva korištena je modificirana metoda prema Howard i sur. (2003). U Eppendorf epruvete dodano je 25 μL uzorka nehidroliziranog ekstrakta pekinškog kupusa, 25 μL otopine klorovodične kiseline (HCl) masene koncentracije 1 g/L razrijeđene u 96%-tnom EtOH i 455 μL vodene otopine HCl masene koncentracije 2 g/L. Smjese su deset sekundi miješane na tresilici nakon čega su prebačene u staklene kivete. Ukupne hidroksicimetne kiseline mjerene su na valnoj duljini 310 nm, a ukupni flavonoli na 360 nm. Za izradu baždarnog pravca za hidroksicimetne kiseline korištena je kavena kiselina (0,01 – 1 g/L), a za flavonole kvercetin različitih koncentracija (0,1 – 1,55 g/L). Po 25 μL kavene kiseline i kvercetina različitih koncentracija pomiješano je na tresilici s 25 μL 1 g/L HCl u 96%-tnom EtOH i 455 μL 2 g/L HCl u deioniziranoj vodi, te su na spektrofotometru izmjerene apsorbancije. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola određen je pomoću jednadžbi baždarnih pravaca dobivenih mjerenjem apsorbancije otopina kavene kiseline, odnosno kvercetina u 96%-tnom etanolu.

Jednadžba baždarnog pravca za kavenu kiselinu:

$$y = 3,7781x + 0,0345; R^2 = 0,9945$$

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin:

$$y = 1,8127x + 0,1181; R^2 = 0,9955$$

Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražen je kao miligram ekvivalenta kavene kiseline (eng. *caffeic acid equivalents*) po gramu svježe mase uzorka (mg CAE/g svm), dok je sadržaj flavonola izražen u miligramu ekvivalenta kvercetina (eng. *quercetin equivalents*) po gramu svježe mase uzorka (mg QE/g svm). U Excelu je izrađen baždarni pravac, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola izračunat je prema formuli:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Hidroksicimetne kiseline} \\ \text{ili} \\ \text{Flavonoli} \end{array} \right] = \frac{A-b}{a} \quad (\text{mg/mL})$$

pri čemu je:

A – apsorbancija pri 740 nm

a – ekstincijski koeficijent

b – odsječak na osi y

3.2.4. Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih spojeva uzoraka provedena je metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC; eng. *high-performance liquid chromatography*). Metoda se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. U sklopu ovog diplomskog rada analizirani su aglikonski oblici fenolnih spojeva pa su u tu svrhu ekstrakti hidrolizirani sljedećim postupkom: na određeni volumen ekstrakta dodana je koncentrirana klorovodična kiselina (HCl) tako da je njena konačna koncentracija bila 1,2 M. Uzorci su potom inkubirani na termomikseru u trajanju od 2 sata, pri temperaturi od 80°C i 300 okretaja u minuti. Nakon završetka hidrolize ekstrakti su do upotrebe skladišteni na -20°C.

Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva korišten je uređaj Agilent 1100 Series s UV/VIS detektorom. Razdvajanje je provedeno na nepolarnoj koloni Poroshell 120 SB-C18 dimenzija 4,6 x 75 mm s veličinom čestica 2,7 µm uz upotrebu pretkolone Zorbax Rx-C18 dimenzija 4,6 x 12,5 mm s veličinom čestica 5 µm. Mobilna faza A bila je 0,2%-tna octena kiselina, a mobilna faza B smjesa 0,2%-tne octene kiseline i 80%-tnog metanola. Brzina

protoka otapala bila je 1 mL/min, a aplicirani volumen uzorka 25 μ L. Korištena je metoda razvijena u Laboratoriju za fitokemiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Flavonoidi su analizirani pri valnoj duljini 360 nm, a za analizu fenolnih kiselina korištena je valna duljina od 310 nm.

Spojevi su identificirani usporedbom retencijskih vremena pikova dobivenih analizom ekstrakata s retencijskim vremenima pikova dobivenih analizom standarda. Kvantifikacija spojeva provedena je upotrebom baždarnih pravaca odgovarajućih standarda (Tablica 3), prema formuli:

$$x = \frac{y-b}{a} \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

x = masa spoja

y = apsorbancija

Baždarni pravci za svaki spoj definirani su analizom otopina različitih koncentracija (0,01-0,25 mg/mL) standarda istom metodom kao i za ekstrakte.

Tablica 3. Jednadžbe baždarnih pravaca i R^2 vrijednosti standarda odabranih fenolnih spojeva

Fenolni spoj	Jednadžba baždarnog pravca	R^2
Sinapinska kiselina	$y = 1842.1x + 25.56$	0.999
Ferulična kiselina	$y = 2815.8x - 36.454$	0.999
Kvercetin	$y = 944.51x - 39.118$	0.997
Kempferol	$y = 1076.9x - 36.287$	0.998
Izoramnetin	$y = 1241.9x - 39.743$	0.999

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS

ABTS (2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je metoda primjenjiva za ispitivanje lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa uključujući fenole, hidroksicinamate, karotenoide i plazmatske antioksidanse. Metoda se temelji na „gašenju“ plavo-zelenog ABTS⁺ radikal-kationa koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog peroksodisulfata. Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije prethodno generiranog radikala ABTS⁺, što ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti i koncentraciji ispitivanog antioksidansa te trajanju reakcije. Udjel reduciranog radikala ABTS⁺ kojeg gase antioksidansi, mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije radikala ABTS⁺, te se antioksidacijska aktivnost izražava kao postotak inhibicije radikala ABTS⁺ (Re i sur. 1999).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti pripremljena je otopina radikala ABTS⁺ koja se oksidira pomoću kalijevog peroksodisulfata. Konačna koncentracija otopine kalijevog peroksodisulfata iznosila je 2,45 mM. Pomiješano je 88 µL 140 mM otopine kalijevog peroksodisulfata te nadopunjeno sa 7 mM otopinom ABTS reagensa do volumena od 5 mL. Ovako pripremljena otopina omotana je folijom i ostavljena da odstoji minimalno 12 sati, kako bi došlo do potpune oksidacije.

Na mikrotitarsku pločicu otpipetirano je: 200 µL radikala ABTS⁺ i 2 µL 70%-tnog EtOH kao slijepa proba ili 200 µL radikala ABTS⁺ i 2 µL ekstrakta. Nakon postavljanja reakcija smjese su promiješane pipetom desetak puta te ostavljene na sobnoj temperaturi, u mraku, da inkubiraju 6 minuta. Prije mjerenja na spektrofotometru FLUORstar Optima provjerena je i podešena apsorbancija radikala ABTS⁺ na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c dodavanjem ABTS reagensa ili razrjeđivanjem 96%-tnim etanolom, tako da apsorbancija iznosi $0,7 \pm 0,02$. Maksimum apsorbancije radikal ABTS⁺ dostiže na valnim duljinama od 645 nm, 734 nm ili 815 nm, a u ovom istraživanju apsorbancije su mjerene na 734 nm, na spektrofotometru FLUORstar Optima. Uz mjerenje uzoraka, izmjerena je apsorbancija slijepe probe koja služi kao referentno mjerenje. Postotak inhibicije radikala ABTS⁺ izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

pri čemu je:

A_0 – apsorbanacija slijepa probe (bez ekstrakta)

A_t – apsorbanacija uzorka (s ekstraktom)

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom DPPH

Metoda DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil) je brza i jednostavna, pa tako i jedna od najčešće korištenih metoda kojom se određuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Zasniva na redukciji alkoholne otopine radikala DPPH u prisutnosti antioksidansa (AH) ili radikala (R) pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H). Uslijed reakcije s antioksidansom radikal DPPH se reducira u neradikalni oblik pri čemu dolazi do smanjenja apsorbanacije (Fernandes i sur. 200). Smanjenje apsorbanacije proporcionalno je aktivnosti antioksidansa, a iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije računa se postotak inhibicije radikala DPPH. Za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta koristila se modificirana metoda prema Germanò i sur. (2002).

Kao i kod prethodne metode, u mikrotitarsku pločicu otpipetirano je: 190 μ L 0,1 mM otopine DPPH reagensa u 96%-tnom etanolu i 10 μ L 70 %-tnog EtOH kao slijepa proba ili 190 μ L 0,1 mM otopine DPPH reagensa u 96%-tnom etanolu i 10 μ L ekstrakta. Pri pipetiranju smjese su kratko promiješane i ostavljene da inkubiraju 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbanacija reakcija na spektrofotometru, pri valnoj duljini 517 nm. Za referentno mjerenje na spektrofotometru korištena je slijepa proba. Reakciju uklanjanja slobodnog radikala prati promjena boje od intenzivno ljubičaste na početku reakcije do žute, a što se detektira smanjenjem apsorbanacije na navedenoj valnoj duljini. Postotak inhibicije radikala DPPH izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

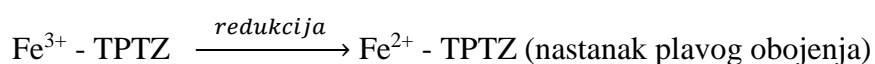
pri čemu je:

A_0 – apsorbanacija slijepa probe (bez ekstrakta)

A_t – apsorbanacija uzorka (s ekstraktom)

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP

Metoda FRAP (eng. *ferric reducing/antioxidant power*) je jednostavni direktni test antioksidacijskog kapaciteta gdje se antioksidacijska aktivnost opisuje kao sposobnost reduciranja. Neenzimski antioksidansi (npr. vitamin C i bioflavonoidi) mogu se smatrati reducensima koji uzrokuju redukciju oksidansa. U FRAP metodi oksidans se reducira pomoću reducensa u redoks – kolorimetrijskoj reakciji, pri niskim pH uvjetima. Iz Fe^{3+} - TPTZ kompleksa (2,4,6-tripiridil-s-triazin) ioni Fe^{3+} se reduciraju do iona Fe^{2+} koji pokazuju maksimalnu apsorbanciju pri valnoj duljini od 593 nm (Benzie i Strain 1999):



Prvo je pripremljen svježi FRAP reagens miješanjem 25 mL 300 mM acetatnog pufera, 2,5 mL 10 mM TPTZ otopine i 2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (željezo (III) klorid heksahidrat) koji je zagrijan na 37 °C. A otopina TPTZ-a, koncentracije 10 mM, dobivena je otapanjem 159,4 mg TPTZ-a u 50 mL klorovodične kiseline (HCl). Na mikrotitarsku pločicu otpipetirano je: 190 μL reagensa FRAP i 10 μL 70 %-tnog EtOH kao slijepa proba ili 190 μL reagensa FRAP i 10 μL ekstrakta. Pri pipetiranju smjese su kratko promiješane i ostavljene na sobnoj temperaturi da odstoje 4 minute. Nakon inkubacije izmjerene su apsorbancije zadanih reakcija na valnoj duljini od 593 nm. Kao referentno mjerenje korištena je apsorbancija slijepa probe. Postotak redukcije Fe^{3+} - TPTZ izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_t - A_0}{A_t} * 100$$

pri čemu je:

A_0 – apsorbancija slijepa probe (bez ekstrakta)

A_t – apsorbancija uzorka (s ekstraktom)

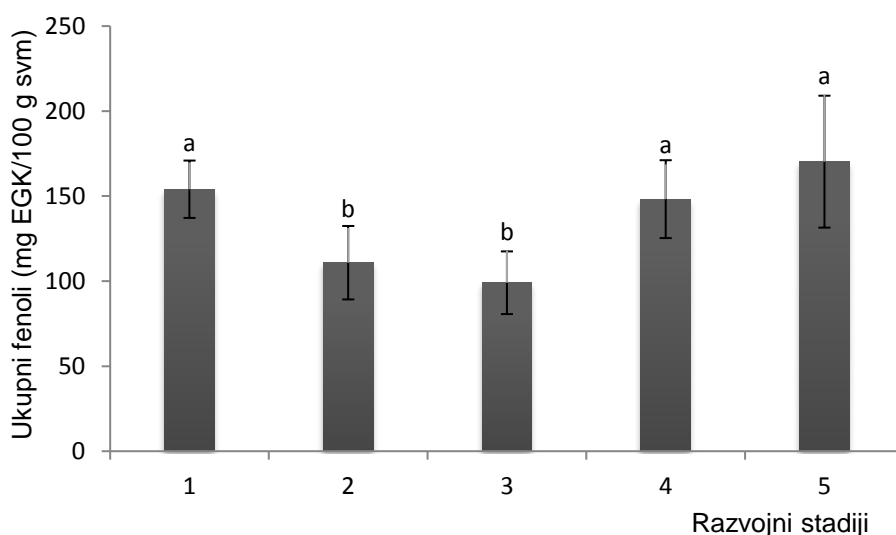
3.2.8. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci su statistički obrađeni u programu Statistica 13,1 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedba uzoraka provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom testa "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT), tj. post hoc testa višestrukih usporedbi. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Ukupni fenoli

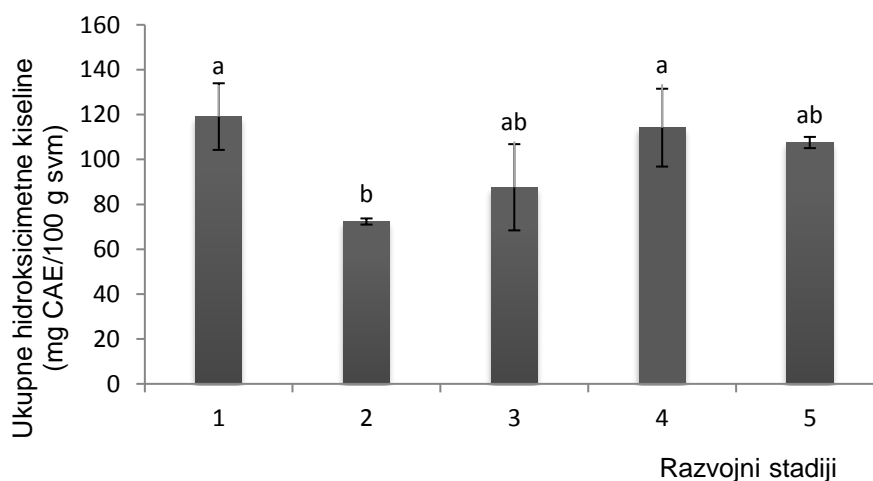
Rezultati na slici 9 pokazuju promjenu koncentracija ukupnih fenola u različitim razvojnim stadijima biljke. Zabilježena je visoka koncentracija ukupnih fenola na samom početku razvoja biljke, u prvoj fazi razvoja kotiledona gdje iznosi 154 mg EGK/100 g svm. Sazrijevanjem biljke i razvojem prvih listova zabilježen je pad sadržaja ukupnih fenola (stadij 2 – 111 mg EGK/100 g svm, stadij 3 – 99 mg EGK/100 g svm). Daljnjim rastom biljke u stadijima 4 i 5 zabilježen je rast sadržaja ukupnih fenola od 33,12 % i 41,77 % u odnosu na treći stadij. Najmanja vrijednost zabilježena je u trećem stadiju (99 mg EGK/100 g svm), a najveća u posljednjem stadiju prilikom razvoja najvećeg broja listova (170 mg EGK/100 g svm). Stadiji 1, 4 i 5 bilježe statistički značajno veće koncentracije ukupni fenola od stadija 2 i 3.



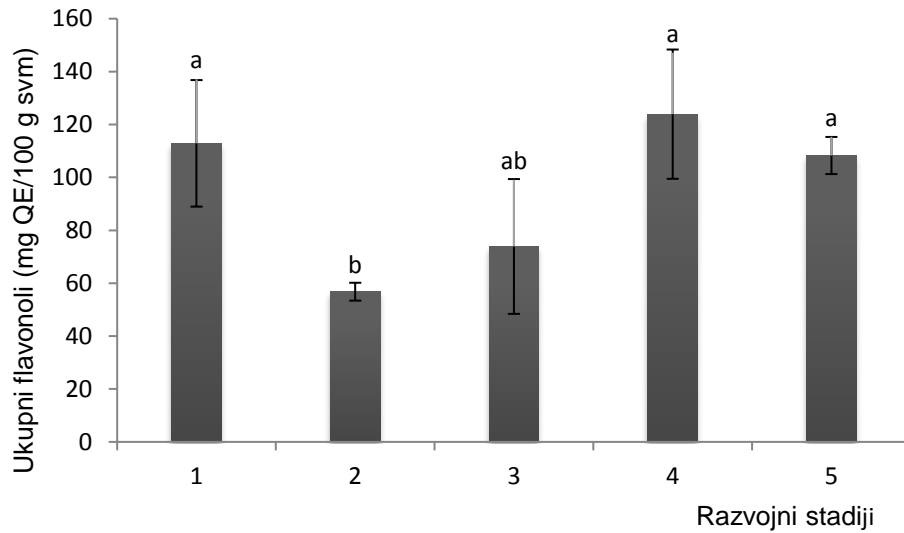
Slika 9. Ukupni fenoli pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline na 100 grama svježe mase uzorka (mg EGK/100 g svm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitima (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4.2. Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli

Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina (Sl. 10) i flavonola (Sl. 11) određen je spektrofotometrijski pomoću modificirane metode prema Howard i sur. (2003). Najniža koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola zabilježena je u stadiju 2, u kojem su razvijene kotiledone i prva dva prava lista, i to u vrijednostima od 72,35 mg CAE/100 g svm hidroksicimetnih kiselina i 56,79 mg QE/100 g svm flavonola. Opet je zabilježen trend visokog sadržaja spojeva u prvoj fazi, potom pad u drugoj fazi u kojoj biljka razvija prve listove, te ponovni postepeni porast sadržaja spojeva daljnjim starenjem biljke i razvojem novih listova. Najviša koncentracija ispitivanih spojeva identificirana je, dakle, prilikom razvoja kotiledona, a idući rast bilježi se prilikom razvoja veće biljne mase, u četvrtom i petom stadiju u kojem biljka sadrži šest do deset listova. Najviša koncentracija hidroksicimetnih kiselina iznosi 119 mg CAE/100 g svm, a flavonola 148 mg QE/100 g svm. Količina ukupnih hidroksicimetnih kiselina stadija 2 statistički se znatno razlikuje u odnosu na stadije 1 i 4 koji bilježe veću koncentraciju navedenih spojeva (Sl. 10). Sličan odnos između stadija uočen je i kod ukupnih flavonola (Sl. 11), gdje je tijekom razvoja prvih pravih listova (stadij 2) znatno niža koncentracija u odnosu na stadij 1 (samo kotiledone) i stadije sa šest ili deset listova (stadiji 4 i 5). Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina je viši od sadržaja ukupnih flavonola u prva tri razvojna stadija, dok je u stadiju 4 i 5 viša koncentracija ukupnih flavonola.



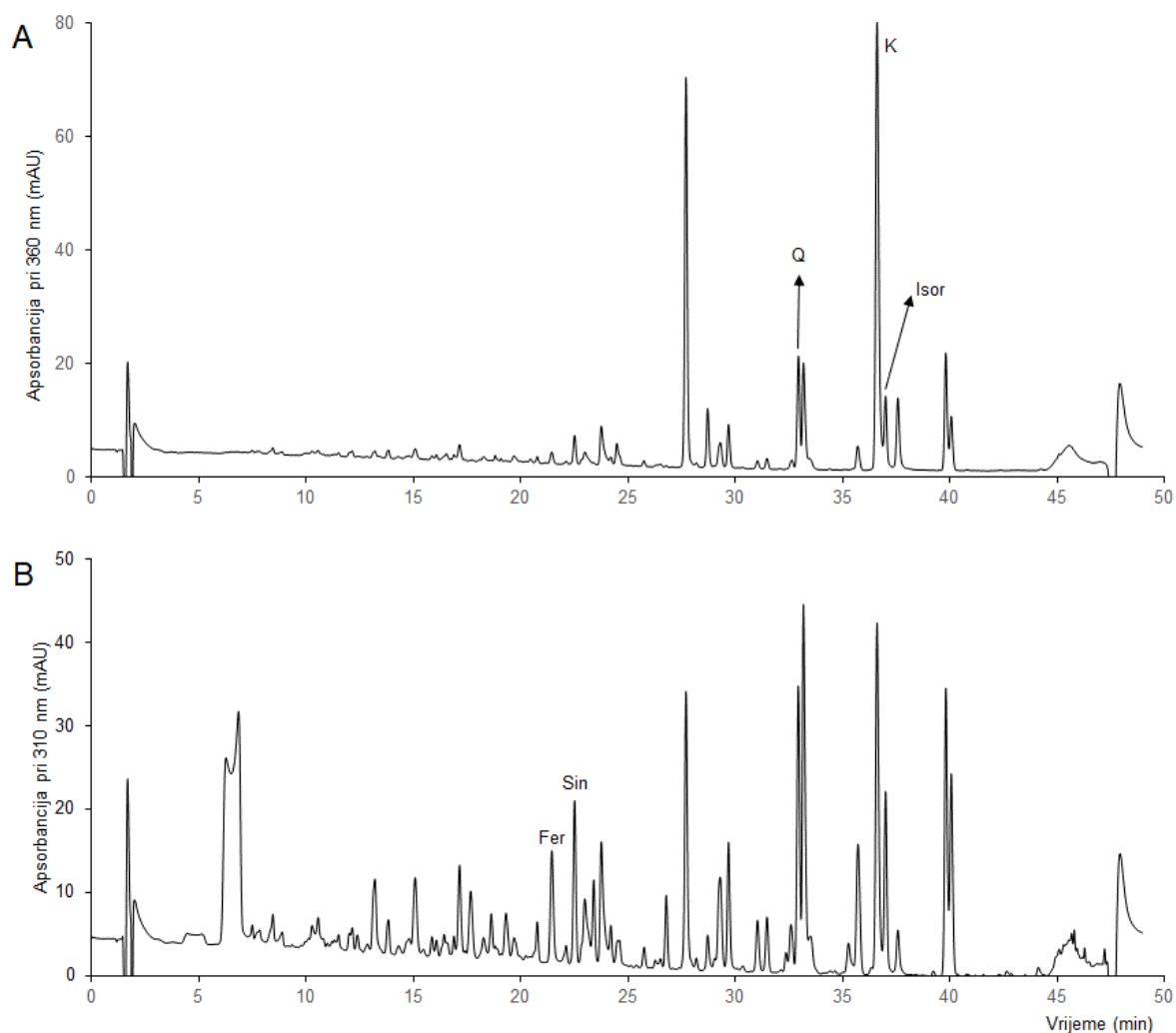
Slika 10. Ukupne hidroksicimetne kiseline pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1 = kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izražene u miligramima ekvivalenta kavene kiseline na 100 grama svježe mase uzorka (mg CAE/100 g svm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).



Slika 11. Ukupni flavonoli pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izraženi u miligramima ekvivalenta kvercetina na 100 grama svježe mase uzorka (mg QE/100 g svm). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitima (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

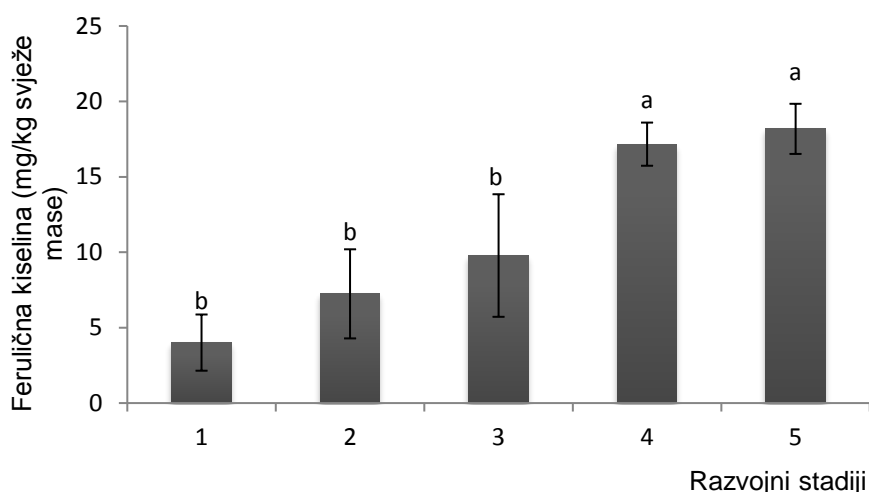
4.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC; eng. *high performance liquid chromatography*) razdvojeni su, identificirani i kvantificirani flavonoidi (Sl. 12 A) i hidroksicimetine kiseline (Sl. 12 B) pekinškog kupusa. Od flavonoida kvercetin, kempferol i izoramnetin, a od hidroksicimetnih kiselina identificirane su ferulična i sinapinska kiselina.

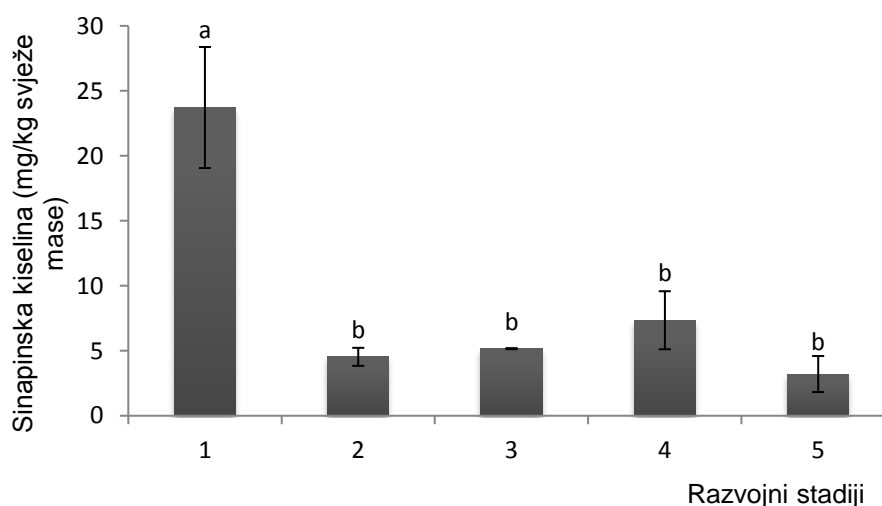


Slika 12. A) Flavonoidi i B) hidroksicimetine kiseline pekinškog kupusa u stadiju razvoja s deset listova razdvojeni metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja. Q = kvercetin, K = kempferol, Isor = izoramnetin, Fer = ferulična kiselina, Sin = sinapinska kiselina.

Koncentracija ferulične kiseline najveća je u stadijima 4 (17,16 mg/kg svm) i 5 (18,18 mg/kg svm), dok je u stadijima 3 (9,78 mg/kg svm), 2 (7,24 mg/kg svm) i 1 (4,01 mg/kg svm) znatno manja i međusobno se statistički ne razlikuju (Sl. 13). Sinapinska kiselina je najzastupljenija u 1. stadiju (23,72 mg/kg svm), dok su koncentracije u ostala četiri stadija znatno manje (2 – 4,53 mg/kg svm, 3- 5,16 mg/kg svm, 4 – 7,35 mg/kg svm i 5 – 3,21 mg/kg svm) i međusobno se značajno ne razlikuju ($p \leq 0,05$) (Sl. 14).

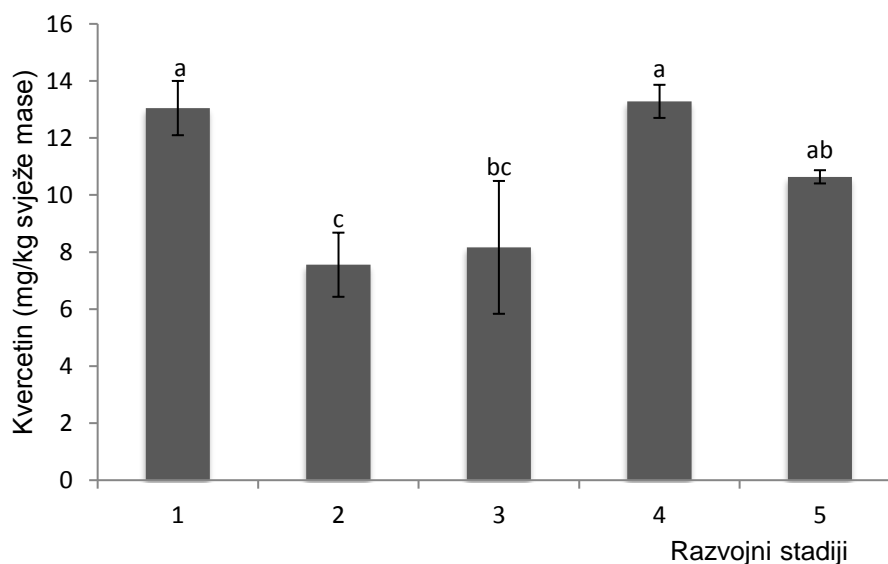


Slika 13. Sadržaj ferulične kiseline pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izražen u mg/kg svježe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

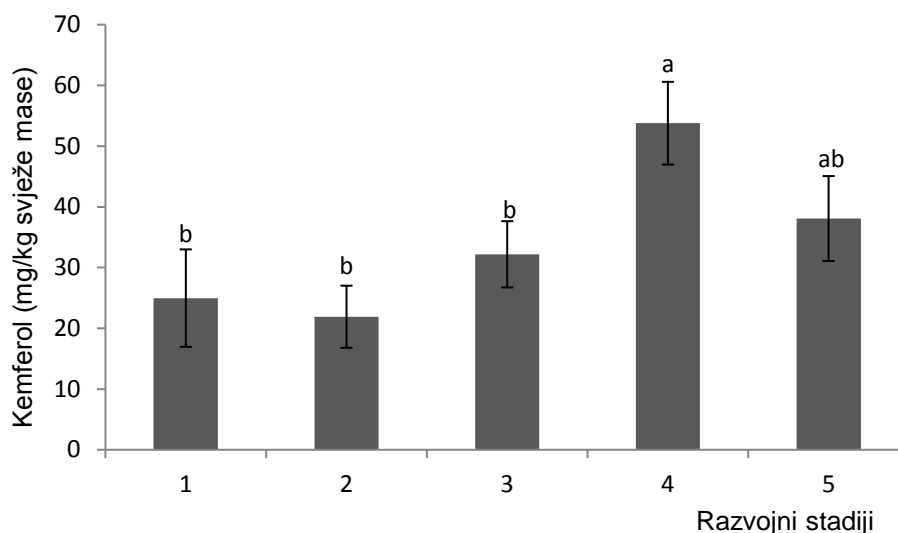


Slika 14. Sadržaj sinapinske kiseline pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izražen u mg/kg svježe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

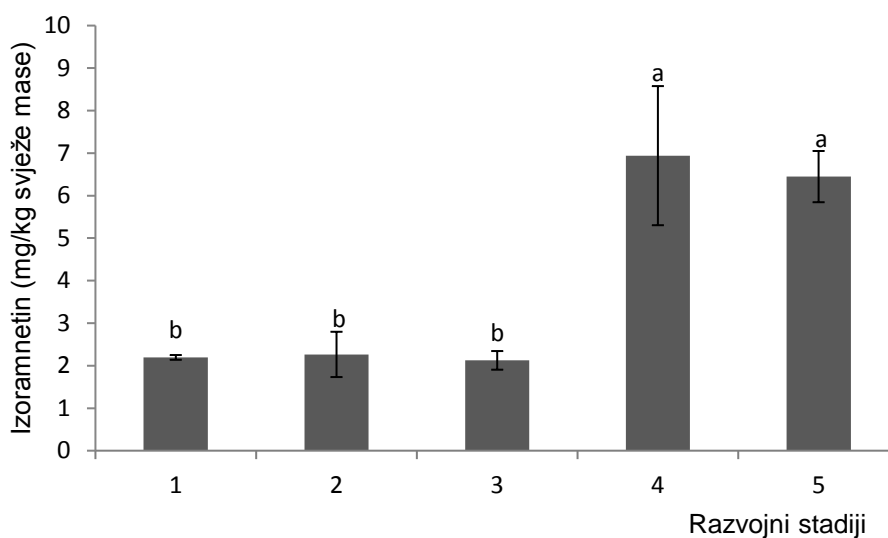
Među flavonoidima, najzastupljeniji je bio kempferol, zatim kvercetin, a najmanje je detektirano izoramnetina (Sl. 18 A). Kempferol je prisutan u znatno većoj koncentraciji u stadiju 4 (53,77 mg/kg svm), dok su koncentracije u stadijima 3 (32,19 mg/kg svm), 1 (24,98 mg/kg svm) i 2 (21,91 mg/kg svm) znatno manje (Sl. 16). Najveća koncentracija kvercetina zabilježena je u stadijima 1 (13,05 mg/kg svm) i 4 (13,28 mg/kg svm) pri čemu se koncentracija kvercetina u tim stadijima značajno statistički razlikuje od stadija 2 (7,55 mg/kg svm) (Sl. 15). Izoramnetin je najzastupljeniji u stadijima 4 (6,94 mg/kg svm) i 5 (6,45 mg/kg svm), pri čemu se ti stadiji znatno statistički razlikuju od stadija 1 (2,19 mg/kg svm), 2 (2,26 mg/kg svm) i 3 (2,12 mg/kg svm), (Sl. 17). U svakom od stadija je zabilježena statistički znatno veća koncentracija kempferola nego kvercetina ili izoramnetina (Sl. 18 B).



Slika 15. Sadržaj kvercetina pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izražen u mg/kg svježe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

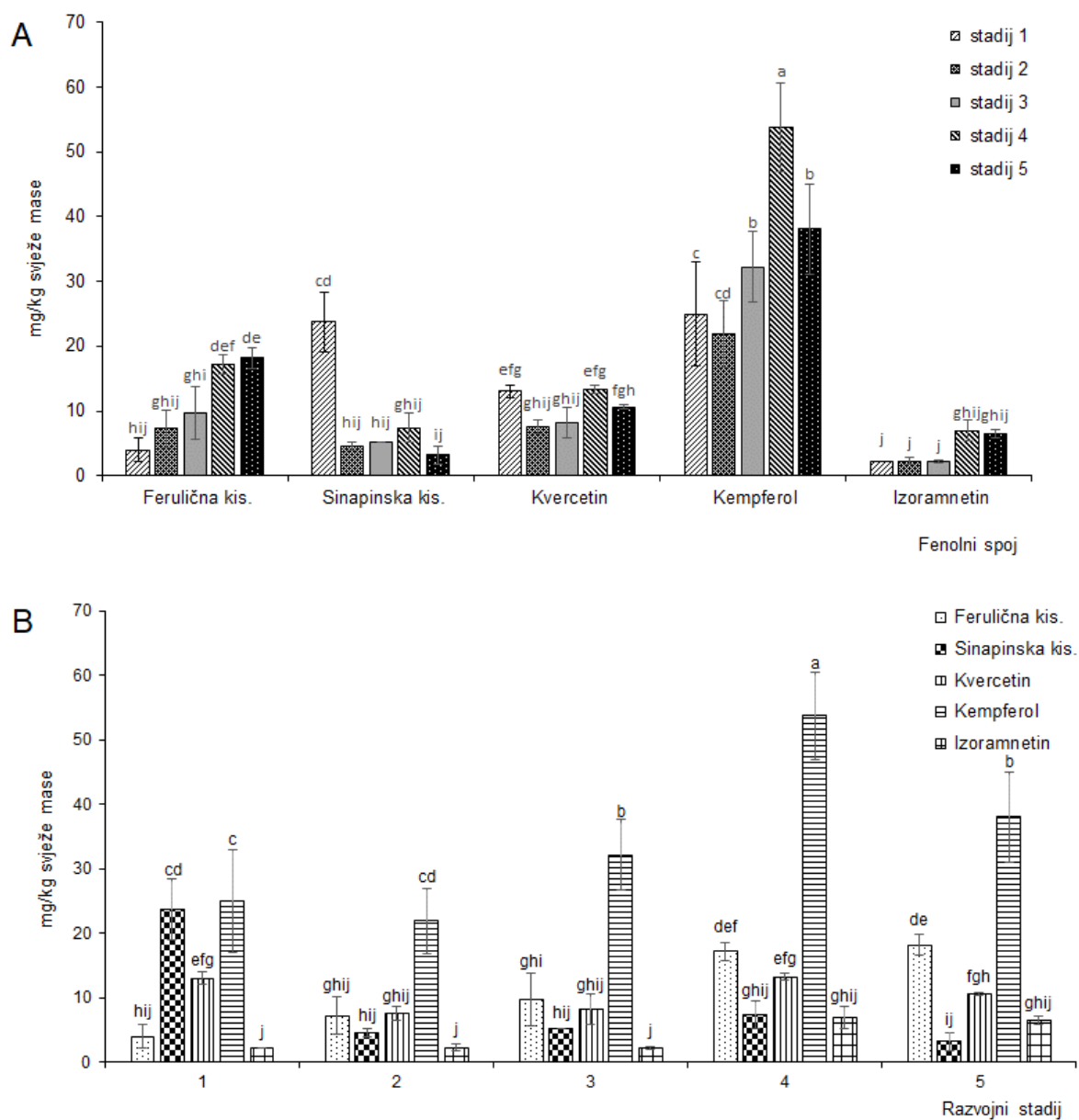


Slika 16. Sadržaj kempferola pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izražen u mg/kg svježe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).



Slika 17. Sadržaj izoramnetina pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izražen u mg/kg svježe mase. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

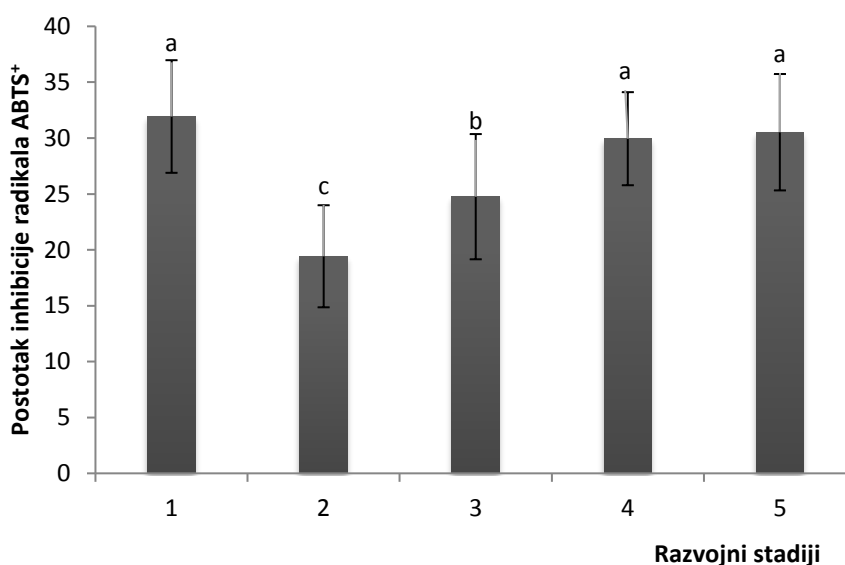
Značajno najveća koncentracija pojedinačnog spoja je zabilježena za kempferol i to u stadijima 3, 4 i 5 (Sl. 18 A). U svim stadijima koji sadrže prave listove, dakle stadiji 2, 3, 4 i 5, kempferol je dominantan među identificiranim spojevima. U stadiju 1 koji sadrži samo kotiledone dominantni identificirani spojevi su kempferol i sinapinska kiselina (Sl. 18 B).



Slika 18. Usporedba HPLC metodom identificiranih fenolnih spojeva (flavonoida i hidroksicimetnih kiselina) pekinškog kupusa s obzirom na fenolni spoj (A) i razvojni stadij (B). Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4.4. Antioksidacijski kapacitet određen metodom ABTS

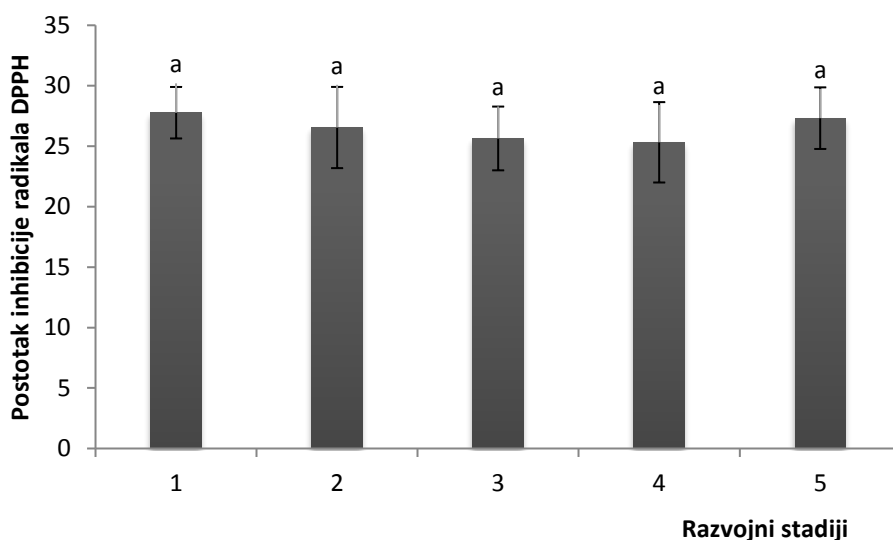
Najviši antioksidacijski kapacitet zabilježen je u prvom razvojnom stadiju s 31,93% inhibicije radikala ABTS⁺ (Sl. 19). Nakon prvog stadija slijedi pad antioksidacijske aktivnosti u drugom stadiju, a treći, četvrti i peti stadij bilježe postepeni rast. U petom stadiju zabilježeno je 30,52% inhibicije, nakon čega redom slijede četvrti stadij s 29,95%, treći s 24,76% inhibicije radikala ABTS⁺, te naposljetku drugi razvojni stadij s najnižom zabilježenom antioksidacijskom aktivnošću (19,43%). Analizom varijance stadiji 1, 4 i 5 grupirani su u istu skupinu, te se međusobno statistički ne razlikuju, dok se stadiji 2 i 3 međusobno i sa stadijima 1, 4 i 5 statistički značajno razlikuju.



Slika 19. Antioksidacijski kapacitet pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izmjeren metodom ABTS i prikazan kao postotak inhibicije radikala ABTS⁺. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4.5. Antioksidacijski kapacitet određen metodom DPPH

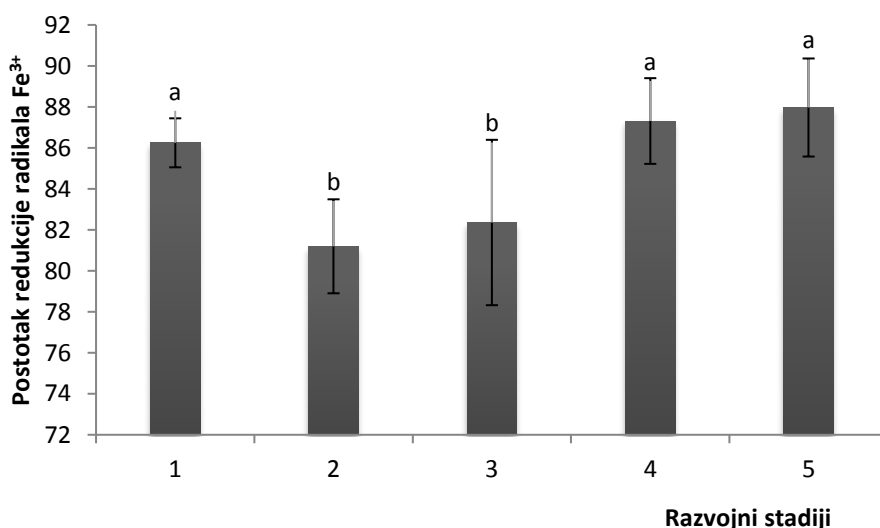
Usljed reakcije s antioksidansom dolazi do pretvorbe radikala DPPH u neradikalni oblik (uklanjanja slobodnog radikala) što se detektira smanjenjem apsorbancije koja je proporcionalna aktivnosti antioksidansa, a izražava se kao postotak inhibicije radikala DPPH. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem, prikazani na Sl. 20, pokazuju da različiti stadiji razvoja imaju bliske vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog metodom DPPH, te se izmjerene vrijednosti međusobno statistički ne razlikuju. Najviša vrijednost zabilježena je u prvom stadiju i iznosi 27,77% inhibicije radikala DPPH, a najniža u četvrtom stadiju (25,32% inhibicije radikala DPPH).



Slika 20. Antioksidacijski kapacitet pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1= kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izmjeren DPPH metodom i prikazan kao postotak inhibicije radikla DPPH. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitima (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

4.6. Antioksidacijski kapacitet određen metodom FRAP

U sklopu metode FRAP učinak antioksidansa izračunat je u odnosu na signal reakcije od iona Fe^{2+} otopine poznate koncentracije, a koja predstavlja reakciju izmjene jednog elektrona. Rezultati analize antioksidacijskog kapaciteta, određeni metodom FRAP (Sl. 21), pokazuju da aktivnost pada u drugom stadiju, a dalje postepeno raste. Prvi stadij bilježi 86,25% redukcije radikala Fe^{3+} - TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), drugi 81,2%, treći 82,36%, a četvrti i peti 87,31% te 87,97% redukcije radikala Fe^{3+} - TPTZ, što znači da je najviša antioksidacijska aktivnost zabilježena u zadnjem ispitivanom stadiju, a najniža u drugom stadiju, prilikom razvoja prvog para listova. Stadiji 1, 4 i 5 spadaju u istu statističku skupinu, te se statistički značajno razlikuju od stadija 2 i 3.



Slika 21. Antioksidacijski kapacitet pet razvojnih stadija pekinškog kupusa (stadij 1 = kotiledone, stadij 2 = kotiledone i 2 lista, stadij 3 = 4 lista, stadij 4 = 6 listova i stadij 5 = 10 listova) izmjeren FRAP metodom i prikazan kao postotak redukcije Fe^{3+} - TPTZ radikala do Fe^{2+} - TPTZ radikala. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitim (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

5. RASPRAVA

Pekinški kupus (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) je u prehrani čovjeka sve zastupljenija biljka iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). Prehrambena kvaliteta odrasle biljke potječe od bjelančevina, vitamina, minerala, dijetalnih vlakana, glukozinolata i fenolnih spojeva (Cartea i sur. 2011) koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Biološki učinci fenolnih spojeva najčešće se objašnjavaju njihovim snažnim antioksidacijskim svojstvima (Seong i sur. 2016). Sadržaj (kvalitativni i kvantitativni) fenolnih spojeva, kao i njihov antioksidacijski kapacitet, ovise o razvojnom stadiju biljke (Petropoulos i sur. 2018). Do sada su u dostupnoj literaturi informacije o sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu pekinškog kupusa zabilježene za stadij s razvijenim kotiledonama (Šamec i sur. 2018) i odrasle biljke (Seong i sur. 2016), no ne postoje usporedni podaci o kvantitativnom i kvalitativnom sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu različitih razvojnih stadija ove vrste. Pavlović (2017) navodi koncentracije slobodnih i vezanih fenolnih kiselina pekinškog kupusa u razvojnim stadijima koji odgovaraju stadijima 1 i 3 u sklopu ovog diplomskog rada, no usporednih podataka o sadržaju dominantnih flavonoida te antioksidacijskom kapacitetu pekinškog kupusa različitih razvojnih stadija do sada nema. Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio odrediti količine ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina (podskupina fenolnih kiselina), identificirati i kvantificirati najzastupljenije pojedinačne flavonoide i fenolne kiseline, te odrediti antioksidacijski kapacitet pet razvojnih stadija pekinškog kupusa: 1 = razvijene kotiledone, 2 = razvijene kotiledone i 2 lista, 3 = razvijeno 4 lista, 4 = razvijeno 6 listova, 5 = razvijeno 10 listova kako bi se moglo zaključiti koji od testiranih razvojnih stadija pokazuje najveći sadržaj fenolnih spojeva i najveći antioksidacijski kapacitet.

Spektrofotometrijskim mjerenjem utvrđeno je da najraniji stadij (razvijene samo kotiledone) i dva najkasnija stadija (razvijeno šest, odnosno deset listova) imaju znatno veću količinu ukupnih fenola u odnosu na stadije kada pekinški kupus ima razvijene kotiledone i dva lista (stadij 2) ili četiri lista (stadij 3) (Sl. 9). Pretpostavljam da biljka u najranijem stadiju razvoja, kada ima samo kotiledone, sintetizira veću količinu ukupnih fenolnih spojeva (poznatih antioksidansa) zbog potrebe za dodatnom zaštitom od potencijalnog oksidativnog stresa kojemu može biti izložena tijekom intenzivnog rasta (Kaciene i sur. 2015). Tijekom prijelaza iz stadija kotiledona u stadij s pravim listovima (u ovom slučaju stadiji 2 i 3) biljka vjerojatno veći dio energije usmjeri u biosintetske puteve primarnih metabolita koji su joj nužni za razvoj prvih pravih listova. Nakon razvoja prva četiri prava lista količina ukupnih fenolnih spojeva u biljci ponovno značajno poraste vjerojatno zbog potrebe zaštite biljke od okolišnog stresa kao što su UV-zrake kojima je zbog svoje veće površine više izložena. U literaturi je do sada zabilježena količina ukupnih fenola u stadiju s razvijenim kotiledonima pekinškog kupusa

(Šamec i sur. 2018), što odgovara stadiju 1 u sklopu ovog diplomskog rada, i zabilježene vrijednosti su vrlo slične (1,54 mg ekvivalenata galne kiseline (EGK)/g svježe mase u uzorcima iz ovog rada i 13,20 mg EGK/g suhe mase u uzorcima iz rada Šamec i sur.). Navedeno ide u prilog točnosti podataka. Također, Seong i sur. (2015) su zabilježili veću količinu ukupnih fenola u vanjskim (starijim) listovima tehnološki zrelog pekinškog kupusa, što se poklapa s mojim rezultatom u sklopu ovog diplomskog rada.

Količina ukupnih hidroksicimetnih kiselina nije se znatno razlikovala među testiranim stadijima, izuzev stadija 2 u odnosu na stadije 1 i 4 koji su značajno statistički veći vjerojatno jer se, iz već spomenutog razloga, dio energije tijekom razvoja prvih pravih listova (stadij 2) koristi za sintezu primarnih metabolita (Sl. 10). Sličan odnos između stadija uočen je i za ukupne flavonole (Sl. 11), tijekom razvoja prvih pravih listova (stadij 2) znatno je niža koncentracija ovih spojeva u odnosu na stadij 1 (samo kotiledone) i stadije sa šest ili deset listova (stadiji 4 i 5).

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC; eng. *high performance liquid chromatography*) razdvojila sam, identificirala i kvantificirala dominantne fenolne kiseline, koje su u slučaju pekinškog kupusa sinapinska i ferulična, te flavonoide kempferol, kvercetin i izoramnetin (Sl. 14, Sl. 13, Sl. 16, Sl. 15, Sl. 17). U stadiju 1 količinski značajno dominiraju kempferol i sinapinska kiselina ($p \leq 0,05$), u ostalim stadijima prevladava kempferol. Izoramnetin je najslabije zastupljen spoj u prva tri razvojna stadija, dok su u stadiju 4 izoramnetin i sinapinska kiselina najslabije zastupljeni, a u zadnjem stadiju sinapinska kiselina bilježi najnižu koncentraciju (Sl. 18 B).

Trend promjene količine identificiranih hidroksicimetnih kiselina, ferulične i sinapinske, je u slučaju različitih razvojnih stadija pekinškog kupusa bio suprotan; sinapinska kiselina je najzastupljenija u stadiju 1, među ostalim stadijima nisam uočila razliku u koncentraciji (Sl. 13), a ferulična kiselina je upravo obrnuto – najvećom koncentracijom zastupljena u stadijima 4 i 5, u prva tri stadija joj se koncentracije međusobno ne razlikuju (Sl. 14). Na temelju ovog rezultata zaključujem da ove dvije hidroksicimetne kiseline, gledano s razvojnog aspekta, pekinški kupus sintetizira i/ili koristi obrnuto proporcionalno. Analogan rezultat dobili su i Seong i sur. (2015) analizirajući sadržaj ovih kiselina u unutarnjim, središnjim i vanjskim listovima pekinškog kupusa u odraslom (tehnološki zreлом) stadiju, naime zabilježili su najveću koncentraciju sinapinske kiseline u unutrašnjim (najmlađim) listovima, a feruličnu samo u vanjskim (najstarijim) listovima. Povećanje koncentracije ferulične kiseline zabilježene u stadijima 4 i 5 objašnjavam činjenicom da je ova kiselina prekursor koniferilnog alkohola, monomera lignina koji osigurava čvrstoću stanične stijenke i cijele biljke, a što biljka

ima više listova (veću površinu) potrebna joj je i veća količina lignina za učvršćivanje stijenki (Carnachan 2000). Promjene u količini pojedinačnih fenolnih spojeva klijanaca breze ovisno o starosti klijanaca istražila je Keski-Saari (2005); slično mojim rezultatima, uočila je značajne razlike među razvojnim stadijima iste vrste, kao i da su te promjene specifične za biljnu vrstu. Koncentracija sinapinske kiseline bila je između 60 mg/kg (središnji listovi) i 80 mg/kg (unutrašnji listovi) suhe mase, što je, uz pretpostavku da je udio spoja u alikvotu suhe mase otprilike 10 puta veći u odnosu na isti alikvot svježije mase, slično udjelima koje sam ja zabilježila u stadijima 2, 3, 4 i 5, međutim znatno manje nego u stadiju 1, tj. kotiledonima.

Rochfort i sur. (2006) su zabilježili udjele kvercetina, kempferola i izoramnetina u listovima kineske raštike (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* L. (Hanelt.)) 70 dana od dana sijanja sjemenki, međutim taj razvojni stadij je neusporediv s onima koje sam ja istraživala u sklopu ovog diplomskog rada pa ne mogu uspoređivati rezultate. Ova grupa autora predložila je nezrele listove kineske raštike kao potencijalno važan izvor kempferola i izoramnetina; u tom kontekstu ja bih kotiledone kineskog kupusa predložila kao dobar izvor sinapinske kiseline. S obzirom da je za sinapinsku kiselinu dokazano selektivno anksiolitičko djelovanje (Chen 2016), konzumacija pekinškog kupusa u stadiju s kotiledonima potencijalno bi mogla pomoći ljudima s problemom anksioznosti.

Što se tiče antioksidacijskog kapaciteta pekinškog kupusa, pretpostavila sam da će se značajno razlikovati između odabranih razvojnih stadija, što su rezultati metoda ABTS i FRAP i potvrdili. Objema metodama zabilježen je znatno manji antioksidacijski kapacitet stadija 2 i 3 u odnosu na stadije 1, 4 i 5 ($p \leq 005$) (Sl. 19 i Sl. 21). Štoviše, metodom ABTS utvrđeno je da stadij 2 ima manji kapacitet i od stadija 3 (Sl. 19). Ovakvi rezultati su u skladu s odnosom količine fenolnih spojeva koje sam zabilježila u testiranim stadijima. Očekivala sam da će stadiji s najmanjom količinom ukupnih fenolnih spojeva (stadij 2 i 3) ujedno pokazati i najmanji antioksidacijski kapacitet s obzirom da su fenolni spojevi glavni antioksidansi biljaka. Pozitivnu korelaciju antioksidacijskog kapaciteta i sadržaja fenolnih spojeva, kao značajnih antioksidansa, zabilježili su i Seong i sur. (2015) kod listova zrelog pekinškog kupusa. Zanimljivo je primijetiti da metodama ABTS i FRAP između najranijeg stadija kada su razvijene samo kotiledone i kasnijih stadija kada biljka ima šest ili deset pravih listova nije zabilježena značajna razlika u antioksidacijskom kapacitetu (Sl. 19 i Sl. 21). Ovaj rezultat ukazuje na to da u slučaju potrebe za određenom antioksidacijskom aktivnosti (u ovom slučaju otprilike 30% inhibicije ABTS⁺ radikala i 87% redukcije Fe³⁺-TPTZ radikala), nije nužno uzgajati pekinški kupus do stadija od šest ili deset listova, već se istu može postići korištenjem kupusa u stadiju samo s kotiledonima, što uvelike skraćuje vrijeme uzgoja, smanjuje količinu

potrebnog supstrata i vode za navodnjavanje pa je u konačnici ekonomičniji postupak. S obzirom na količinu pojedinačnih identificiranih fenolnih spojeva, pretpostavljam da sličnom antioksidacijskom kapacitetu stadija 1, 4 i 5 doprinosi znatno veća koncentracija sinapinske kiseline u stadiju 1, te veće koncentracije kempferola i ferulične kiseline u stadijima 4 i 5.

DPPH metodom nisam utvrdila statistički značajne razlike između testiranih stadija (Sl. 20) pa zaključujem da su za ovaj biljni materijal ABTS i FRAP metoda prikladnije. Floegel i sur. (2011) su također zaključili da je, za analizu biljnih uzoraka koji sadrže hidrofilne i lipofilne antioksidanse te pigmente, ABTS metoda osjetljivija od metode DPPH. Prednost metode ABTS jest što je ABTS topljiv i u vodenom i u organskom mediju, pa se test može koristiti za određivanje i hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa. Također, test je jednostavan i omogućuje testiranje u širokom rasponu pH (Ozgen i sur. 2006). Nedostatci su to što metoda određuje samo reaktivnost prema radikalu $ABTS^+$, a ne inhibiciju oksidativnog procesa. Također, neki polifenolni spojevi sporo reagiraju s radikalom $ABTS^+$, pa mjerenje može biti vremenski dugotrajno. Neki autori kao zamjerku navode i činjenicu da radikal $ABTS^+$ po svojoj strukturi i reaktivnosti nije sličan radikalima koji se pojavljuju u biološkim sustavima (MacDonald-Wicks i sur. 2006). Prednosti metode FRAP su jednostavnost i brzina, a nedostatak ove metode je taj što će svaki spoj, neovisno o tome ima li antioksidacijsku sposobnost ili ne, a posjeduje niži standardni potencijal od redoks-para (Fe^{3+} -TPTZ)/(Fe^{2+} -TPTZ), rezultirati redukcijom kompleksa i tako povećati FRAP vrijednost uzorka, tj. dat će lažno veće rezultate (Rayan i sur. 2010). Prednosti metode DPPH su njena jednostavnost i brzina, a nedostaci topljivost radikala DPPH samo u organskim otapalima, pa je test ograničene primjenjivosti pri određivanju hidrofilnih antioksidansa. Također, apsorbancija radikala DPPH pri 517 nm, osim zbog reakcije s antioksidansom, može se smanjivati i zbog utjecaja svjetlosti. Prisutnost vode u otapalu može dovesti do pogrešnih rezultata jer dolazi do agregacije ili koagulacije radikala DPPH, zbog čega postaje teže dostupan za reakciju s antioksidansima (Kedare i Singh 2011).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u sklopu ovog diplomskog rada zaključujem sljedeće:

- 1) stadiji 1 (kotiledone), 4 (šest pravih listova) i 5 (deset pravih listova) sadrže značajno veće količine ukupnih fenola u odnosu na stadije 2 (kotiledone i dva prava lista) i 3 (četiri lista), te najveće koncentracije ukupnih flavonola, pri čemu su one značajno veće samo u odnosu na koncentraciju u stadiju 2
- 2) stadiji 1 i 4 imaju najveće koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina, pri čemu su one značajno veće samo u odnosu na koncentraciju u stadiju 2
- 3) najveće koncentracije kvercetina zabilježene su također u stadijima 1 i 4, pri čemu se stadij 5 značajno ne razlikuje od stadija 4
- 4) najveća koncentracija kempferola zabilježena je u stadiju 4
- 5) stadiji 4 i 5 imaju značajno veću koncentraciju ferulične kiseline i izoramnetina od stadija 1, 2 i 3
- 6) u stadiju 1 količinski značajno dominiraju kempferol i sinapinska kiselina, u ostalim stadijima prevladava kempferol
- 7) od stadija 1 prema stadiju 5 omjer kvercetina i izoramnetina se smanjuje
- 8) trend promjene količine identificiranih hidroksicimetnih kiselina, ferulične i sinapinske, je u slučaju različitih razvojnih stadija pekinškog kupusa bio suprotan: sinapinska kiselina je bila najzastupljenija u stadiju 1, a ferulična kiselina je upravo obrnuto – najvećom koncentracijom zastupljena u stadijima 4 i 5
- 9) stadiji 1, 4 i 5 pokazali su značajno veći antioksidacijski kapacitet (izmjeren ABTS i FRAP metodama) od stadija 2 i 3. Uz to, ABTS i FRAP metodom između stadija 1 kada su razvijene samo kotiledone i stadija 4 i 5 kada biljka ima šest ili deset pravih listova nije zabilježena značajna razlika u antioksidacijskom kapacitetu
- 10) s obzirom na rezultate, zaključujem da u sklopu ovog diplomskog rada testirani stadiji 1, 4 i 5 imaju veću koncentraciju fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet od stadija 2 i 3, te bi ih se stoga moglo predložiti za daljnje istraživanje potencijala u prehrambenoj industriji.

S obzirom na manjak informacija u dostupnoj literaturi, fenolni profil i antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa bi trebalo istražiti u svim razvojnim stadijima, do pune tehnološke zrelosti biljke, kako bi se utvrdilo koji od stadija s obzirom na navedene parametre bi mogao poslužiti za daljnja istraživanja potencijalne primjene u prehrambenoj industriji, a ovaj diplomski rad može biti doprinos tim daljnjim istraživanjima.

7. LITERATURA

Abdull Razis A. F. i Mohd Noor N. (2013): Cruciferous vegetables: dietary phytochemicals for cancer prevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **3**: 1565-1570.

Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattinim M. (2012): Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*. **196**: 67-76.

Ahuja I., Rohloff J. i Bones A. M. (2010): Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. **30**: 311–348.

Akula R. i Ravishankar G. A. (2011): Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. **6**: 1720-1731.

Alok S., Jain S. K., Verma A., Kumar M., Mahor A. i Sabharwal M. (2014): Herbal antioxidant in clinical practice: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **1**: 78–84.

Ayaz F. A., Hayırlıoglu-Ayaz S., Alpay-Karaoglu S., Gruz J., Valentova´ K., Ulrichova´ J. i Strnad M. (2008): Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*. **107**: 19–25.

Baenas N., Moreno D. A. i García-Viguera C. (2012): Selecting sprouts of Brassicaceae for optimum phytochemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45**: 11409–11420.

Bennett R. N. i Wallsgrove R. M. (1994): Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. **127**: 617-633.

Benzie I. F. F, Strain J. J. (1999): Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. **299**: 15-27.

Björkman M., Klingen I., Birch A. N. D., Bones A. M., Bruce T. J., Johansen T. J., Meadow R., Mølmann J., Seljåsen R., Smart L. E., Stewart D. (2011): Phytochemicals of *Brassicaceae* in plant protection and human health-influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*. **7**: 538-56.

Bourgau F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. **161**: 839-851.

Bravo L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. **11**: 317-33.

Caristi C., Bellocco E., Panzera V., Toscano G., Vadalaá R i Leuzzi U. (2003): Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from Sicilian cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 3528–3534.

Carnachan S. M i Harris P. J. (2000): Ferulic acid is bound to the primary cell walls of all gymnosperm families. *Biochemical Systematics and Ecology*. **28**: 865-879.

Cartea M. E., Francisco M., Soengas P. i Velasco P. (2011): Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*. **16**: 251-280.

Chen C. (2016): Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **4**: 1-10.

Cheyrier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V. i Martens S. (2013): Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology Biochemistry*. **72**: 1-20.

Davies K. M. (2000): Plant colour and fragrance U: Verpoorte R. i Alfermann A. W. (ur.) *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Dordrecht / Boston / London. Kluwer Academic Publishers, str. 127-153.

Dixon R. A. i Paiva N. L. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. **7**: 1085–1097.

Dos Reis L. C., de Oliveira V. R., Kienzle Hagen M. E., Jablonski A., Flôres S. H. i de Oliveira R. A. (2015): Effect of cooking on the concentration of bioactive compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. Alphina F1) grown in an organic system. *Food Chemistry*. **172**: 770–777.

Falcone Ferreyra M. L., Rius S. P. i Casati P. (2012): Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*. **3**: 1-15.

Fernandes F., Valentão P., Carla Sousa C., Pereira J. A, Seabra R. M., Andrade P. B. (2007): Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* L.). *Food Chemistry*. **105**: 1003-1010.

Floegel A., Kim D-O., Chung S-J., Koo S. I., Chun O. K. (2011): Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. **24**: 1043-1048.

Francisco M., Moreno D. A., Cartea M. E., Ferreres F., García-Viguera C. i Velasco P. (2009): Simultaneous identification of glucosinolates and phenolic compounds in a representative collection of vegetable *Brassica rapa*. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 6611–6619.

Germanò M. P., Pasquale R. D., D'Angelo V., Catania S., Silvari V., Costa C. (2002): Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **50**: 1168-1171.

Giuliani C., Bucci I., Di Santo S., Rossi C., Grassadonia A., Piantelli M., Monaco F., Napolitano G. (2014): The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function. *Food Chemistry*. **66**: 23–29.

Harborne J. B. (1989): General procedures and measurement of total phenolics. U: Dey P. M. i Harborne J. B. (ur.) *Methods in plant biochemistry*. Plant phenolics. London, San Diego. Academic Press, str 1-29.

Herrmann K. (1989): Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **4**: 315-347.

Howard L. R., Clar J. R., Brownmiller C. (2003): Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **83**: 1238-1247.

Jung H-J., Manoharan R. K., Park J-I., Chung M-Y., Lee J., Lim Y-P., Hur Y. i Nou I-S. (2014): Identification of yellow pigmentation genes in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* using Br300 microarray. *International Journal of Genomics*. **2014**: ID 204969. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/204969>.

Jurišić M. (2015): AgBase – Priručnik za uzgoj bilja IV. Opća načela i agrotehnika (tehnologija) organskog uzgoja bilja – povrća. Dostupno na: http://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase_4/HTML/index.html.

Kacienė G., Žaltauskaitė J., Milčė E. i Juknys R. (2015): Role of oxidative stress on growth responses of spring barley exposed to different environmental stressors. *Journal of Plant Ecology*. **8**: 605–616.

Kedare S. B. i Singh R. P. (2011): Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. **4**: 412-22.

Keski-saari S., Falck M., Heinonen J. i Julkunen-Tiitto R. (2007): Phenolics during early development of *Betula pubescens* seedlings: Inhibition of phenylalanine ammonia lyase. *Trees*. **3**: 263-272.

Kirkegaard J. A. i Sarwar M. (1998): Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil*. **1**: 71–89.

Koch M. i Mummenhoff K. (2006): Evolution and phylogeny of the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution*. **259**: 81-83.

Krishnaiah D., Sarbatly R. i Nithyanandam R. (2011): A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. **89**: 217-233.

Kuhn B. M., Geisler M., Bigler L. i Ringli C. (2011): Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **2**: 585–595.

Kumar S. i Pandey A. K. (2013): Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. **2013**: ID 162750. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.

Lattanzio V. (2013): Phenolic compounds: introduction. U: Ramawat K. G., Mérillon J-M (ur.) *Natural products. Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag, str 1543-1580.

Leopold A. C. (1964): Growth. U: Leopold (ur.) *Plant growth and development*. New York, San Francisco, Toronto, London. McGraw-Hill Publications, str. 79-80.

Leopold A. C. (1964): Development. U: Leopold (ur.) Plant growth and development. New York, San Francisco, Toronto, London. McGraw-Hill Publications, str. 185-270.

Lešić R., Borošić J., Buturac I., Ćustić M., Poljak M. i Romić D. (2002): Povrčarstvo. Zrinski d.d. Čakovec.

Lin L-Z. i Harnly J. M. (2010): Phenolic component profiles of Mustard Greens, Yu Choy, and 15 other Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 6850–6857.

Lobo V., Patil A., Phatak A. i Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. **8**: 118–126.

MacDonald-Wicks L. K., Wood L. G. i Garg M. L. (2006): Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**: 2046-2056.

Markham K. R. (1989): Flavones, flavonols and their glycosides. U: Dey, P. M. i Harborne, J. B. (ur.) *Methods in plant biochemistry. Plant phenolics*. London, San Diego. Academic Press, str 197-237.

Nićiforović, N. i Abramović, H (2014): Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **13**: 34-51.

Orhan D. D., Özçelik B., Özgen S., Ergun F. (2010): Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*. **165**: 496-504.

Ough C. S. i Amerine M. A. (1988): Phenolic compounds. U: Ough C. S. i Amerine M. A. (ur.) *Methods for analysis of musts and wines*. New York, Jon Wiley & Sons Inc., str 203-221.

Ozgen M., Reese R. N., Tulio A. Z., Scheerens J. C. i Miller R. (2006): Modified ABTS method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 1151-1157.

Parađiković N. (2009): Opće i specijalno povrčarstvo. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Osijek.

Park J. Y., Koo D. H., Hong C. P., Lee S. J., Jeon J. W., Lee S. H., Yun P. Y., Park B. S., Kim H. R., Bang J. W., Plaha P., Bancroft I., Lim Y. P. (2005): Physical mapping and microsynteny of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* genome corresponding to a 222 kbp gene-rich region of *Arabidopsis* chromosome 4 and partially duplicated on chromosome 5. *Molecular Genetics and Genomics*. **274**: 579–588.

Pavlović I. (2017): Uloga auksina i hormona stresa u odgovoru kupusnjača (Brassicaceae) na povišeni salinitet. Doktorska disertacija. Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti. Osijek.

Pereira D. M., Valentão P., Pereira J. A. i Andrade, P. B. (2009): Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*. **6**: 2202-2211.

- Petropoulos S. A., Fernandes A., Vasileios A., Ntatsi G., Barros L. i Ferreira I. C. F. R. (2018): Chemical composition and antioxidant activity of *Cichorium spinosum* L. leaves in relation to developmental stage. *Food Chemistry*. **239**: 946-952.
- Petrussa E., Braidot E., Zancani E., Peresson C., Bertolini A., Patui S. i Vianello A. (2013): Plant flavonoids – biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**: 14950-14973.
- Pevalek-Kozlina B. (2003): Površinska zaštita i obrambene tvari. U Pevalek-Kozlina B. (ur.) *Fiziologija bilja*. Zagreb, Kaptol. Profil International, str 470-485.
- Rakers C., Schwerdtfeger S. M., Mortier J., Duwe S., Wolff T., Wolber G., Melzig M. F. (2014): Inhibitory potency of flavonoid derivatives on influenza virus neuraminidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **17**: 4312-4317.
- Rayan G., Guet J-E., Taulier N., Pincet F. i Urbach W. (2010): Recent applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules. *Sensors*. **6**: 5927–5948.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. i Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**: 1231-1237.
- Reis Giada, M. L. (2013): Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. U: Morales-Gonzales (ur.) *Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants*. Intech, str 87-112.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. i Paganga G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. **7**: 933-956.
- Rochfort S. J., Imsic M., Jones R., Trennery V. C. i Tomkins B. (2006): Characterization of flavonol conjugates in immature leaves of Pak Choi [*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* L. (Hanelt.)] by HPLC-DAD and LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 4855-4860.
- Romani A., Vignolini P., Isolani L., Ieri F. i Heimler D. (2006): HPLC-DAD/MS characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in Turnip Tops (*Brassica rapa* L. Subsp. *sylvestris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 1342-1346.
- Royston K. J. i Tollefsbol T. O. (2015): The epigenetic impact of Cruciferous vegetables on cancer prevention. *Current Pharmacology Reports*. **1**: 46–51.
- Scalbert A. i Williamson G. (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. **8**: 2073-2085.
- Schmidt S., Zietz M., Schreiner M., Rohn S., Kroh L. W. i Krumbein A. (2010): Identification of complex, naturally occurring flavonoid glycosides in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) by high-performance liquid chromatography diode-array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **24**: 2009–2022.

Seong G. U., Hwang I. W. i Chung S. K. (2015): Antioxidant capacities and polyphenolics of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) leaves. *Food Chemistry*. **199**: 612-618.

Sisein E. A. (2014): Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences* **2**: 110-118.

Soory M. (2009): Relevance of nutritional antioxidants in metabolic syndrome, ageing and cancer: potential for therapeutic targeting. *Infectious Disorders-Drug Targets*. **4**: 400-414.

Šamec D., Pavlović I., Radojčić Redovniković I. i Salopek-Sondi B. (2018): Comparative analysis of phytochemicals and activity of endogenous enzymes associated with their stability, bioavailability and food quality in five Brassicaceae sprouts. *Food Chemistry*. **269**: 96-102.

Taiyan Z., Lianli L., Guang Y. i Al-Shehbaz I. A. (2001): Brassicaceae (Cruciferae). *Flora of China*. **8**: 1–193.

Van Poppel G., Verhoeven D. T. H., Verhagen H. i Goldbohm R. A. (1999): Brassica vegetables and cancer prevention. *Advances in Nutrition and Cancer* **2**. **472**: 159-168.

Van Sumere, C. F. (1989): Phenols and phenolic acids U: Dey P. M. i Harborne J. B. (ur.) *Methods in plant biochemistry. Plant phenolics*. London, San Diego. Academic Press, str 30-68.

Velasco P., Francisco M., Moreno D. A., Ferreres F., García-Viguera C. i Carrea M. E. (2011): Phytochemical fingerprinting of vegetable *Brassica oleracea* and *Brassica napus* by simultaneous identification of glucosinolates and phenolics. *Phytochemical Analysis*. **2**: 144-152.

Verpoorte R. (2000): Secondary metabolism. U: Verpoorte, R. i Alfermann, A. W. (ur.) *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Dordrecht / Boston / London. Kluwer Academic Publishers, str 1-23.

Von Elbe J. H. i Schwartz S. J. (1996): Flavonoids and other phenols. Colorants. U: Fennema O.R. (ur.): *Food chemistry*. Third edition. New York, Basel, Hong Kong. Marcel Dekker Inc., str 681-697.

Vukobratović M. (2009): *Osnove metabolizma biljaka*. Visoko gospodarsko Učilište u Križevcima. Križevci.

Wang X. i sur. (2011): The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*. **2011**: 1035-1039.

Warwick S. I., Ardath F. i Al-Shehbaz I. A. (2006): Brassicaceae: species checklist and database on CD-Rom; *Plant Systematics and Evolution*. **259**: 249–258.

Zhishen J., Mengcheng T. i Jianming W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. **64**: 555-559.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 25. 9. 1986. godine. Nakon završene Gornjogradske opće gimnazije 2005. godine upisala sam preddiplomski studij Hortikulture na Agronomskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon završetka preddiplomskog, na istoj ustanovi upisala sam diplomski studij Hortikulture – usmjerenje Ukrasno bilje koji sam završila 2012. godine obranom diplomskog rada na temu 'Ekstrakcija eteričnog ulja iz lavandina Budrovka (*Lavandula x hybrida* 'Budrovka')'. Za postignuti uspjeh tijekom studija dodijeljena mi je pohvalnica *Diploma Cum Laude*. Godine 2014. upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije modul Botanika na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija odslušala sam i položila četiri dodatna kolegija na Agronomskom i jedan na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U okviru europskog projekta EU project 692249 – MendTeGap – Horizon2020 u terminu od 13 – 17. 06. 2016. na Korčuli sam uspješno pohađala Arheobotaničku radionicu, te 12. i 13. 06. 2017. radionicu „Arheobotanika (determinacija drva) & Integracija genetike i arheobotanike“. Tijekom cijelog svog studiranja kontinuirano sam obavljala razne studentske poslove radi stjecanja novih znanja, vještina i radnih navika. Napredno se koristim engleskim jezikom, računalom i Microsoft Office paketom.