

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta i udjela šećera u češnjaku

Kovačević, Tvrtko Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:845537>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2021.

Tvrtko Karlo Kovačević

**ODREĐIVANJE
ANTIOKSIDACIJSKOG
KAPACITETA I UDJELA ŠEĆERA
U ČEŠNJAKU**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirjane Hruškar (Prehrambeno–biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za fenotipizaciju Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču pod komentorstvom dr. sc. Nikole Majora, znan. sur., te uz pomoć asistentice Ive Bažon, mag. ing. agr.

ZAHVALA

Neizmjerno sam zahvalan mentorici prof. dr. sc. Mirjani Hruškar na ukazanome povjerenju, suradnji, uloženoj vremenu te što me ohrabrila za izradu rada u instituciji u kojoj sam tijekom izrade istog pronašao svoj poziv.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Nikoli Majoru na beskrajnom strpljenju, na prenesenom znanju i vještinama, podršci te pomoći tijekom izrade ovoga rada.

Također, hvala izv. prof. dr. sc. Marini Krpan na motivacijskim razgovorima i hvala prof. dr. sc. Zvonimiru Šataliću na razumijevanju i uzastopno pruženim prilikama.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama što su mi pružili nezaboravne studentske dane uz koje je ovaj studij prebrzo završio.

Hvala obitelji, a najviše bratu, tati i mojoj Rei na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju i podršci koju su mi pružali tijekom cjelokupnog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA I UDJELA ŠEĆERA U ČEŠNJAKU

Tvrtko Karlo Kovačević, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058204386

Sažetak: Češnjak je vrlo pogodan za istraživanja jer se razmnožava nespolno, odnosno radi se o klonovima. Unatoč navedenom, među njima postoji razlika u sastavu i količini antioksidansa i šećera. Antioksidansi su od velike važnosti u prehrani ljudi jer reduciraju slobodne radikale i prihvaćaju nesparene elektrone te na taj način čuvaju sastavne dijelove stanica poput lipida i DNK. Kako bi se doznalo koje namirnice imaju više ili manje antioksidansa te samim time veći ili manji učinak na zdravlje potrebno odrediti udio antioksidansa te njihov kapacitet. Za analizu je prikupljeno 77 ekotipova češnjaka s područja Republike Hrvatske kao i izvan njenih granica. Šećeri imaju važnu ulogu u staničnim funkcijama kao što je pohranjivanje energije te su od interesa istraživačima, pogotovo inulin koji se nalazi u malom broju biljaka, pri čemu je češnjak jedan od njih. Detekcija i kvantifikacija šećera u uzorcima češnjaka provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

Ključne riječi: *antioksidacijski kapacitet, češnjak, ekotip, HPLC, šećeri*

Rad sadrži: 53 stranice, 21 sliku, 11 tablica, 144 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Hruškar

Komentor: dr. sc. Nikola Major, znan. sur., Institut za poljoprivredu i turizam

Pomoć pri izradi: Iva Bažon, mag.ing.agr., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Marina Krpan (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mirjana Hruškar (mentor)
3. dr. sc. Nikola Major, znan. sur. IPTPO (član)
4. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (zamjenski član)

Datum obrane: 2. studenog 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND SUGAR CONTENT IN GARLIC

Tvrtno Karlo Kovačević, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058204386

Abstract: Garlic is suitable for research because it breeds in ex situ, that is, they are clones. Despite the above, among them there is a difference in the composition and amount of antioxidants and sugars. Antioxidants are of great importance in human nutrition because they preserve the constituent parts of cells such as lipids and DNA. To find out which foods have more or less antioxidants and therefore a greater or lesser effect on health, it is necessary to determine the proportion of antioxidants and their capacity. For the analysis, 77 garlic ecotypes from the Republic of Croatia were collected as well as outside its borders. Sugars play an important role in cellular functions such as energy storage and are of interest to researchers, especially inulin found in a small number of plants, where garlic is one of them. Sugar detection and quantification in garlic samples was carried out using high-performance liquid chromatography.

Keywords: *antioxidant capacity, ecotype, garlic, HPLC, sugars*

Thesis contains: 53 pages, 21 figures, 11 tables, 144 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Mirjana Hruškar, PhD, Full professor

Co-mentor: Nikola Major, Research Associate, Institute for Agriculture and Tourism

Technical support and assistance: Iva Bažon, assistant

Reviewers:

1. Marina Krpan, PhD, Associate professor
2. Mirjana Hruškar, PhD, Full professor
3. Nikola Major, PhD, Research Associate
4. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: November 2nd, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ČEŠNJAK	2
2.1.1. Opća morfologija i povijest	2
2.1.2. Karakteristike češnjaka	2
2.1.3. Allicin	3
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI	4
2.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET	6
2.4. MJERENJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA	7
2.4.1. Diferencijacija HAT i ET mehanizma	7
2.4.2. Određivanje ukupnih fenola	9
2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	10
2.4.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	11
2.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)	13
2.5.1. Sastavni dijelovi HPLC uređaja	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI I METODE	17
3.1.1. Kemikalije	17
3.1.2. Korišteni uređaji	18
3.1.3. Uzorci	19
3.2. PRIPREMA EKSTRAKTA UZORKA ZA ODREĐIVANJE	20
3.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA	20
3.3.1. Priprema reagensa i standardnih otopina za analizu	20
3.3.2. Postupak određivanja ukupnih fenolnih spojeva	20
3.3.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za određivanje ukupnih fenolnih spojeva	21
3.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM	22
3.4.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu	22
3.4.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	22
3.4.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za DPPH metodu	22
3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA FRAP METODOM	23
3.5.1. Priprema kemikalija i reagensa	23
3.5.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	24
3.5.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu	24
3.6. ODREĐIVANJE ŠEĆERA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)	25

3.6.1.	Priprema uzoraka.....	25
3.6.2.	Priprema standarda za određivanje šećera.....	25
3.6.3.	Postupak određivanja šećera HPLC uređajem.....	25
3.7.	OBRADA PODATAKA.....	27
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1.	ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA	28
4.2.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM	31
4.3.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA FRAP METODOM	33
4.4.	ODREĐIVANJE ŠEĆERA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI	39
5.	ZAKLJUČAK.....	48
6.	LITERATURA	49

1. UVOD

Češnjak je jedan od začina koji se koristi još od vremena prije Krista. Kroz povijest uz njega su bile vezane brojne legende, ali isto tako brojne istine koje su se tek mnogo godina kasnije dokazale. U svim legendama ima malo istine. Pa tako se češnjak nije koristio samo kao začim, već je imao i veliku ulogu u tadašnjoj medicini. Brojni zapisi pokazuju da je bio kultiviran prije više od 4000 godina te da je bio raširen po tada poznatom svijetu iako potječe iz Srednje Azije. Brojne stare civilizacije poput drevnih Egipćana, starih Grka i Rimljana rano su otkrile pozitivno djelovanje češnjaka na ljude (Block, 2010). Razvojem tehnologije i znanosti, brojni znanstvenici su korak po korak istraživali češnjak i njegova djelovanja na čovjeka pri čemu su otkrivene brojne istine njegova moćnog djelovanja.

Zbog spoznaje o sastavu češnjaka na molekularnoj razini danas nam je jasno da on djeluje antibakterijski, antifungalno, antimikrobno te da djeluje kao antioksidans. Brojne tvari koje nazivamo antioksidansima su zapravo biološki aktivne tvari koje same po sebi nemaju nutritivnu vrijednost, u hrani se nalaze u malim količinama, no zbog svoje strukture imaju korisnu ulogu u očuvanju zdravlja i prevenciji bolesti (Miller i sur., 2000). To su spojevi koji su takve strukture da mogu hvatati slobodne radikale, stvarati kelate s metalima, inhibirati daljnje stvaranje štetnih reaktivnih vrsta spojeva koje oštećuju brojne strukture u organizmu na molekularnoj razini, aktivirati antioksidacijske enzime i inhibirati oksidaze (Kazazić, 2004). Jedna od najraširenijih skupina antioksidansa su fenolni spojevi kojih ima nekoliko tisuća te mogu biti jednostavne strukture ili mogu biti visoko polimerizirani spojevi, uvriježenom podjelom po značajnosti u ljudskoj prehrani dijelimo ih na fenolne kiseline, flavonoide i tanine. (Bravo, 1998; Balasundram i sur., 2006).

Prvi cilj ovoga rada bio je odrediti količinu ukupnih fenolnih spojeva te odrediti antioksidacijski kapacitet pomoću FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda na različitim ekotipovima češnjaka sakupljenih iz raznih dijelova svijeta. Drugi cilj rada bio je odrediti i kvantificirati sadržaj šećera u uzorcima češnjaka koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *HPLC – High Performance Liquid Chromatography*).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ČEŠNJAK

2.1.1. Opća morfologija i povijest

Allium sativum L., nama više poznat kao češnjak je višegodišnja cvjetnica koja raste iz lukovice. Ima visoku, uspravnu cvjetnu stabljiku koja može narasti do 1 metra. List mu je ravan, čvrst i širok između 1,25 centimetra i 2.5 centimetra s oštrim vrhom. Lukovica je mirisna i sadrži vanjske slojeve tankih omotanih listova koji okružuju unutarnju ovojnica koja okružuje češnjave. Lukovica prosječno sadrži između 10 i 20 češnjeva koji su asimetričnog oblika, osim onih najbližih središtu (WHO, 2005).

Češnjak se uzgaja najmanje pet tisuća godina te vrlo vjerojatno potječe iz Srednje Azije otkuda se dalje širi prema zapadu, jugu i istoku. Block (2010) navodi da je češnjak bio poznat starim Indijcima, Kinezima, no isto tako starim Grcima i Rimljanima. Postoje dokazi o njegovoj upotrebi na području Egipta i Mediterana koji datiraju iz vremena prije Krista (Block, 2010). Danas, češnjak je nakon luka (*Allium cepa* L.), najkultiviranija vrsta iz porodice *Alliaceae* te se uzgaja u cijelom svijetu. Azija je glavno područje proizvodnje, gdje je Kina najveći proizvođač, zauzimajući preko tri četvrtine ukupne svjetske proizvodnje. Iako je češnjak nesporno razmnožena kultura odnosno razmnožava se isključivo vegetativnim putem, s vremenom utvrđena je raznolikost velikih razmjera između različitih ekotipova u raznim područjima uzgoja. Različiti ekotipovi pokazuju veliku morfološku raznolikost u veličini lukovice i lista, boji i obliku, prisutnosti stapke i njene visine te boji cvijeta i plodnosti (Wang i sur., 2014). Osim morfoloških razlika, daljnjim promatranjima mogu se uvidjeti i biokemijske razlike među ekotipovima (Baghalian i sur., 2005). Značajan utjecaj na prinos, mineralni sastav i kvalitetu lukovice češnjaka imaju fizikalna i kemijska svojstva tla kao i mikroklimatske osobitosti lokacije, uz sortiment i tehnologiju uzgoja. Češnjak je vrlo adaptabilna biljka koja se je prilagodila uzgoju u različitim pedološko-klimatskim uvjetima, iako ekotipovi imaju razmjerno slabu adaptabilnost u novim proizvodnim područjima (Dumičić i sur., 2012).

2.1.2. Karakteristike češnjaka

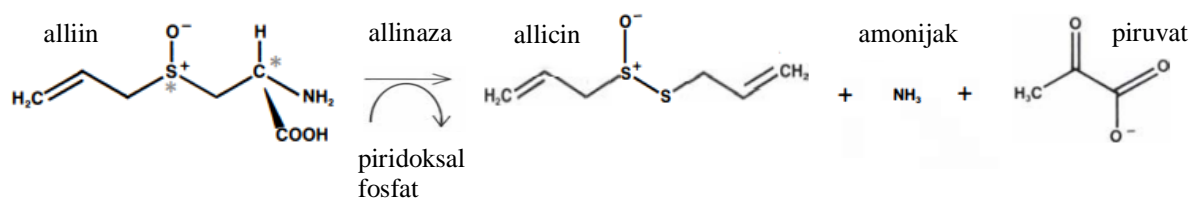
Češnjak je jedan od najvažnijih lukovica te se koristi kao začim i aroma za hranu. U kućanstvu se rabi svjež ili osušen, kao pasta ili ekstrakt. Kulinarstvo se ne bi moglo ni zamisliti bez ovog aromatičnog začina ljutog okusa i intenzivna mirisa (Dumičić i sur., 2015). Proizvodi od češnjaka su veoma popularni posljednjih godina, te su raznovrsni kulinarski i farmaceutski pripravci dostupni na tržištu (Baghalian i sur., 2005).

Češnjak se uzgaja i zbog svojih ljekovitih svojstava i taj se aspekt stalno povećava u svijetu. Dumičić i suradnici (2012) navode kako su od davnina poznata češnjakova ljekovita svojstva: antibakterijsko, antivirusno, antifungalno, antioksidacijsko. Ljekovita svojstva češnjaka opisali su još Hipokrat i Galen, a pripisivana su mu blagotvorna svojstva u liječenju respiratornih problema, loše probave i poboljšanju općeg stanja organizma (Dumičić i sur., 2015). Danas nam je još poznato da pomaže pri snižavanju ukupnog kolesterola u plazmi, krvnog tlaka te smanjenju agregacije trombocita (Baghalian i sur., 2005), a Wang i suradnici (2014) k tome još nadodaju da pomaže u borbi protiv ateroskleroze, taloženja masti te kod neravnoteže lipoproteina.

Nadalje, znanstveno je dokazano da češnjak sadrži pregršt ljekovitih tvari zbog kojih se smatra jednom od najboljih namirnica u prevenciji nastajanja različitih bolesti. Naime, češnjak sadrži više od 200 biološki aktivnih tvari, uključujući vitamine, minerale, aminokiseline i enzime. Osim navedenog, iznimno je bogat manganom, selenom, fosforom, vitaminom C i vitaminom B6, navode Dumičić i suradnici (2015). Eterična ulja sadrže spojeve sa sumporom koji doprinose specifičnom mirisu češnjaka, posebice spoj allicin, a fenolni spojevi utječu na okus i aromu te imaju veliku antioksidacijsku aktivnost koja doprinosi očuvanju zdravlja (Dumičić i sur., 2015).

2.1.3. Allicin

Sastojci češnjaka podijeljeni su u dvije glavne skupine: spojevi koji sadrže sumpor i spojevi koji ne sadrže sumpor. Većina ljekovitih učinaka češnjaka vezani su za spoj koji sadrži sumpor poznat kao allicin koji je po svojoj strukturi tioester sulfenske kiseline (Schulz i sur., 2004). Uz brojne fenolne spojeve, flavonoide i druge tvari koje imaju ulogu antioksidansa, allicin se pokazao kao najvažniji sastavni dio češnjaka koji je korišten u ljudi, životinja i biljaka za borbu protiv bolesti, navode Tucak i suradnici (2009). Dakle, sadržaj allicina bilo bi najvažnije svojstvo kvalitete češnjaka. Količina allicina u češnjaku vrlo je promjenjiva zbog agronomskih parametara i genetskih čimbenika (Wang i sur., 2014). Netaknuti češanj češnjaka ne sadrži allicin, već njegov prekursor, ne-proteinsku aminokiselinu alliin koja je jedna od rijetkih bioloških molekula koja ima 2 kiralna centra, jedan na sumporu, a drugi na ugljiku (Block, 2010). Ako dođe do mehaničkog oštećenja lukovice aktivira se metabolički put razgradnje allina.



Slika 1. Reakcija pretvorbe alliina u allicin (prema Block, 2010)

Slika 1 predstavlja kemijsku reakciju razgradnje alliina u allicin, piruvat i amonijak kataliziranu enzimom allinaza. Allinaza kao kofaktor sadrži piridoksal fosfat koji unutar enzima djeluje tako da omogućuje stvaranje enzim – supstrat kompleksa pomoću elektrostatskih interakcija. Sama reakcija nije direktna, već se alliin razgrađuje na alilsulfensku kiselinu, pri čemu se dvije molekule alilsulfenske kiseline na sobnoj temperaturi kondenziraju u allicin u svega nekoliko sekundi. Međutim pri sobnoj temperaturi te uz prisustvo zraka i vode allicin se razgrađuje u roku od dva dana pri čemu nastaju dialil sulfidi, dialil disulfidi i dialil trisulfidi koji su također odgovorni za češnjakov specifičan miris (Suciu i sur., 2016). Do navedene reakcije nastanka allicina dolazi jedino kada se češnjak prereže ili zdrobi odnosno u slučaju mehaničkog djelovanja (Baghalian i sur., 2005). Upravo allicin koji je nastao kao posljedica takvog djelovanja zapravo daje miris i okus češnjaka koji je svima dobro poznat. Smatra se kako se reakcija pretvorbe alliina u allicin razvila kao obrambeni mehanizam češnjaka kako bi se biljka branila od kukaca i životinja (Macpherson i sur., 2005).

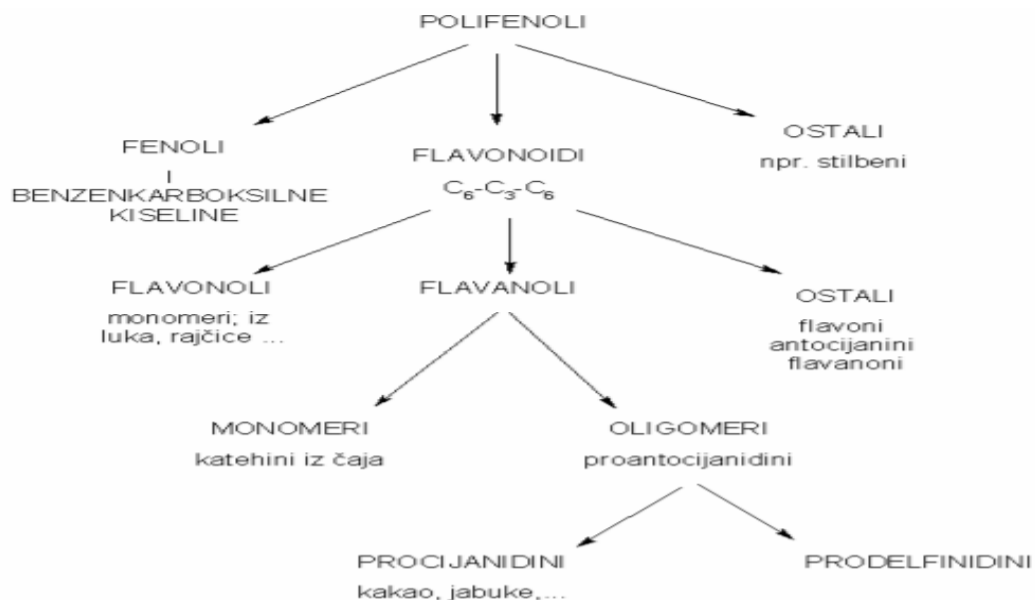
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenoli su jedni od najbrojnijih skupina biljnih metabolita te predstavljaju integralni dio u ljudskoj i životinjskoj prehrani. U navedenu skupinu spadaju spojevi širokog raspona molekulskih masa, od jednostavnih fenolnih spojeva poput fenolnih kiselina do visoko polimeriziranih spojeva s molekulskom masom većom od 30.000 Daltona (Block, 2010).

Pojava ove složene skupine tvari u biljnoj hrani izrazito varira od biljke do biljke. Za sada, čovjek je spoznao preko 8000 različitih struktura fenolnih spojeva (Bravo, 1998). Polifenoli su produkti sekundarnog metabolizma biljaka koji sadrže aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (-OH), navode Croteau i suradnici (2000).

Moguće je vezanje i drugih spojeva poput karboksilnih i organskih kiselina, amina, lipida, čak i drugih fenola na hidroksilne skupine. Stoga se u prirodi nalaze u konjugiranom obliku (Bravo, 1998).

Iako navedena strukturna raznolikost rezultira u širokim rasponom fenolnih spojeva koji se javljaju u prirodi, fenolni spojevi se u osnovi mogu kategorizirati na nekoliko načina. Balasundram i suradnici (2006) navode da se fenolni spojevi mogu svrstati u tri skupine; fenolne kiseline, flavonoidi i tanini. Svrstani su na ovaj način jer se te tri skupine smatraju glavnim nutritivnim fenolnim spojevima. Fenolne kiseline se potom mogu podijeliti na dvije podskupine, a to su derivati hidroksicimetne kiseline i na derivate hidroksibenzojeve kiseline (Balasundram i sur., 2006). Preko pola poznatih struktura fenolnih spojeva pripada skupini flavonoida, čineći ih najvećom skupinom fenolnih spojeva. Struktura im se uglavnom sastoji od dva aromatska prstena povezana heterocikličkim prstenom. Različiti supstituenti na aromatskim prstenima rezultiraju nastankom različitih podskupina flavonoida od čega najčešći i strukturno najrazličitiji su flavoni i flavonoli (Balasundram i sur., 2006). Zadnju skupinu čine tanini koji imaju relativno veliku molekulsku masu te ih se može podijeliti na hidrolizirane i kondenzirane tanine. Hidrolizirani tanini su u principu esteri galne kiseline, dok kondenzirani, još poznati kao proantocijanidini, jesu polimeri polihidroksiflavan-3-ol monomera, navode Balasundram i suradnici (2006).



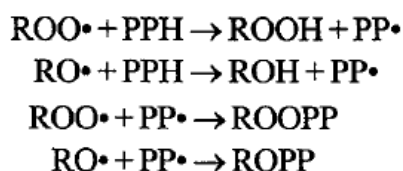
Slika 2. Podjela polifenola po njihovoj strukturi (prema Berend i Grabarić, 2008)

Prema Katalinić i suradnicima (2010) polifenoli su podijeljeni na temelju njihovih kemijskih struktura na flavonoide i neflavonoide pri čemu u neflavonoide spadaju fenolne kiseline, stilbeni i lignani, a u flavonoide već spomenuti flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni i antocijani (slika 2).

2.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Djilas i suradnici (2002) definiraju antioksidanse kao spojeve koji pri niskim koncentracijama sprječavaju oksidaciju supstrata poput npr. proteina, enzima, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata, lipida. Do oksidacije supstrata dolazi od strane slobodnih radikala koje Cheeseman i Slater (1993) definiraju kao svaku molekulu koja ima sposobnost nezavisnog postojanja u obliku u kojem ima jedan nesporeni elektron u orbitali. Upravo prisutnost tog nesporenog elektrona u orbitali jest zajednička značajka koju svi radikali dijele. Mnogi radikali su nestabilni i vrlo reaktivni te kao takvi mogu primati ili davati elektron tj. biti elektron akceptori ili elektron donori navode Cheeseman i Slater (1993). Iz navedenog se zaključuje da se antioksidacijski učinak spoja očituje u sposobnosti stabilizacije slobodnih radikala i sprječavanju lančanih reakcija radikala s drugim molekulama u reaktivnom mediju.

Slika 3 prikazuje način djelovanja antioksidansa na radikale. Radikali se stabiliziraju delokalizacijom nesporenog elektrona stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza jer tada radikal više nema dovoljno energije za oksidacijske reakcije (Kazazić, 2004).



Slika 3. Interakcija antioksidansa i slobodnih radikala (*prema Bravo, 1998*)

Nedavno zanimanje za fenole u hrani povećano je zahvaljujući njihovoj ulozi antioksidansa. Antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva je prisutno zbog njihove sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, pri čemu struktura fenolnih spojeva jest ključna odrednica njihovog antioksidacijskog djelovanja i sposobnosti tvorbe kelata. Taj odnos je još naziva i odnos strukture i aktivnosti (Bravo, 1998).

Osim zbog svoje strukture, fenolni spojevi imaju svojstvo hvatanja slobodnih radikala odnosno reaktivnih kisikovih oblika zbog toga što je redukcijski potencijal fenolnog radikala niži od redukcijskog potencijala reaktivnog kisikovog oblika (Mathew i sur., 2015) i zato što su fenoksi radikali općenito manje reaktivni od kisikovih radikala (Bors i sur., 1994).

Nadalje, fenoli pokazuju i antioksidacijska svojstva kroz stvaranje kelata tj. kroz vezanje dvovalentnih iona željeza, bakra, cinka i magnezija te aktiviranje antioksidacijskih enzima, navodi Kazazić (2004), ali i kroz inhibiciju enzima poput lipooksigenaza, ciklooksigenaza, monoooksigenaza, protein kinaza i drugih Cao i sur., (1997). S obzirom na to da u biološkim sustavima, reaktivni dušikovi i kisikovi oblici oštećuju molekule poput DNK te uzorkuju oksidaciju proteina i lipida, Xu i sur., (2017), smatraju da je važnost unosa antioksidansa hranom i više nego očita.

Izvori slobodnih radikala u ljudskom organizmu se prema Lobo i suradnicima (2010) mogu podijeliti na one slobodne radikale koji nastaju endogeno tj. u organizmu i na one kojih slobodne radikale koji dopijevaju u organizam iz okoliša odnosno vanjskih izvora. Primjeri nekih izvora slobodnih radikala u organizmu su: ksantin oksidaza, peroksisomi, upale, fagocitoza, tjelovježba. Primjeri nekih vanjskih izvora slobodnih radikala su: dim cigarete, zagađivači okoliša, ionizacijsko zračenje, pesticidi, industrijska otapala i ozon.

2.4. MJERENJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

2.4.1. Diferencijacija HAT i ET mehanizma

Na temelju kemijskih reakcija koje se odvijaju, analize antioksidacijskog kapaciteta mogu se podijeliti u dvije kategorije (Huang i sur., 2005)

- reakcije na bazi prijenosa atoma vodika (HAT; eng. *Hydrogen Atom Transfer*)
- reakcije na bazi prijenosa jednog elektrona (ET/SET; eng. *Electron Transfer / Single Electron Transfer*)

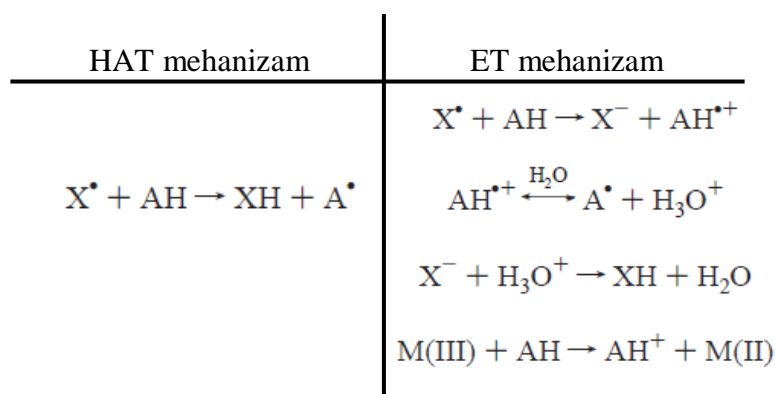
Analize bazirane na prijenosu jednog elektrona (ET) uključuju redoks reakciju s oksidansom kao pokazateljem krajnje točke reakcije. Metode temeljene na prijenosu protona (HAT) općenito se sastoje od sintetičkog generatora slobodnih radikala, oksidirajuće molekularne sonde i antioksidansa. Analize na bazi jednog i drugog mehanizma djelovanja su u principu namijenjene mjerenju kapaciteta za čišćenje radikala (ili oksidansa), umjesto preventivnog antioksidacijskog kapaciteta uzorka, navode Huang i suradnici (2005). Kao što je prije navedeno, antioksidansi mogu deaktivirati radikale s dva glavna mehanizma, HAT i ET.

Konačni rezultat je isti, bez obzira na mehanizam, ali kinetika i potencijal za nuspojave se razlikuju, navode Prior i suradnici (2005). Prijenos elektrona popraćen prijenosom protona i HAT reakcije mogu se pojaviti paralelno, a mehanizam koji dominira u određenom sustavu bit će određen strukturom antioksidansa i njegovim svojstvima, topljivošću te otapalom u sustavu. Energija disocijacije veze i ionizacijski potencijal dva su glavna čimbenika koji određuju mehanizam i učinkovitost antioksidanata (Llano i sur., 2019). Prior i suradnici (2005) navode da je potreban protokol koji uključuje mjerenje više od jednog svojstva jer polifenoli imaju više aktivnosti, a dominantna aktivnost će ovisiti o mediju i supstratu ispitivanja. Metode temeljene na HAT mehanizmu mjere klasičnu sposobnost antioksidansa da ugasi slobodne radikale donacijom vodika (Prior i sur., 2005). Stoga mnogi znanstvenici smatraju da upravo taj mehanizam onaj najrelevantniji za reakcije u kojima antioksidansi obično djeluju. Relativna reaktivnost u HAT metodama određena je energijom disocijacije veze skupine koja donira proton potencijalnom antioksidansu. Antioksidacijska reaktivnost temelji se na kinetici kompeticije (Llano i sur., 2019). HAT reakcije su neovisne o otapalu i pH te su obično vrlo brze, obično se odvijaju u sekundama ili minutama. Prisutnost redukcijskih sredstava, uključujući metale, predstavlja komplikacije u HAT analizama i može dovesti do pogrešno visoke prividne reaktivnosti, navode Prior i suradnici (2005).

Metode temeljene na ET mehanizmu otkrivaju sposobnost potencijalnog antioksidansa da prenese jedan elektron kako bi se reducirao bilo koji spoj, uključujući metale, karbonile i radikale, navode Llano i suradnici (2019). Slika 4 prikazuje ET i HAT mehanizme djelovanja antioksidansa koji se gotovo uvijek zajedno odvijaju u svim uzorcima, a ravnoteža će biti određena strukturom antioksidansa i pH. Relativna reaktivnost u ET metodama temelji se prvenstveno na deprotonaciji i ionizacijskom potencijalu reaktivne funkcionalne skupine, tako da ET reakcije ovise o pH vrijednosti, navode Prior i suradnici (2005).

Općenito, vrijednosti ionizacijskog potencijala se smanjuju s povećanjem pH vrijednosti, odražavajući povećani kapacitet elektron donacije s deprotonacijom (Shang i sur., 2019) ET reakcije su obično spore i mogu zahtijevati puno vremena za dovršiti, a izračuni antioksidacijskog kapaciteta temelje na postotnom smanjenju produkta, a ne na kinetici reakcije. Prior i suradnici (2005) navode da je važno napomenuti da komponente u tragovima i kontaminanti, osobito metali, ometaju ET metode i mogu biti odgovorni za visoku varijabilnost i slabu ponovljivost te konzistenciju rezultata. Sve metode koje su bile korištene tijekom izrade ovog rada se baziraju na ET mehanizmu, što podrazumijeva da se u sustavu koji se analizira nalaze dvije komponente, oksidans i antioksidans navode Santos-Sánchez i Salas-Coronado (2019).

Oksidans na sebe navlači elektron od antioksidanta što uzrokuje promjenu boje oksidansa. Promjena boje oksidansa je proporcionalna koncentraciji antioksidanta pri čemu se reakcija smatra gotovom kada se boja prestane mijenjati (Santos-Sánchez i Salas-Coronado, 2019). Potom se uradi baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji antioksidanta pri čemu nagib krivulje predstavlja antioksidacijski kapacitet redukcije koji se najčešće izražava kao ekvivalenti Trolox-a (TE) ili kao ekvivalenti galne kiseline (GAE). Kako bi korelacija bila moguća pretpostavlja se da je antioksidacijski kapacitet jednak redukcijskom kapacitetu, navode Huang i suradnici (2005).



Slika 4. Razlika među mehanizmima djelovanja antioksidansa (prema Prior i sur., 2005)

2.4.2. Određivanje ukupnih fenola

TPC (eng. *Total Phenolic Content*) je metoda koja je razvijena 1927. godine te je u početku bila namijenjena analizi proteina, zbog afiniteta Folin-Ciocalteu (FC) reagensa prema tirozinskom ostatku u proteinu zato što tirozin sadrži fenolnu skupinu. Za oksidaciju fenola na tirozinskim ostacima koristi se molibden volframski reagens koji daje obojeni produkt pri valnoj duljini od 745-750 nm. Prednost metode je ta što je jednostavna, osjetljiva i precizna. Međutim, pri kiselom pH reakcija je spora i nedostaje joj specifičnosti. Navedeni problem riješen je korištenjem modificiranog reagensa koji je reducirao fenole puno specifičnije (Prior i sur., 2005). Mnogo godina kasnije Singleton i suradnici proširili su ovu metodu na analizu ukupnih fenola u vinu, a od tada je metoda pronašla puno drugih aplikacija. Također, Singleton i suradnici su nametnuli obvezne korake i uvjete za dobivanje pouzdanih i predvidljivih podataka (Huang i sur., 2005):

- omjer pravilnog volumena alkalnog i F-C reagensa
- optimalno vrijeme reakcije i temperatura za razvoj boje
- upotreba galne kiseline kao referentnog standarda za fenole

Valja pripaziti da ne dođe do kontaminacije reducensa jer navedeno dovodi do zelene boje, ali dodatkom oksidansa kao što je brom može se vratiti željena žuta boja. Reakcijama redukcije jednog ili dva elektrona dolazi do nastanka plavih vrsta, moguće $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}$, navode Huang i suradnici (2005). Također, Huang i suradnici (2005) navode da FC reagens nije štetan za fenolne spojeve jer se može reducirati mnogim ne fenolnim spojevima, poput vitamina C. Disocijacija protona s fenola dovodi do nastanka fenoksid iona kroz ET mehanizam. Plavi spojevi nastali između fenoksid iona i FC reagensa neovisni su o strukturi fenolnih spojeva, stoga isključuju mogućnost koordinacijskih kompleksa nastalih između metalnog središta i fenolnih spojeva (Huang i sur., 2005).

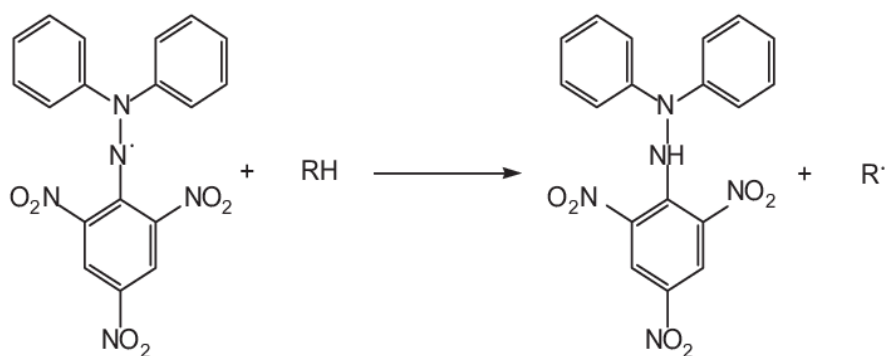
TPC metoda je stekla popularnost i općenito je poznata kao test ukupnih fenola ili fenolnih spojeva. TPC zapravo mjeri reducirajući kapacitet uzorka, ali to se ne odražava u nazivu "test ukupnih fenola". No, uvijek postoje kontroverze oko onoga što se otkriva određivanjem ukupnog antioksidacijskog kapaciteta; samo fenoli ili fenoli plus reducijska sredstva plus eventualno kelati, navode Prior i suradnici (2005). No, unatoč nedefiniranoj kemijskoj prirodi FC reagensa, test ukupnih fenola je zgodan, jednostavan i ponovljiv. Nedostaci ove metode su ti što pati od brojnih smetnji od strane drugih tvari, bile one organskog ili anorganskog porijekla.

2.4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

DPPH odnosno 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, kako prikazuje slika 5, jedan je od rijetkih stabilnih organskih dušikovih radikala. Komercijalno je dostupan te karakteristične duboko ljubičaste boje. Ova metoda se temelji na mjerenju sposobnost redukcije antioksidansa prema DPPH. Literatura navodi da su ovaj široko korišteni kolorimetrijski test prvi izvijestili Brand-Williams i suradnici (1995). Santos-Sánchez i Salas-Coronado, (2019) navode da se antioksidacijska ispitivanja temelje na mjerenju gubitka boje DPPH pri 515 nm nakon 30 minuta reakcije s uzorkom, a reakciju se prati pomoću spektrometra. Postotak preostalog DPPH nakon 30 minuta je proporcionalan koncentraciji antioksidansa te koncentracija antioksidansa koja uzrokuje smanjenje koncentracije DPPH za 50 % je definirana kao EC_{50} . Huang i suradnici (2005) navode da je potrebno definirati još jedan parametar kako bi se izrazio antioksidacijski kapacitet, antiradikalna učinkovitost. Pojam je definiran kao omjer vremena potrebnog da se koncentracija DPPH smanji za 50 % i koncentracije antioksidansa koji uzrokuje to isto smanjenje za 50 %. Rezultati se najčešće prikazuju kao ekvivalenti Trolox-a.

Iako se DPPH metoda obično klasificira kao ET reakcija, ovaj radikal zapravo može biti reduciran ili izravnom redukcijom putem prijenosa elektrona ili prijenosom atoma vodika (Shang i sur., 2019). Mehanizam reakcije je stoga teško interpretirati bez njih detaljnih informacija o sastavu i strukturi antioksidansa koji se testiraju. Tumačenje je posebno teško kada su male molekule reduksijskog agensa, kao što je askorbinska kiselina, prisutni u ekstraktima fenola, navode Prior i suradnici (2005). Premda novija istraživanja pokazuju da se ova metoda bazira na ET mehanizmu, a da mehanizam prijenosa protona je u principu zanemariv jer se ispoljava samo u određenim uvjetima reakcije (Prior i sur., 2005).

Prednost ove metode je što je jednostavna i brza te što je za njeno izvođenje, osim DPPH, potreban samo spektrofotometar (Santos-Sánchez i Salas-Coronado, 2019). Što se tiče nedostataka, ova metoda ima nekoliko značajnih nedostataka naspram drugih metoda. Jedan od nedostataka je to što je DPPH kao molekula istovremeno i radikal i oksidans što znači da do gubitka boje može doći bez djelovanja od neke u potpunosti nepovezane reakcije (Prior i sur., 2005). Nadalje, sterička dostupnost je veliki određujući faktor reakcije. Stoga, manje molekule mogu puno lakše prići mjestu na kojem se nalazi nesparen elektron nego veće molekule što za posljedicu ima da mnogi jaki antioksidansi koji inače brzo reagiraju s peroksil radikalom, s DPPH reagiraju puno sporije ili su čak inertni prema DPPH, navode Prior i suradnici (2005).

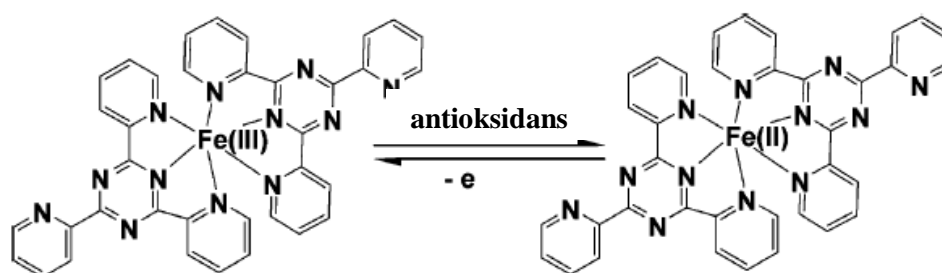


Slika 5. Reakcija redukcije DPPH (prema Dureja i Dhiman, 2012)

2.4.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

FRAP metodu izvorno su razvili Benzie i Strain za mjerenje reduksijske snage u plazmi, ali metoda se naknadno prilagodila za korištenje u svrhu ispitivanja antioksidansa kod botaničkih produkata. Reakcija redukcije željezne soli u potpunosti je bazirana na ET mehanizmu, a očitava se kao promjena boje pri čemu nastaje obojeni produkt (Prior i sur., 2005). Kao oksidans koristi se željezna sol $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$.

Slika 6 prikazuje strukturu i reakciju redukcije TPTZ odnosno 2,4,6-tripiridil-s-triazina. Uz dodatak drugih otopina, poput klorovodične kiseline (HCl), acetatnog pufera i željezovog(III) klorida hidrata u otopinu željezne soli, nastaje otopina koju se naziva FRAP reagens, navode Huang i suradnici (2005). FRAP ispitivanje se provodi na kiselom pH (3,6) radi održavanja topljivosti željeza te se mjeri apsorbancija razvijene boje pri 593 nm (Santos-Sánchez i Salas-Coronado, 2019).



Slika 6. Reakcija redukcije $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (prema Huang i sur., 2005)

Prior i suradnici (2005) navode da je FRAP mehanizam u potpunosti elektronski prijenos, a ne kombinacija ET i HAT mehanizma. Stoga FRAP metoda u tandemu s drugim metodama može biti vrlo korisna u razlikovanju dominantnih mehanizma s različitim antioksidansima. Prior i suradnici (2005) navode kako bi bilo zanimljivo procijeniti jesu li visoke FRAP vrijednosti u korelaciji s tendencijom polifenola da postanu prooksidansi u određenim uvjetima, budući da su reducirani metali aktivni propagatori radikalnih lanaca putem redukcije hidroperoksida. Navedeno je dokazano na nekim flavonima i flavononima koji pokazuju visoke FRAP vrijednosti. Nadalje, iz provedenih istraživanja izgleda da je reduksijska snaga u nekoj mjeri povezana s hidrosilacijom i konjugacijom polifenola, navode Prior i suradnici (2005).

FRAP metoda se oslanja na hipotezu da se redoks reakcije odvijaju tako brzo da su sve reakcije potpune u roku od nekoliko minuta, ali zapravo to nije uvijek istina. Rezultati se mogu uvelike razlikovati ovisno o vremenu provođenja analize, navode Santos-Sánchez i Salas-Coronado (2019). Brzo reagirajući fenoli koji vežu željezo ili se razgrađuju na spojeve s nižom ili različitom reaktivnošću najbolje se analiziraju kratkim vremenima reakcije. Međutim, neki polifenoli reagiraju sporije i zahtijevaju dulje vrijeme reakcije, navode Prior i suradnici (2005). Dakle, krajnja točka apsorbancije u jednoj točki ne predstavlja dovršenu reakciju.

FRAP zapravo mjeri samo sposobnost redukcije na temelju željeznog iona, što nije relevantno za antioksidacijsko djelovanje niti mehanistički niti fiziološki, navode Prior i suradnici (2005). Međutim, za razliku od drugih testova ukupnog antioksidacijskog kapaciteta, FRAP test je jednostavan, brz, jeftin i robustan te ne zahtijeva specijaliziranu opremu (Prior i sur., 2005)

2.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography*) odnosno visoko djelotvorna tekućinska kromatografija je najšire korištena kromatografska metoda te predstavlja suvremenu metodu tekućinske kromatografije. Koristi se kao metoda za razdvajanje i određivanje raznih organskih, anorganskih i bioloških sastojaka iz najkompleksnijih uzoraka, navode Skoog i suradnici (2013). Princip rada HPLC uređaja jest da se u protok mobilne faze injektira mali volumen uzorka te da se sastojci u uzorku, prolaskom kroz kromatografsku kolonu koja je ispunjena česticama stacionarne faze, razdvajaju na temelju specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija, čime posljedično dolazi do različitog vremena zadržavanja sastojaka uzorka na stacionarnoj fazi (Skoog i sur., 2013). HPLC metode se dijele uglavnom po tipu stacionarne faze ili po separacijskom mehanizmu pa stoga od najčešće korištenih razlikujemo kromatografiju normalnih faza, kromatografiju obrnutih faza, ionsku kromatografiju, kromatografiju isključenja, bioafinitetnu kromatografiju (Bansal i sur., 2009). Ovisno o metodi, ako je sastav mobilne faze stalan i ne mijenja se tijekom vremena tada govorimo o izokratnom eluiranju, a ako se sastav mobilne faze mijenja s vremenom tada govorimo o gradijentnom eluiranju. Gradijentno eluiranje daje bolju razlučivost odnosno bolje razdvajanje sastojaka, ali nije primjenjivo na sve uzorke kao što je izokratno eluiranje (Dong, 2006).

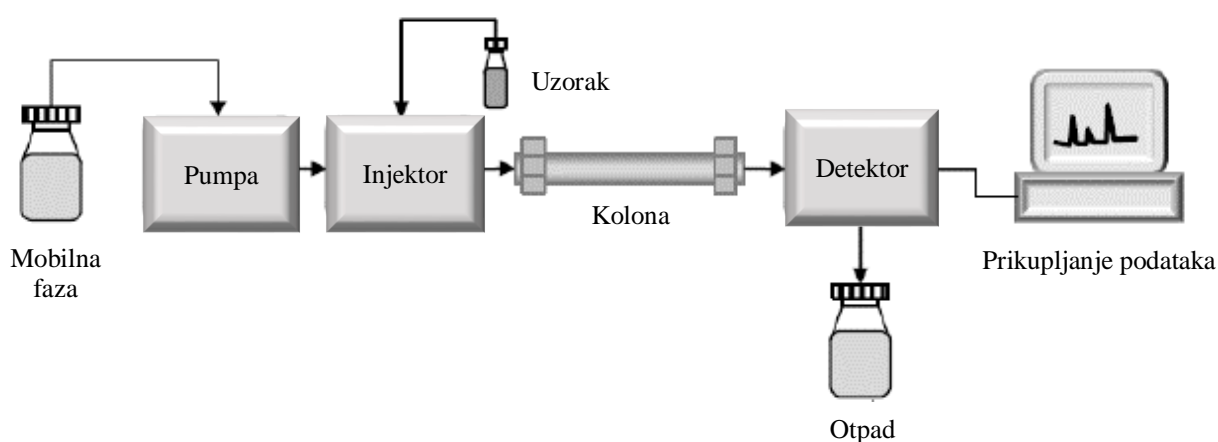
2.5.1. Sastavni dijelovi HPLC uređaja

Sama instrumentacija se sastoji od injektora za unošenje uzorka, pumpe koja omogućuje protok mobilne faze kroz sustav, kolone, pećnice koja omogućuje održavanje definirane temperature analize, spremnika otapala, različitih vrsta detektora te uređaja s programom za obradu dobivenih podataka, kako prikazuje slika 7. Ovo poglavlje će detaljnije objasniti dijelove uređaja, njihovu funkciju te neke bitne karakteristike.

Najčešće korištena metoda uvođenja uzorka u tekućoj kromatografiji temelji se na injektiranju uzorka u petlju (eng. *loop*). Injektor je neizbježan dio aparature, a velika prednost je što se petlja može lako zamijeniti drugom pri čemu se može i birati volumen petlje koji može biti od 1 μL do 100 μL pa i više.

Uz navedeno, danas mnogi HPLC uređaji imaju automatski uzorkivač tj. posebnu izvedbu injektora koji automatski ubrizgava uzorak u petlju i koji može kontinuirano uvoditi promjenjive količine uzorka u sustav, navode Cazes i Ewing (2005).

Pumpe moraju zadovoljiti nekoliko zahtjeva, poput mogućnosti stvaranja tlakova do 400 bara, mogućnost brzine protoka u rasponu od 0,1 do 10 mL/min, otpornost raznih otapala na koroziju. Visoki tlakovi koje stvaraju pumpe ne predstavljaju opasnost od eksplozije jer se tekućine ne mogu jako stlačiti. Dakle, ruptura pumpe rezultira samo istjecanjem otapala, navode Skoog i suradnici (2013).



Slika 7. Osnovni dijelovi HPLC uređaja (prema Czaplicki, 2013)

U HPLC instrumentima koriste se dvije glavne vrste pumpe: tip štrcaljke na vijak i povratna pumpa. Povratni tipovi koriste se u gotovo svim komercijalnim instrumentima. Povratna pumpa se sastoji od male cilindrične komore koja se puni, a zatim prazni pokretom klipa naprijed-natrag.. Pulsiranje protoka ima štetan utjecaj na performanse detektora koji su ovisni o protoku, kao npr. detektor indeksa loma (Ahuja & Dong, 2005). Moderni HPLC instrumenti koriste dvostruke glave pumpe ili eliptične bregove kako bi smanjili pulsiranje. Prednosti povratnih crpki uključuju mali unutarnji volumen, 35 do 400 μL te visoki izlazni tlak do 700 bara i konstantne brzine protoka, koje su uglavnom neovisne o povratnom tlaku klipa i viskoznosti otapala. Moderni HPLC uređaji opremljeni su sustavom za mjerenje brzine protoka određivanjem pada tlaka preko graničnika koji se nalazi na izlazu pumpe. Svaka razlika u signalu od unaprijed postavljene vrijednosti zatim se koristi za povećanje ili smanjenje brzine motora pumpe. Većina instrumenata također ima ventil za promjenu sastava otapala (Skoog i sur., 2013).

Kolone za tekućinsku kromatografiju obično su izrađene od nehrđajućeg čelika, iako se ponekad koriste staklene i polimerne cijevi. Cijena standardnih kolona koje nisu posebne kreću se od 200 dolara pa do više od 500 dolara, dok specijalizirane kolone, kao što su kiralne kolone, mogu koštati i više od 1000 dolara, navode Skoog i suradnici (2013). Većina kolona duljine je od 5 do 25 cm i ima unutarnje promjere od 3 do 5 mm. Valja napomenuti da se uvijek koriste ravne kolone. Kolone su najčešće duge 10 ili 15 cm, unutarnjeg promjera 4,6 mm te su punjene s česticama manjim od 5 mm. Osamdesetih godina prošlog stoljeća su se pojavile mikrokolone s unutarnjim promjerima od 1 do 4,6 mm te duljine od 3 do 7,5 cm. Takve kolone imaju prednost nad prijašnje spomenutim kolonama u smislu brzine protoka otapala te minimalne potrošnje otapala (Ahuja & Dong, 2005).

Valja napomenuti da osim kolona u kojima se odvija sama separacija, postoje i kolone koje se nazivaju predkolonama koje služe kao pomoćno sredstvo za bolju separaciju i dulji vijek trajanja analitičke kolone. Skoog i suradnici (2013) navode da se koriste dvije vrste predkolona. Predkolona koje se stavlja između spremnika mobilne faze i injektora koristi se za kondicioniranje pokretne faze i naziva se kolona za čišćenje. Otapalo djelomično otapa čestice silicijeva dioksida unutar predkolone i time se osigurava da je mobilna faza zasićena silicijskom kiselinom prije ulaska u analitičku kolonu. Zasićenost minimizira gubitke stacionarne faze iz analitičke kolone (Skoog i sur., 2013). Druga vrsta predkolone je zaštitna kolona, smještena između injektora i analitičke kolone. Takva predkolona je kratka i prepuna česticama sličnim čestica stacionarne faze u analitičkoj koloni. Svrha zaštitne kolone je spriječiti da nečistoće, kao što su visoko zadržani spojevi i čestice, dođu do analitičke kolone i kontaminiraju je, navode Capparella i suradnici (1995).

Skoog i suradnici (2013) navode kako danas gotovi svi HPLC uređaji dolaze za ugrađenom kontrolom temperature kolone. Kod nekih analiza temperiranje kolone nije potrebno dok kod nekih to je neizbježan uvjet za kvalitetnu analizu. Međutim, često se bolji kromatogrami dobivaju održavanjem konstantne temperature kolone. Temperatura kolone snažno utječe na retencijsko vrijeme uzoraka i na selektivnost kolone, navode Ahuja i Dong, (2005).

Nadalje, detektor mora biti takve izvedbe da je u skladu s vrstom kromatografije tj. analize koja se izvodi. Dong (2006) navodi da za tekućinsku kromatografiju visokih performansi nije dostupan vrlo osjetljiv sustav univerzalnih detektora kao što je to slučaj kod plinske kromatografije kada se koristi plameno – ionizacijski detektor.

Stoga, korišteni detektor ovisit će o prirodi uzorka. Najčešće korišteni detektori za tekućinsku kromatografiju temelje se na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja, a to su fotometrijski, spektrofotometrijski, fluorescentni detektori i detektor indeksa loma (Skoog i sur., 2013).

Fotometri i spektrofotometri, posebno dizajnirani za uporabu s kromatografskim kolonama, komercijalno su lako dostupni. Fotometri često koriste u području elektromagnetskog zračenja od 254 i 280 nm iz izvora žive jer se mnoge organske funkcionalne skupine apsorbiraju u toj regiji. Spektrofotometrijski detektori znatno su svestraniji od fotometara i također se široko koriste u instrumentima visokih performansi, navode Skoog i suradnici (2013). Princip rada fluorescentnog detektora zasniva se na sposobnosti fluorescentnih sastojaka da emitiraju dio svjetla apsorbiranog od strane izvora ekscitacije i takav detektor je selektivniji u odnosu na spektrofotometrijski. Detekcija indeksa loma temelji se na svojstvu molekule da zakreću ravninu polarizirane svjetlosti. Bitno je napomenuti da se detektor indeksa loma koristi isključivo uz izokratnu eluciju, navode Ahuja i Dong (2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovome radu analizirani su ukupni fenoli, antioksidacijski kapacitet mjeran DPPH i FRAP metodama te sadržaj inulina i saharoze pomoću HPLC metode u 77 ekotipa češnjaka u tri biološka ponavljanja, te su ukupno provedene 924 analize.

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Kemikalije

Za provođenje kemijskih analiza potrebne su kemikalije, koje je potrebno prethodno pripremiti. Popis korištenih kemikalija pri izradi analiza prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Korištene kemikalije

Ime kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Folin-Ciocalteu reagens	<i>pro analysi</i>	Sigma
Galna kiselina	98 %	Acros
Natrijev acetat trihidrat	<i>pro analysi</i>	Lach- Ner
(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (TROLOX)	97 %	Aldrich
2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ)	98 %	Alfa Aesar
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)		Aldrich
Octena kiselina (ledena)	99,5 %	Macron
Metanol (MeOH)	HPLC čistoća	J. T. Baker
Klorovodična kiselina (HCl)	37 %	Carlo Erba
Željezov (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	<i>pro analysi</i>	Kemika
Natrijev karbonat (bezvodni)	<i>pro analysi</i>	Gram-Mol
Inulin	99,5 %	Extrasynthese
D-(+)-Saharoza	99,5 %	VWR
Voda za HPLC	99,5 %	VWR

3.1.2. Korišteni uređaji

Kako bi se mogli pripremiti reagensi, uzorci te u konačnici provesti analize potrebni su uređaji prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Korišteni uređaji

Vrsta uređaja	Proizvođač i model
Analitička vaga	Shimadzu AUW220D
Liofilizator	ScanVac CoolSafe
Mlin	Retsch ZM 200
Tresilica	GFL 3005
Centrifuga	Tehtnica Centric 350
Ultrazvučna kupelj	MRC DCG-250H
Čitač mikrotitarskih pločica	Tecan Infinite M Nano ⁺
HPLC	Shimadzu Nexera

3.1.3. Uzorci

U tablici 3 nalazi se popis svih uzoraka korištenih u ovom istraživanju s pripadajućom internom šifrom i porijeklom.

Tablica 3. Interne šifre ekotipova i područje porijekla

kontinentalna Hrvatska	Dalmacija	Istra	Izvan granica Hrvatske
IPT189	IPT191	IPT010	IPT206
IPT249	IPT192	IPT011	IPT219
IPT250	IPT193	IPT012	IPT220
IPT252	IPT195	IPT013	IPT222
IPT253	IPT196	IPT014	IPT265
IPT254	IPT199	IPT015	IPT283
IPT272	IPT200	IPT016	IPT284
IPT273	IPT204	IPT017	IPT285
IPT308	IPT255	IPT019	IPT287
IPT310	IPT259	IPT020	IPT288
IPT317	IPT260	IPT337	IPT293
IPT360	IPT266	IPT338	IPT296
IPT361	IPT268	IPT340	IPT299
IPT364	IPT269	IPT341	IPT301
/	IPT270	IPT342	IPT302
/	IPT276	IPT343	IPT322
/	IPT306	IPT344	IPT324
/	IPT309	IPT345	IPT326
/	IPT351	IPT346	IPT329
/	/	IPT347	IPT330
/	/	IPT348	IPT339
/	/	IPT349	IPT354

3.2. PRIPREMA EKSTRAKTA UZORKA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

Lukovice češnjaka korištene u ovom istraživanju kultivirane su tijekom 2020. godine na pokusnom imanju Instituta za poljoprivredu i turizam (N 45°13'20.30", E 13°36'6.49") te su dio *ex situ* kolekcije Nacionalnog programa očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj kroz Nacionalnu banku biljnih gena.

Lukovice češnjaka su očišćene od vanjske opne, smrznute u tekućem dušiku (Uljanik tehnički plinovi, d.o.o.) te liofilizirane (ScanVac CoolSafe). Nakon završenog procesa liofilizacije uzorci su samljeveni na veličinu čestica od 0,2 mm (Retsch ZM 200).

Priprema ekstrakta uzorka je rađena prema internoj metodi razvijenoj u laboratoriju. Izvagano je 0,075 g ± 0,001 g prethodno liofiliziranog i samljevenog uzorka češnjaka te je uzorak prenesen u mikro tube od 1,5 mL. Uzorku je zatim dodano 1,5 mL 50 %-tnog metanola u deioniziranoj vodi te je potom uzorak homogeniziran u ultrazvučnoj kupelji kroz 30 minuta s temperaturnim programom od 22 °C. Nakon ultrazvučne kupelji uzorak je miješan na tresilici 30 minuta pri brzini od 225 okretaja u minuti. Nakon tresilice, uzorak je centrifugiran na 17000 G tijekom 5 min. Nakon pripreme ekstrakta uzorci su bili čuvani u zamrzivaču na -80 °C.

3.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA

3.3.1. Priprema reagensa i standardnih otopina za analizu

Metoda je rađena prema metodi koju su objavili Singleton i Rossi (1965) uz modifikacije. Za provedbu analize pripremljena je 6 %-tna otopina (w/v) natrijevog karbonata. Navedena otopina je napravljena u odmjerne tikvici od 1 L otapanjem 60 g bezvodnog natrijevog karbonata u 1 L deionizirane vode. Uz navedenu otopinu, priređena je bila otopina galne kiseline u deioniziranoj vodi, koncentracije 250 µg/mL koja je služila kao matična otopina iz koje se razrjeđenjem napravilo 5 otopina (125; 100; 75; 25; 12,5 µg/mL) koje su se koristile kao standardi za izradu baždarnog dijagrama (Singleton i Rossi, 1965).

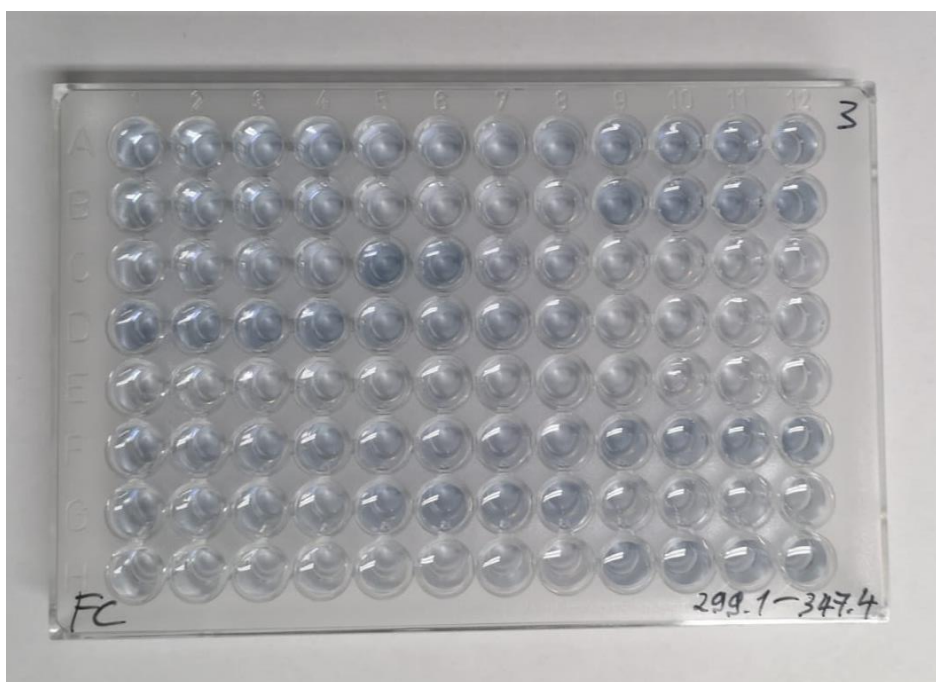
3.3.2. Postupak određivanja ukupnih fenolnih spojeva

Za provedbu analize korištene su jednokratne mikrotitarske pločice čiji volumen jažica iznosi 300 µL. Iz ekstrakta koji se nalazi u mikro tubama, otpipetirano je 10 µL uzorka u odgovarajuću jažicu na mikrotitarskoj ploči. Nakon što su svi uzorci otpipetirani u jažice, u svaku je dodano po 10 µL deionizirane vode. Potom se multikanalnom pipetom u jažice otpipetira 140 µL 0,2M FC reagensa čime započinje reakcija te ista protječe sljedećih 60 minuta.

Nakon jedne minute u jažice se otpipetira multikanalnom pipetom 140 μL prethodno pripremljene otopine 6 % natrijevog karbonata, kako prikazuje slika 8. Nakon isteka 60 minuta, na čitaču pločica se očita apsorbancija pri 750 nm. Sva mjerenja su provedena u 3 repeticije (Singleton i Rossi, 1965).

3.3.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Postupak izrade baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje ukupnih fenola u ekstraktima češnjaka, pri čemu se umjesto uzorka u jažicu pipetira pripremljena otopina standarda. Ukupni volumen reakcije iznosi 300 μL od čega 280 μL otpada na reagens, a preostalih 10 μL na deioniziranu vodu i 10 μL na pripremljeni standard. Umjesto uzorka dodaje se otopina galne kiseline te su mjerenja provedena na 5 različitih koncentracijskih razina u 4 repeticije. Uz očitavanje uzoraka i standarda provodi se i očitavanje slijepe probe koju čine samo reagensi i deionizirana voda (Singleton i Rossi, 1965).



Slika 8. Mikrotitarska pločica s uzorcima i reagensima za određivanje ukupnih fenola
(vlastita fotografija)

3.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM

3.4.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

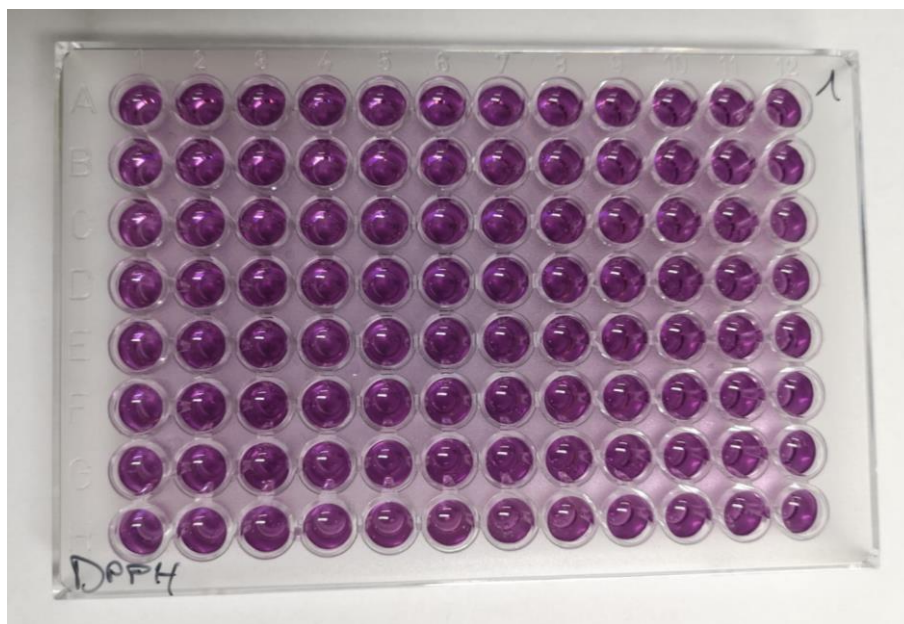
Metoda je rađena prema metodi koju su objavili Brand-Williams i suradnici (1995), uz modifikacije. Za provedbu analize obavezno je pripremljena svježa otopina DPPH reagensa u metanolu, koncentracije 40 µg/mL. Uz otopinu DPPH, napravljena je matična otopine Trolox-a u metanolu koncentracije 100 µmol/L iz koje se pripremi 6 otopina (100; 80; 60; 40; 20; 10 µmol/L) koje su se koristile kao standardi za izradu baždarnog dijagrama (Brand-Williams i sur., 1995).

3.4.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Za provedbu analize potrebne su jednokratne mikrotitarske pločice čiji volumen jažica iznosi 300 µL. Iz ekstrakta koji se nalazi u mikro tubama, otpipetirano je 10 µL uzorka u odgovarajuću jažicu na mikrotitarskoj ploči. U svaku jažicu je zatim otpipetirano 90 µL deionizirane vode. Reakcija se pokreće pipetiranjem pripremljene otopine DPPH slobodnog radikala u volumenu 200 µL te traje 30 minuta (slika 9.). Pločica se čuva na mračnom mjestu te nakon što vrijeme od 30 minuta istekne, na čitaču pločica se očitava apsorbancija pri 517 nm. Sva mjerenja su provedena u 3 repeticije (Brand-Williams i sur., 1995).

3.4.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za DPPH metodu

Postupak izrade baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom u ekstraktima češnjaka, ali se umjesto ekstrakta uzorka pipetira prethodno pripremljena otopina standarda. Ukupni volumen reakcije iznosi 300 µL od čega je 200 µL pripremljena otopina DPPH slobodnog radikala, 90 µL deionizirana voda i 10 µL otopina standarda. Mjerenja su provedena na 6 različitih koncentracijskih razina u 4 repeticije. Uz očitavanje uzoraka i otopina standarda, očitava se i slijepa proba koju čine samo otopina DPPH slobodnog radikala i deionizirana voda (Brand-Williams i sur., 1995).



Slika 9. Mikrotitarska pločica s uzorcima i reagensima za DPPH metodu (*vlastita fotografija*)

3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA FRAP METODOM

3.5.1. Priprema kemikalija i reagensa

Metoda korištena u analizama je rađena prema metodi koju su objavili Benzie i Strain, (1996) uz modifikacije. Za provedbu analize pripremljen je FRAP reagens koji je bio sastavljen bio miješanjem 100 mL acetatnog pufera, 10 mL otopine TPTZ-a otopljenog u 10 mL 40 mM HCl-a i 10 mL otopine željezo(III) klorida heksahidrata (omjer 100:10:10). Uz FRAP reagens, pripremljena je matična otopina Trolox-a u metanolu koncentracije 100 $\mu\text{mol/L}$ iz koje se pripremlilo 6 otopina koncentracije (100; 80; 60; 40; 20; 10 $\mu\text{mol/L}$) koje su se koristile kao standardi za izradu baždarnog dijagrama (Benzie i Strain, 1996).

3.5.2. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Za provedbu analize korištene su jednokratne mikrotitarske pločice čiji volumen jažica iznosi 300 μL . Iz ekstrakta koji se nalazi u mikro tubama, otpipetirano je 10 μL uzorka u odgovarajuću jažicu na mikrotitarskoj ploči. Nakon uzoraka, u jažice je otpipetirano po 90 μL deionizirane vode. Potom je multikanalnom pipetom otpipetirano 200 μL prethodno pripremljenog FRAP reagensa čime je započeta reakcija te se pločica čuva na tamnom mjestu. Nakon isteka 10 minuta na čitaču mikrotitarskih pločica se očitava apsorbancija pri 593 nm (slika 10.). Sva mjerenja su provedena u 3 repeticije (Benzie i Strain, 1996).

3.5.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu

Postupak izrade baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom u ekstraktima češnjaka, s time da se umjesto uzorka u jažicu pipetira otopina standarda. Ukupni volumen reakcije iznosi 300 μL od čega je 200 μL FRAP reagens, 90 μL deionizirana voda i 10 μL pripremljena otopina standarda. Mjerenja su provedena na 6 različitih koncentracijskih razina u 4 repeticije. Uz uzorke i standard, očitava se i slijepa proba koju čine FRAP reagens i deionizirana voda (Benzie i Strain, 1996).



Slika 10. Mikrotitarska pločica s uzorcima i reagensima za FRAP metodu (*vlastita fotografija*)

3.6. ODREĐIVANJE ŠEĆERA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

3.6.1. Priprema uzoraka

Kako bi zaštitili HPLC uređaj od krutih čestica uzorci se filtriraju kroz filter s malom veličinom pora. Metanolni ekstrakt se filtrira pomoću Chromafil Xtra PTFE 45/25 filterskih nastavaka za šprice, s veličinom pora od 45 µm, u HPLC vijale volumena 1,5 mL.

3.6.2. Priprema standarda za određivanje šećera

Matična otopina je pripremljena tako da je u odmjernu tikvicu od 10 mL odvagano 0,2 g saharoze i 0,2 g inulina. Zatim je odmjerna tikvica napunjena do oznake deioniziranom vodom te je provedeno homogeniziranje otopine u ultrazvučnoj kupelji. Za izradu baždarnog dijagrama pripremljene su otopine standarda u osam masenih koncentracija (0,60, 1,00, 1,60, 2,00, 500, 10,00, 15,00, 20,00 g/L)

3.6.3. Postupak određivanja šećera HPLC uređajem

Analiza sadržaja inulina i saharoze provedena je pomoću HPLC sustava koji se sastoji od pumpe (Shimadzu Nexera LC-40DX3, Kyoto, Japan), automatskog uzorkovača (Shimadzu Nexera SIL-40CX3, Kyoto, Japan), pećnice za kolonu (Shimadzu Nexera CTO-40C, Kyoto, Japan) i detektora indeksa loma (Shimadzu RID-20A, Kyoto, Japan), kako prikazuje slika 11. Kromatografska separacija postignuta je ubrizgavanjem 10 µL uzorka na kolonu koja sadrži kalcijeve ione (Repromer Ca Dr. Maisch), veličine 300 × 8 mm, 9 µm veličine čestica, temperiranu na 80 °C koristeći deioniziranu vodu za HPLC kao mobilnu fazu. Protok mobilne faze iznosi 1 mL/min te se sastav mobilne faze nikako ne smije mijenjati jer se za detekciju sastojaka koristi detektor indeksa loma koji za dobivanje valjanih rezultata izričito zahtjeva izokratnu eluciju. Vrijeme elucije uzorka je 15 minuta. Vrijeme retencije i površina ispod pika ispitivanih šećera uspoređeni su s analitičkim standardima za identifikaciju te kvantifikaciju (Major i sur., 2020).



Slika 11. HPLC uređaj i njegovi sastavni dijelovi: A – automatski uzorkivač, B – jedinice za otapala / pumpe, C – pećnica za kolonu, D – detektor indeksa loma, E – upravljačka jedinica
(*vlastita fotografija*)

3.7. OBRADA PODATAKA

Dobiveni eksperimentalni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike, čime je izračunata srednja vrijednost i standardna pogreška, korištenjem programa MS Excel 2019.

Statistički značajne razlike između pojedinih područja porijekla ekotipova češnjaka utvrđene su analizom varijance (ANOVA). ANOVA je vrsta statističke analize kojom se grupe podataka testiraju kako bi se utvrdilo ima li razlike u varijanci između i unutar grupa (Rutherford, 2001).

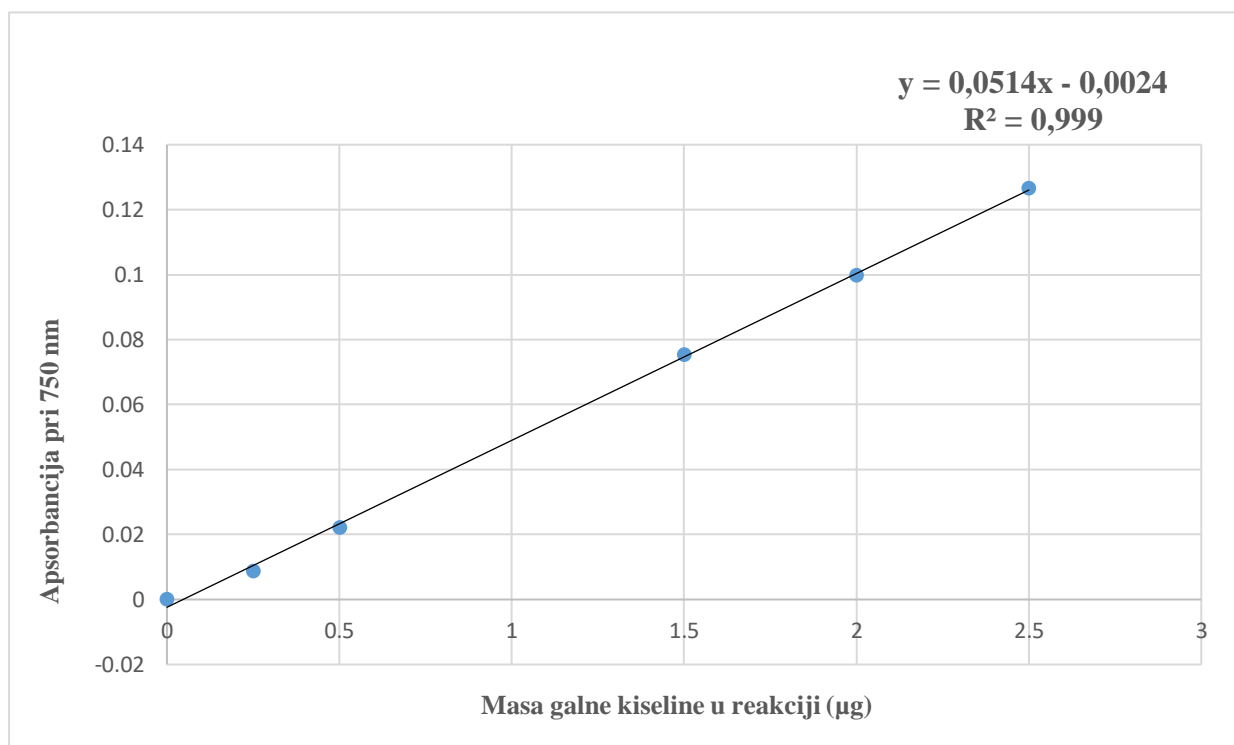
Na rezultatima koji su pokazali statistički značajne razlike među analiziranim grupama proveden je Fischer-ov LSD (eng. *Least Significant Difference*) *post hoc* test. LSD testom utvrđena je najmanja signifikantna razlika između testiranih grupa u udjelu ukupnih fenolnih spojeva, u antioksidacijskom kapacitetu mjerenim FRAP i DPPH metodama, u sadržaju inulina te u sadržaju saharoze. Za ANOVA i Fischer *post hoc* testove korišten je program Statistica 13.4 (TIBCO Inc, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu provedene su analize 77 uzoraka različitih češnjaka koji potječu s 4 različita područja; kontinentalne Hrvatske, Dalmacije, Istre i područja izvan granica Republike Hrvatske. Svaki uzorak češnjaka je rađen u 3 repeticije. Uzorci su pripremljeni tako da su liofilizirani te samljeveni. Na tako pripremljenim uzorcima provedena je ekstrakcija metanolom te daljnje analize koje uključuju određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva, određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću 2 metode, DPPH i FRAP te analiza sadržaja šećera pomoću tekućinske kromatografije visokih performansi. Rezultati provedenih analiza prikazani su tablično.

4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA

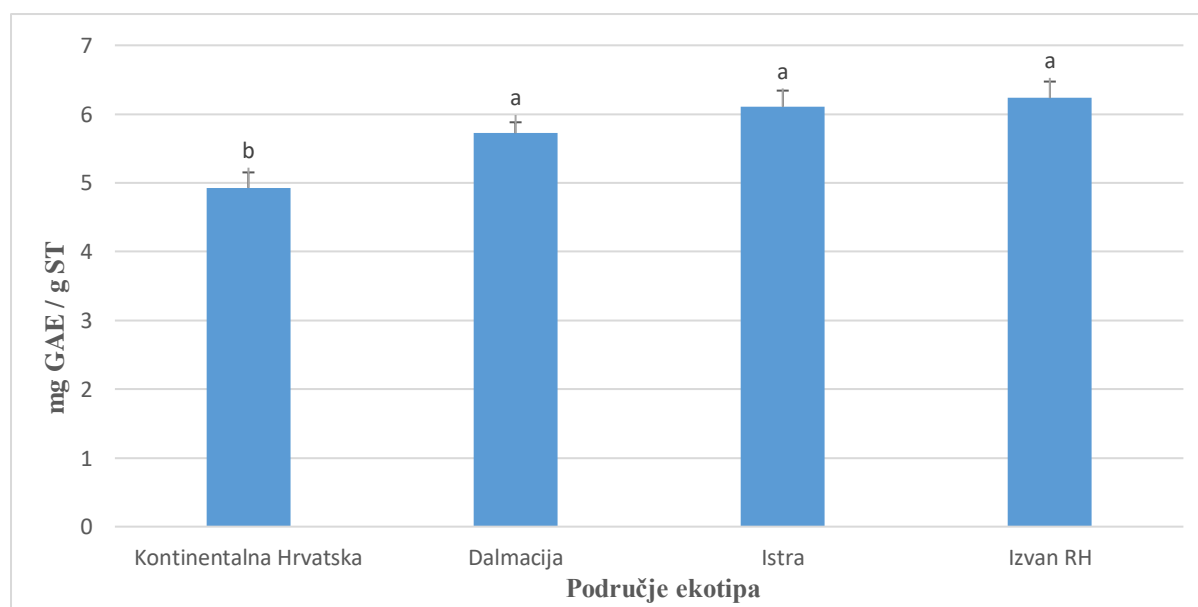
Za prikazivanje rezultata udjela ukupnih fenolnih spojeva korišten je ekvivalent mase galne kiseline na masu od 1 grama suhe tvari uzorka. Slika 12 prikazuje baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o masi galne kiseline koji je korišten za kvantifikaciju udjela ukupnih spojeva u obliku ekvivalenata galne kiseline. Iz prikazane jednadžbe krivulje ($y = 0,0514x - 0,0024$) i koeficijenta determinacije $R^2 \geq 0,999$, vidljivo je kako je baždarna krivulja linearna.



Slika 12. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 750 nm o masi galne kiseline

U ovome je radu istraživano 14 lokalnih ekotipova uzoraka češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske, 19 s područja Dalmacije, 22 ekotipa s područja Istre te 22 ekotipa koji potječu izvan granica Republike Hrvatske. Prema području s kojeg dolaze ekotipovi češnjaka napravljene su tablice koje sadrže podatke provedenih analiza. Tako tablica 4 pokazuje da se sadržaj ukupnih fenolnih spojeva s područja kontinenta kretao između 3,27 mg GAE / g ST u ekotipu IPT250 do 7,01 mg GAE / g ST u ekotipu IPT189 . Kod ekotipova iz Dalmacije, kako predočuje tablica 5, vidljivo je da se sadržaj ukupnih fenolnih spojeva kretao između 3,79 mg GAE / g ST u ekotipu IPT193 do 8,81 mg GAE / g ST u ekotipu IPT309. Također, iz tablice 6, koja se odnosi na ekotipe s područja Istre, vidljivo je kako se sadržaj ukupnih fenolnih spojeva kretao od 3,48 mg GAE / g ST u ekotipu IPT338 pa sve do 11,36 mg GAE / g ST u ekotipu IPT019. Nadalje, iz tablice 7, koja sadrži podatke ekotipova češnjaka koji dolaze izvan granica Republike Hrvatske, vidljivo je kako sadržaj ukupnih fenolnih spojeva varira od 3,24 mg GAE / g ST u ekotipu IPT329 do 10,39 mg GAE / g ST u ekotipu IPT219.

Slika 13 prikazuje kako su u prosjeku ekotipovi češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske imali 4,93 mg GAE / g ST, ekotipovi s područja Dalmacije 5,72 mg GAE / g ST, s područja Istre imali su 6,11 mg GAE / g ST, dok su ekotipovi s područja izvan granica Republike Hrvatske sadržavali 6,23 mg GAE / g ST. Analiza varijance, kako pokazuje slika 13, prikazuje kako ekotipovi s područja kontinentalne Hrvatske imaju značajno niži sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na ekotipove s ostalih područja uključenih u istraživanje.

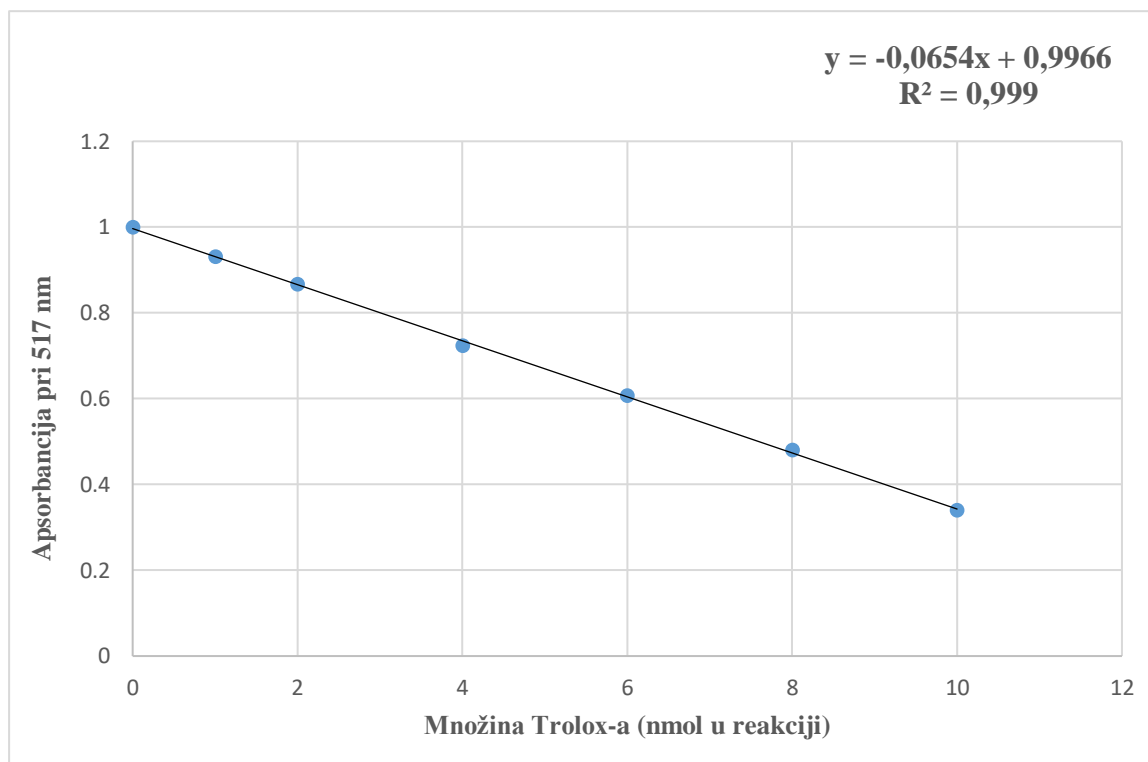


Slika 13. ANOVA test rezultata mjerenja udjela ukupnih fenolnih spojeva

Istraživanjem provedenim u ovome radu, rezultati gledani sveukupno pokazuju kako se sadržaj ukupnih fenolnih spojeva prosječno kretao između 4,93 mg GAE / g ST i 6,23 mg GAE / g suhe tvari (ST), što se slaže s rezultatima istraživanja koje su proveli Beato i suradnici (2011). U njihovim uzorcima, sadržaj ukupnih fenolnih spojeva kretao se između 3,4 mg GAE / g ST i 10,8 mg GAE / g ST, s prosjekom od 6,5 mg GAE / g ST. Naspram istraživanja koje su proveli Nuutila i suradnici (2003) istraživanje u sklopu ovoga rada je dalo značajno veće rezultate za udio ukupnih fenolnih spojeva. Nuutila i suradnici (2003) navode kako se izmjereni udio ukupnih fenolnih spojeva kretao između 0,075 mg GAE / g ST i 0,12 mg GAE / g ST, što je gotovo 5,5 puta manje nego što je izmjereno u ovome istraživanju. Nadalje, prema istraživanjima koje su proveli Queiroz i suradnici (2009) sadržaj ukupnih fenolnih spojeva varirao je između 6,99 mg GAE / g ST i 8,70 mg GAE / g ST što se u potpunosti slaže s rezultatima ovog istraživanja čiji se rezultati, kroz sve primke, kreću od 3,24 mg GAE / g ST do 11,36 mg GAE / g ST. Istraživanje koje su proveli Gorinstein i suradnici (2009) prikazuje rezultate unutar gotovo istih granica. Ispitani uzorci češnjaka pokazali su sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u rangu od 6,36 mg GAE / g ST do 9,00 mg GAE / g ST. Navedeni rezultati se također slažu s rezultatima mjerenja provedenih TPC metodom u sklopu ovog istraživanja.

4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA DPPH METODOM

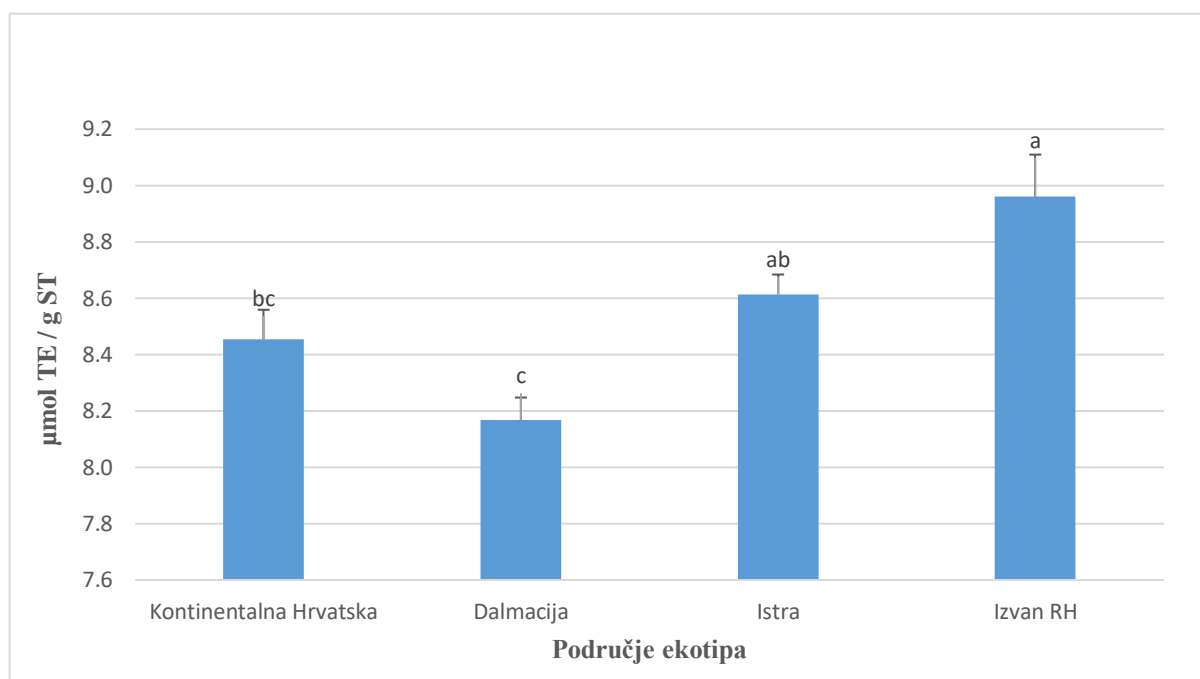
Slika 14 prikazuje dobiveni baždarni dijagram za antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom. Jednadžba pravca ($y = -0,0654x + 0,9966$) i koeficijent determinacije $R^2 \geq 0,999$ upućuju na linearnu ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o množini Trolox-a u reakciji.



Slika 14. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o množini Trolox-a za DPPH metodu

Tablica 4 pokazuje da se antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom, ekotipova s područja kontinenta kretao između 6,25 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT250 do 9,71 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT189. Kod ekotipova iz Dalmacije, kako predočuje tablica 5, vidljivo je da se antioksidacijski kapacitet kretao između 4,24 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT192 do 11,23 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT269. Također, iz tablice 6, koja se odnosi na ekotipe s područja Istre, vidljivo je kako se antioksidacijski kapacitet kretao od 6,48 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT014 pa do 9,77 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT016. Nadalje, iz tablice 7, koja sadrži podatke ekotipova češnjaka koji dolaze izvan granica Republike Hrvatske, vidljivo je kako antioksidacijski kapacitet varira od 6,09 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT284 do 11,40 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT288.

Slika 15 prikazuje kako su u prosjeku ekotipovi češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske imali 8,45 $\mu\text{mol TE / g ST}$, ekotipovi s područja Dalmacije 8,17 $\mu\text{mol TE / g ST}$, s područja Istre imali su 8,61 $\mu\text{mol TE / g ST}$, dok su ekotipovi s područja izvan granica Republike Hrvatske sadržavali 8,96 $\mu\text{mol TE / g ST}$. Analiza varijance (slika 15), prikazuje kako ekotipovi s područja izvan Republike Hrvatske imaju značajno viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na ekotipove s ostalih područja uključenih u istraživanje, dok značajno niži kapacitet pokazuju ekotipovi s područja Dalmacije u odnosu drugih ekotipova uključenih u istraživanje.

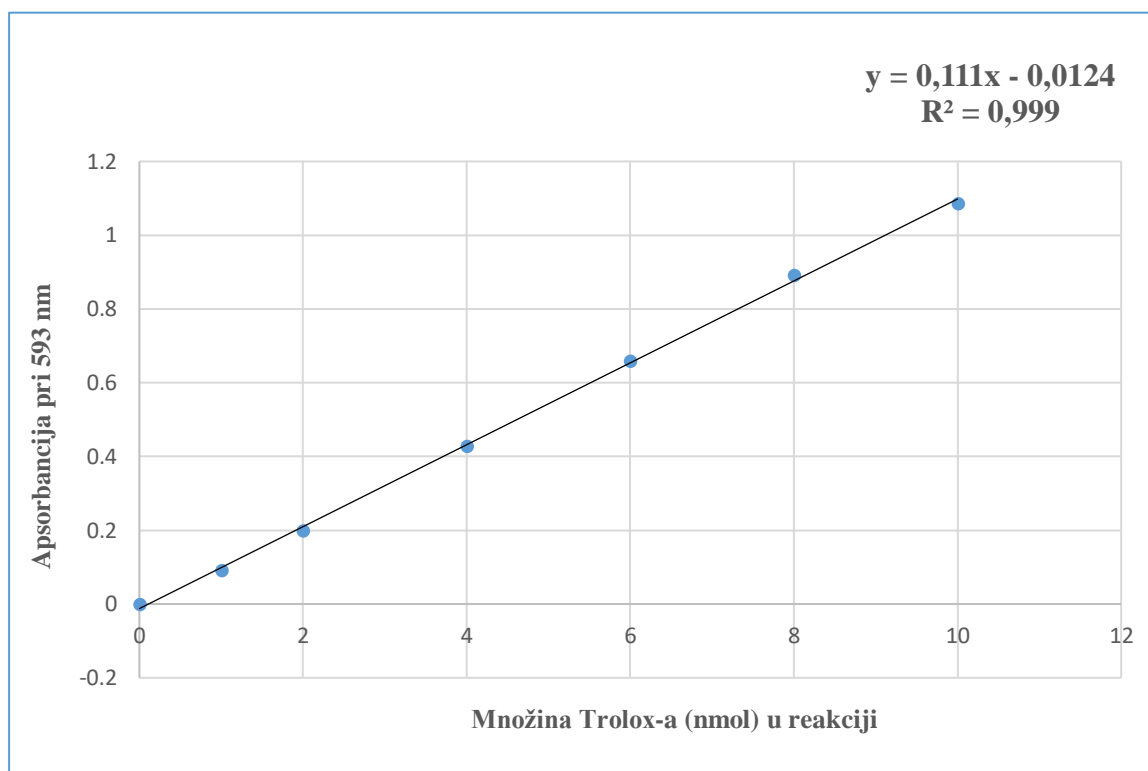


Slika 15. ANOVA test rezultata mjerenja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Rezultati mjerenja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom, gledani kroz sva 4 područja s kojeg dolaze ekotipovi, kreću se od 4,24 $\mu\text{mol TE / g ST}$ do 11,40 $\mu\text{mol TE / g ST}$ što se slaže s rezultatima istraživanja koje su proveli Bhusal i suradnici (2019). Iako su Bhusal i suradnici (2019) rezultate izrazili na gram svježeg uzorka, pri čemu se rezultati kreću od 0,90 $\mu\text{mol TE / g}$ svježeg uzorka i 18,88 $\mu\text{mol TE / g}$ svježeg uzorka. Rezultati dobiveni u ovome istraživanju su i dalje unutar raspona koji su naveli Bhusal i suradnici (2019) bez obzira na to što su rezultati ovoga istraživanja izraženi na gram suhe tvari, premda su dobiveni rezultati nižih vrijednosti nego oni koje su dobili Bhusal i suradnici (2019). Osim što antioksidacijski kapacitet varira sa ekotipom, do razlike u rezultatima vjerojatno dolazi zbog različitog volumena korištenog pri samoj analizi.

4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA FRAP METODOM

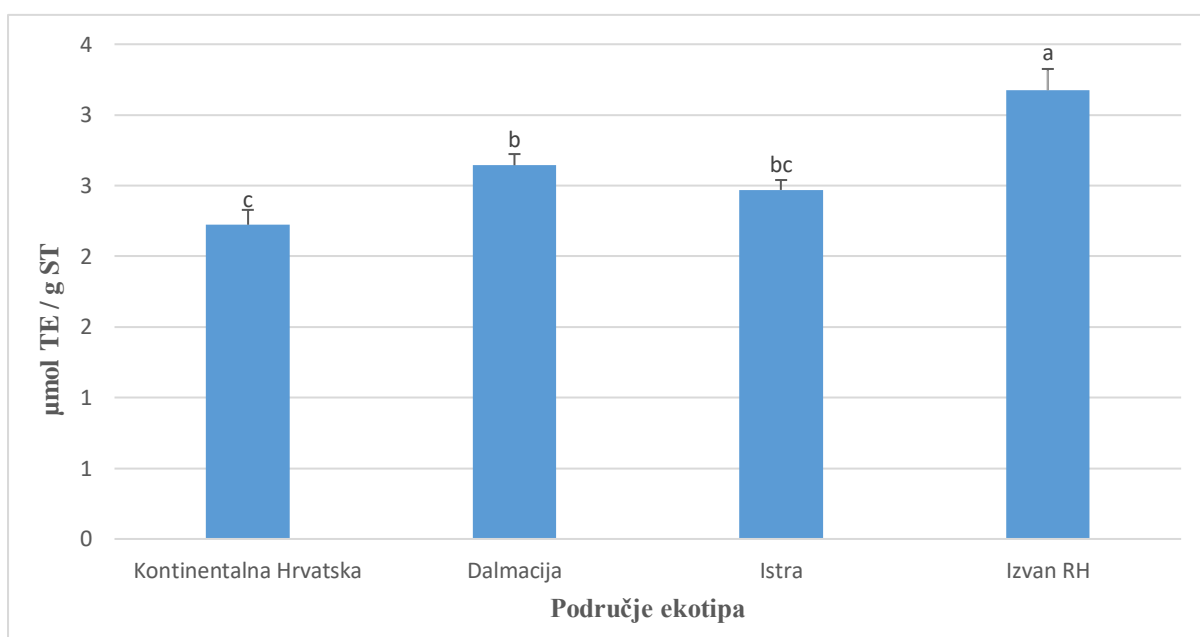
Slika 16 prikazuje baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 593 nm o množini Trolox-a, dobiven mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta pripremljenih standarada. Baždarna krivulja je linearna na što ukazuju i jednadžba krivulje ($y = 0,111x - 0,0124$) i koeficijent determinacije, $R^2 \geq 0,999$.



Slika 16. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o množini Trolox-a za FRAP metodu

Tablica 4 pokazuje da se antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom ekotipova s područja kontinenta kretao se između $1,39 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT308 do $3,78 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT273. Kod ekotipova iz Dalmacije, kako predočuje tablica 5, vidljivo je da se kapacitet antioksidacije kretao između $2,06 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT268 do $4,72 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT269. Također, iz tablice 6, koja se odnosi na ekotipe s područja Istre, vidljivo je kako se antioksidacijski kapacitet kretao od $1,52 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT337 pa do $3,69 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT341. Nadalje, iz tablice 7, koja sadrži podatke ekotipova češnjaka koji dolaze izvan granica Republike Hrvatske, vidljivo je kako antioksidacijski kapacitet varira od $1,66 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT329 do $6,25 \mu\text{mol TE} / \text{g ST}$ u ekotipu IPT288.

Slika 17 prikazuje kako u prosjeku ekotipovi češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske imali su 2,22 $\mu\text{mol TE / g ST}$, ekotipovi s područja Dalmacije 2,64 $\mu\text{mol TE / g ST}$, s područja Istre imali su 2,47 $\mu\text{mol TE / g ST}$, dok su ekotipovi s područja izvan granica Republike Hrvatske sadržavali 3,18 $\mu\text{mol TE / g ST}$. Analiza varijance, kako pokazuje slika 17, prikazuje kako ekotipovi s područja izvan Republike Hrvatske imaju značajno viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na ekotipove s ostalih područja uključenih u istraživanje, dok značajno niži kapacitet pokazuju ekotipovi kontinentalne Hrvatske.



Slika 17. ANOVA test rezultata mjerenja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom, u ovome istraživanju, dobiveni su rezultati koji se kreću od 1,39 $\mu\text{mol TE / g ST}$ do 6,25 $\mu\text{mol TE / g ST}$ češnjaka. Navedeni raspon se odnosi na sve ekotipove zaprimljene u ovome istraživanju. Istraživanje koje su proveli Bhusal i suradnici (2019) pokazalo je kako se vrijednosti kapaciteta antioksidacije kreću između 2,26 $\mu\text{mol TE / g}$ svježeg uzorka i 12,32 $\mu\text{mol TE / g}$ svježeg uzorka.

Tablica 4. Sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta mjenenog FRAP i DPPH metodama ekotipova češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

Interna šifra ekotipa	Ukupni fenoli	Antioksidacijski kapacitet	
	mg GAE /g ST	FRAP metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$	DPPH metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$
IPT189	7,01 \pm 1,17	2,65 \pm 0,08	9,71 \pm 0,92
IPT249	4,55 \pm 0,08	1,64 \pm 0,04	7,75 \pm 0,29
IPT250	3,27 \pm 0,04	1,52 \pm 0,02	6,25 \pm 0,38
IPT252	5,10 \pm 0,13	2,78 \pm 0,04	9,25 \pm 0,44
IPT253	4,72 \pm 0,10	1,57 \pm 0,01	7,91 \pm 0,23
IPT254	3,82 \pm 0,09	2,10 \pm 0,15	8,52 \pm 0,18
IPT272	6,95 \pm 0,24	3,09 \pm 0,21	8,94 \pm 0,25
IPT273	6,03 \pm 0,06	3,78 \pm 0,02	8,08 \pm 0,46
IPT308	3,84 \pm 0,01	1,39 \pm 0,01	8,37 \pm 0,07
IPT310	5,00 \pm 0,09	2,67 \pm 0,12	9,18 \pm 0,37
IPT317	6,48 \pm 1,67	2,00 \pm 0,08	8,34 \pm 0,21
IPT360	4,77 \pm 0,10	2,15 \pm 0,04	8,84 \pm 0,03
IPT361	3,60 \pm 0,10	1,95 \pm 0,06	8,70 \pm 0,18
IPT364	3,85 \pm 0,05	1,82 \pm 0,14	8,51 \pm 0,11

Tablica 5. Sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta mjenog FRAP i DPPH metodama ekotipova češnjaka s područja Dalmacije. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

Interna šifra ekotipa	Ukupni fenoli	Antioksidacijski kapacitet	
	mg GAE / g ST	FRAP metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$	DPPH metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$
IPT191	5,81 \pm 0,15	2,31 \pm 0,08	8,07 \pm 0,26
IPT192	5,33 \pm 0,33	2,54 \pm 0,04	4,24 \pm 1,52
IPT193	3,79 \pm 0,14	2,22 \pm 0,08	8,58 \pm 0,45
IPT195	4,69 \pm 0,11	2,21 \pm 0,09	8,82 \pm 0,11
IPT196	5,01 \pm 0,07	2,31 \pm 0,07	7,35 \pm 0,28
IPT199	5,65 \pm 0,19	3,09 \pm 0,07	9,75 \pm 0,74
IPT200	4,32 \pm 0,14	2,64 \pm 0,12	8,65 \pm 0,01
IPT204	5,01 \pm 0,04	2,95 \pm 0,01	7,73 \pm 0,39
IPT255	6,74 \pm 0,19	2,29 \pm 0,06	5,44 \pm 0,33
IPT259	5,72 \pm 0,07	2,91 \pm 0,07	7,72 \pm 0,52
IPT260	5,99 \pm 0,19	3,06 \pm 0,04	5,86 \pm 0,15
IPT266	6,10 \pm 0,27	2,37 \pm 0,09	9,01 \pm 0,15
IPT268	5,80 \pm 0,07	2,06 \pm 0,04	7,58 \pm 1,31
IPT269	8,15 \pm 0,19	4,72 \pm 0,05	11,23 \pm 0,41
IPT270	5,82 \pm 0,10	2,85 \pm 0,04	9,14 \pm 0,06
IPT276	5,57 \pm 0,20	2,86 \pm 0,14	9,34 \pm 0,06
IPT306	5,62 \pm 0,02	2,24 \pm 0,09	8,79 \pm 0,46
IPT309	8,81 \pm 0,15	2,32 \pm 0,02	8,84 \pm 0,05
IPT351	4,81 \pm 0,02	2,30 \pm 0,04	9,06 \pm 0,28

Tablica 6. Sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta mjenog FRAP i DPPH metodama ekotipova češnjaka s područja Istre. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

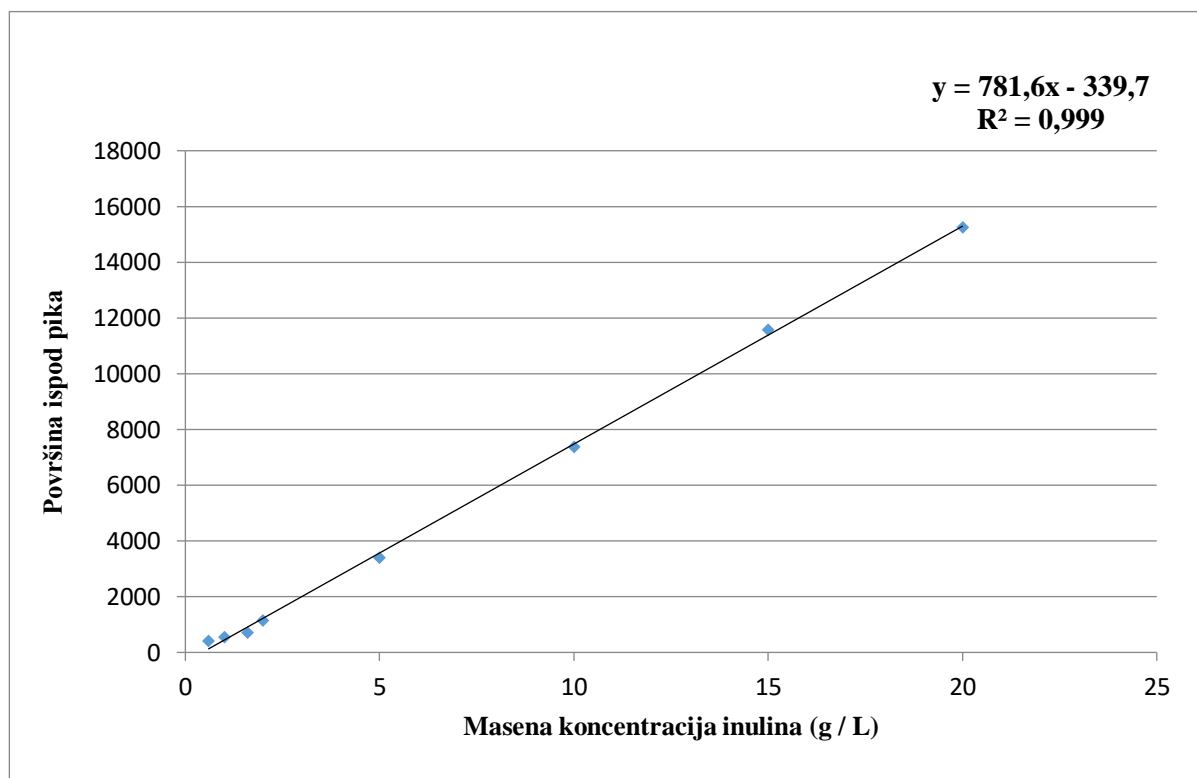
Interna šifra ekotipa	Ukupni fenoli	Antioksidacijski kapacitet	
	mg GAE / g ST	FRAP metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$	DPPH metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$
IPT010	7,46 \pm 0,14	2,38 \pm 0,08	8,46 \pm 0,34
IPT011	5,00 \pm 0,02	2,12 \pm 0,05	8,71 \pm 0,23
IPT012	6,67 \pm 0,19	2,76 \pm 0,09	9,29 \pm 0,20
IPT013	5,44 \pm 0,14	2,17 \pm 0,05	8,56 \pm 0,36
IPT014	6,34 \pm 0,13	2,14 \pm 0,09	6,48 \pm 0,39
IPT015	6,54 \pm 0,14	2,26 \pm 0,06	8,16 \pm 0,32
IPT016	7,02 \pm 0,04	2,91 \pm 0,07	9,77 \pm 0,68
IPT017	7,85 \pm 0,35	2,24 \pm 0,05	7,92 \pm 1,02
IPT019	11,36 \pm 0,13	3,28 \pm 0,06	9,27 \pm 0,11
IPT020	6,62 \pm 0,82	2,57 \pm 0,09	8,00 \pm 0,81
IPT337	3,67 \pm 0,10	1,52 \pm 0,10	8,10 \pm 0,05
IPT338	3,48 \pm 0,16	1,54 \pm 0,08	8,64 \pm 0,03
IPT340	5,48 \pm 0,06	2,62 \pm 0,06	8,92 \pm 0,08
IPT341	8,97 \pm 0,15	3,69 \pm 0,10	9,54 \pm 0,12
IPT342	5,99 \pm 0,08	2,45 \pm 0,04	8,71 \pm 0,58
IPT343	7,54 \pm 0,15	3,21 \pm 0,06	8,89 \pm 0,06
IPT344	4,71 \pm 0,17	2,48 \pm 0,08	8,67 \pm 0,05
IPT345	4,15 \pm 0,08	2,31 \pm 0,06	8,12 \pm 0,35
IPT346	3,89 \pm 0,15	2,84 \pm 0,03	8,92 \pm 0,12
IPT347	6,70 \pm 0,07	3,20 \pm 0,03	8,95 \pm 0,18
IPT348	4,04 \pm 0,02	1,64 \pm 0,02	8,65 \pm 0,16
IPT349	5,50 \pm 0,10	2,00 \pm 0,08	8,80 \pm 0,07

Tablica 7. Sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijskog kapaciteta mjenenog FRAP i DPPH metodama ekotipova češnjaka s područja izvan granica Hrvatske. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

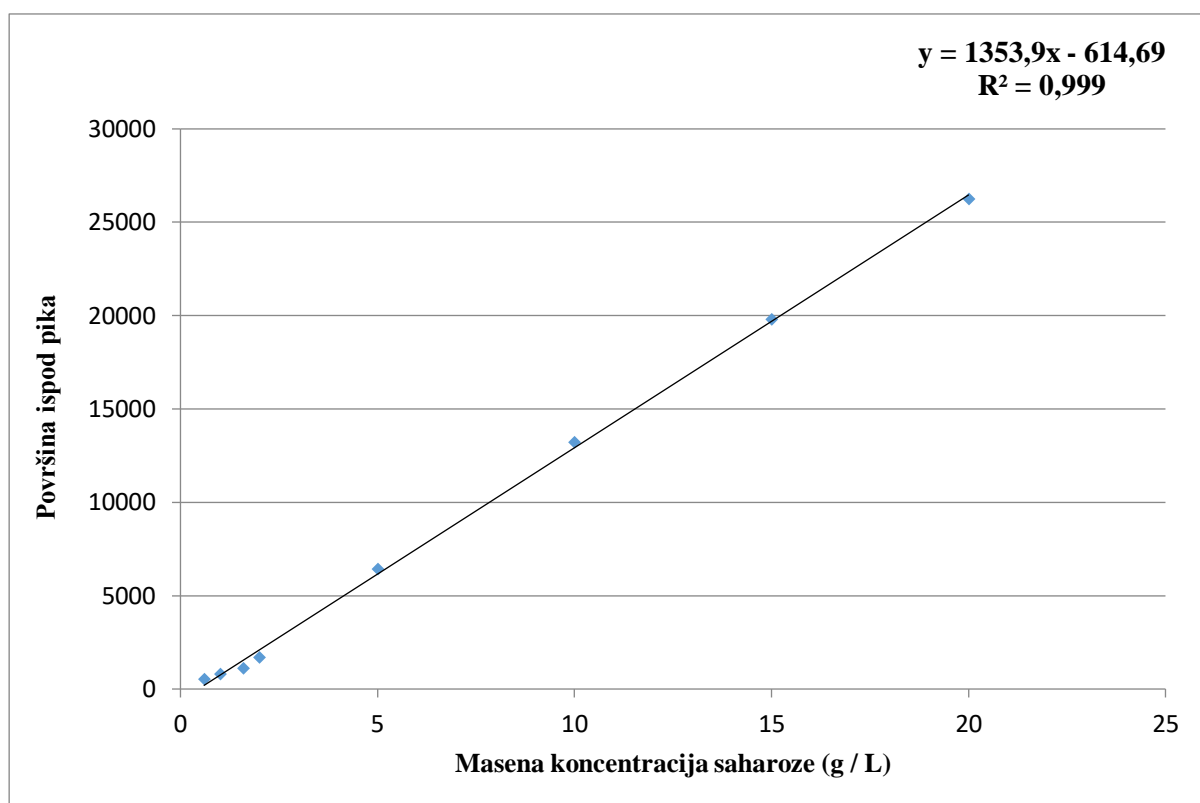
Interni šifra ekotipa	Ukupni fenoli	Antioksidacijski kapacitet	
	mg GAE / g ST	FRAP metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$	DPPH metoda $\mu\text{mol TE} / \text{g ST}$
IPT206	5,01 \pm 0,10	2,97 \pm 0,03	9,47 \pm 0,17
IPT219	10,91 \pm 0,12	4,31 \pm 0,01	8,77 \pm 0,22
IPT220	4,86 \pm 0,38	3,09 \pm 0,03	8,68 \pm 0,36
IPT222	7,81 \pm 0,12	5,18 \pm 0,08	10,18 \pm 0,36
IPT265	5,56 \pm 0,18	2,31 \pm 0,05	9,26 \pm 0,50
IPT283	5,57 \pm 0,14	3,21 \pm 0,05	8,73 \pm 0,40
IPT284	4,48 \pm 0,17	2,30 \pm 0,04	6,09 \pm 0,93
IPT285	8,12 \pm 0,06	4,94 \pm 0,11	10,34 \pm 0,22
IPT287	5,56 \pm 0,01	2,60 \pm 0,05	8,21 \pm 0,03
IPT288	9,62 \pm 0,10	6,25 \pm 0,04	11,40 \pm 0,18
IPT293	6,95 \pm 0,21	4,04 \pm 0,15	9,80 \pm 0,07
IPT296	4,97 \pm 0,13	2,62 \pm 0,07	8,44 \pm 0,16
IPT299	6,14 \pm 0,08	2,76 \pm 0,03	9,31 \pm 0,27
IPT301	5,50 \pm 0,01	1,79 \pm 0,02	8,47 \pm 0,08
IPT302	7,63 \pm 0,07	2,64 \pm 0,12	8,53 \pm 0,08
IPT322	3,57 \pm 0,23	2,00 \pm 0,12	8,81 \pm 0,05
IPT324	7,92 \pm 0,04	4,58 \pm 0,06	9,80 \pm 0,21
IPT326	5,90 \pm 0,11	2,43 \pm 0,03	8,28 \pm 0,12
IPT329	3,24 \pm 0,03	1,66 \pm 0,11	8,14 \pm 0,08
IPT330	3,59 \pm 0,09	1,87 \pm 0,06	8,91 \pm 0,41
IPT339	6,15 \pm 0,18	2,59 \pm 0,12	8,65 \pm 0,43
IPT354	8,09 \pm 0,04	3,72 \pm 0,08	8,84 \pm 0,08

4.4. ODREĐIVANJE ŠEĆERA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Kako bi se šećeri separirani pomoću HPLC uređaja mogli kvantificirati potrebno je napraviti baždarne dijagrame po prethodno navedenom propisu. Nakon izrade baždarnih dijagrama, njihove jednadžbe se učitaju u program HPLC-a te se daljnjim obrađivanjem dobivenih pikova definira površina ispod pika pomoću koje se u konačnici kvantificira detektirani šećer. Slike 18 i 19 prikazuju baždarne dijagrame koji su korišteni za kvantifikaciju udjela šećera u uzorcima česnjaka. Slika 18 prikazuje kako je odnos površine ispod pika proporcionalan masenoj koncentraciji šećera tj. inulina što dodatno potvrđuju jednadžba pravca ($y = 781,6x - 339,7$) i koeficijent determinacije ($R^2 = 0,999$). Za navedeni analit izračunato je i iskorištenje ($100,4 \pm 0,2 \%$) koje pokazuje da je metoda primjerena za njegovo određivanje. Slika 19 prikazuje baždarni dijagram saharoze, koji pokazuje linearnu ovisnost površine ispod pika o masenoj koncentraciji saharoze. Jednadžba krivulje ($y = 1353,9x - 614,69$) i koeficijent determinacije ($R^2 = 0,999$) pokazatelji su linearnog odnosa. Iskorištenje za navedeni analit ($99,9 \pm 2,3 \%$) upućuje na primjerenost metode za njegovu analizu.



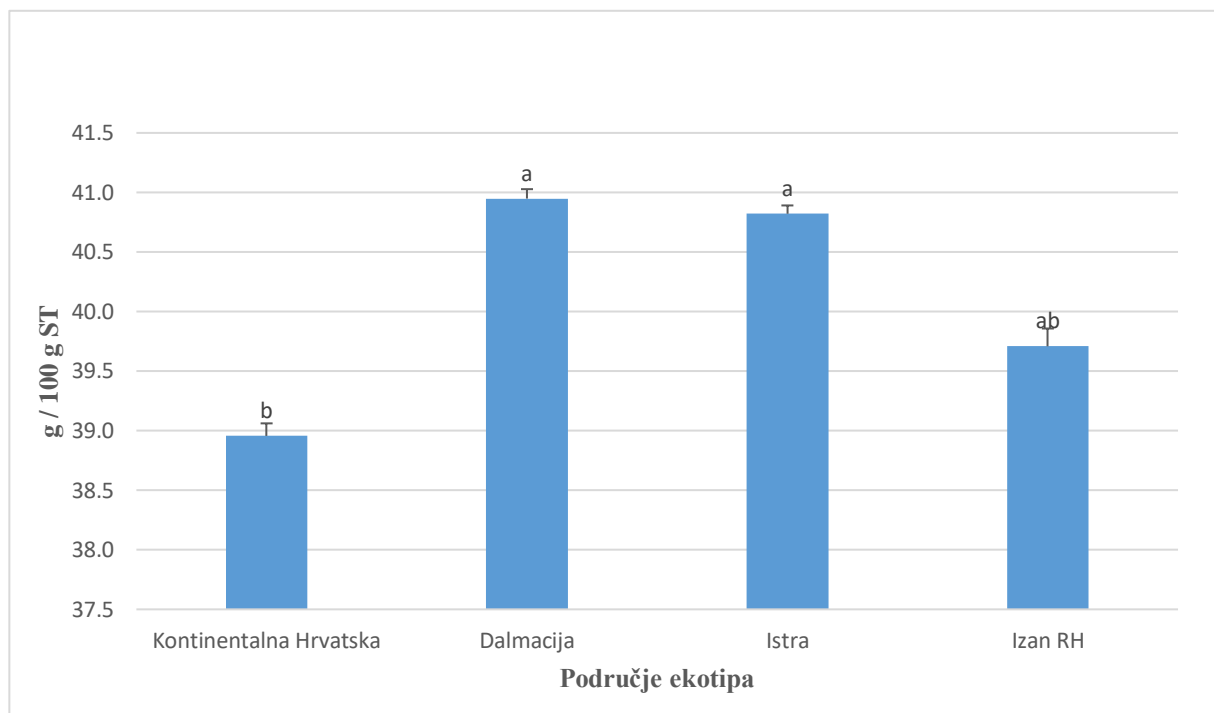
Slika 18. Baždarni dijagram ovisnosti površine ispod pika o masenoj koncentraciji inulina



Slika 19. Baždarni dijagram ovisnosti površine ispod pika o masenoj koncentraciji saharoze

U ovome radu, osim određivanja udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta, određivani su šećeri te njihov udio. Tablica 8 pokazuje kako se kod ekotipova s kontinenta, količina inulina kretala između 33,8 g / 100 g ST u ekotipu IPT271 do 46,0 g / 100 g ST u ekotipu IPT189. Kod ekotipova iz Dalmacije, kako predočuje tablica 9, vidljivo je da se sadržaj inulina kretao između 28,6 g / 100 g ST u ekotipu IPT306 do 45,7 g / 100 g ST u ekotipu IPT196. Također, iz tablice 10, koja se odnosi na ekotipe s područja Istre, vidljivo je kako se količina inulina kretala od 31,3 g / 100 g ST u ekotipu IPT349 pa do 48,1 g / 100 g ST u ekotipu IPT019. Nadalje, iz tablice 11, koja sadrži podatke ekotipova češnjaka koji dolaze izvan granica Republike Hrvatske, vidljivo je kako udio inulina varira od 31,2 g / 100 g ST u ekotipu IPT301 do 45,2 g / 100 g ST u ekotipu IPT285.

Slika 20 prikazuje kako su u prosjeku ekotipovi češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske imali inulina u vrijednosti od 39,0 g / 100 g ST, ekotipovi s područja Dalmacije 40,9 g / 100 g ST, s područja Istre imali su 40,8 g / 100 g ST, dok su ekotipovi s područja izvan granica Republike Hrvatske sadržavali 39,7 g / 100 g ST izvan Republike Hrvatske. Analiza varijance, kako prikazuje slika 20, pokazuje kako ekotipovi s područja kontinentalne Hrvatske imaju značajno nižu razinu inulina u odnosu na ekotipove s ostalih područja uključenih u istraživanje.

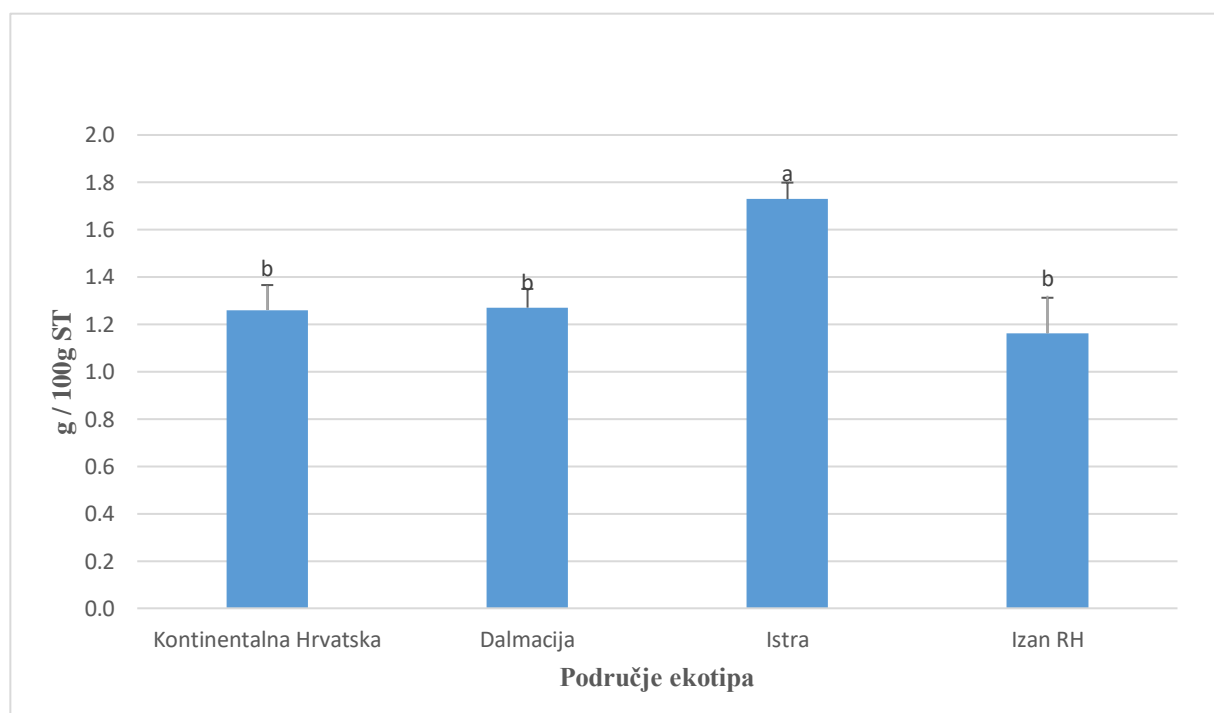


Slika 20. ANOVA test rezultata mjerenja količine inulina HPLC-om

Sadržaj inulina u ekotipovima češnjaka, gledano kroz sve primke, varira od 28,6 g / 100 g ST do 48,1 g / 100 g ST, što se vrlo dobro slaže s rezultatima iz istraživanja koje su proveli Kinalski i Noreña (2019). Njihove vrijednosti koje opisuju sadržaj inulina u uzorcima češnjaka kreću se od 31,35 g / 100 g ST do 42,9 g / 100g ST. U ovome istraživanju, prosječne vrijednosti inulina po regijama iznose 39,0 g / 100 g ST za kontinentalnu Hrvatsku, 40,9 g / 100 g ST za područje Dalmacije, 40,8 g / 100g ST za područje Istre te 39,7 g / 100 g ST za područja van granica Republike Hrvatske te se slažu u potpunosti s rezultatima istraživanja koje su proveli Kinalski i Noreña (2019), pri čemu prosjek njihovih rezultata sadržaja inulina je zanemarivo niži od prosjeka izračunatog po regijama (slika 20).

Tablica 8 pokazuje kako se kod ekotipova s kontinenta, količina saharoze kretala između 0,4 g / 100g ST u ekotipu IPT308 do 2,78 g / 100 g ST u ekotipu IPT252. Kod ekotipova iz Dalmacije, kako predočuje tablica 9, vidljivo je da se sadržaj saharoze kretao između 0,70 g / 100 g ST u ekotipu IPT306 do 2,80 g / 100 g ST u ekotipu IPT204. Također, iz tablice 10, koja se odnosi na ekotipe s područja Istre, vidljivo je kako se količina saharoze kretala od 0,5 g / 100 g ST u ekotipu IPT346 pa do 3,41 g / 100 g ST u ekotipu IPT011. Nadalje, iz tablice 11, koja sadrži podatke ekotipova češnjaka koji dolaze izvan granica Republike Hrvatske, vidljivo je kako udio saharoze varira od 0,36 g / 100 g ST u ekotipu IPT296 do 3,44 g / 100 g ST u ekotipu IPT222.

Slika 21 prikazuje kako su u prosjeku ekotipovi češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske imali sadržaj saharoze od 1,26 g / 100 g ST, ekotipovi s područja Dalmacije 1,27 g / 100 g ST, s područja Istre imali su 1,73 g / 100 g ST, dok su ekotipovi s područja izvan granica Republike Hrvatske sadržavali 1,16 g / 100 g ST izvan Republike Hrvatske. Analiza varijance, kako prikazuje slika 21, pokazuje kako ekotipovi s područja Istre imaju značajno višu razinu saharoze u odnosu na ekotipove s ostalih područja uključenih u istraživanje.



Slika 21. ANOVA test rezultata mjerenja količine saharoze HPLC-om

Udio saharoze u ekotipovima češnjaka, neovisno iz kojeg područja potječu, kreće se između 0,36 g / 100 g ST i 3,44 g / 100 g ST. Prosječno gledano, kada se u obzir uzmu sva 4 područja s kojih dolaze ekotipovi, razina saharoze u češnjaku varira od 1,16 g / 100 g ST do 1,73 g / 100 g ST. Rezultati istraživanja provedenog u ovome radu donekle se slažu s rezultatima istraživanja koje je proveo Kang (2016). Sadržaj saharoze koji je dobio Kang (2016) se uglavnom kreće pri donjoj granici za sadržaj saharoze dobiven u ovom istraživanju. Vrijednosti saharoze iz istraživanja koje je proveo Kang (2016) se kreću između 0,18 g / 100 g ST i 0,31 g / 100 g ST. Dok s druge strane, Atashi i suradnici (2011) navode kako sadržaj saharoze u češnjacima koje su ispitivali iznosi 2,3 g / 100 g ST. Takve vrijednosti predstavljaju gornju granicu rezultata dobivenih u ovome istraživanju, jer se po regijama gledano, gornje granice sadržaja saharoze kreću od 2,78 g / 100 g ST do 3,44 g / 100 g ST (tablice 8, 9, 10 i 11).

Tablica 8. Sadržaj inulina i saharoze ekotipova češnjaka s područja kontinentalne Hrvatske. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

Interna šifra ekotipa	Inulin	Saharoza
	g / 100 g ST	g / 100 g ST
IPT189	46,0 \pm 0,4	2,24 \pm 0,06
IPT249	42,6 \pm 0,5	1,49 \pm 0,09
IPT250	40,7 \pm 0,3	1,24 \pm 0,01
IPT252	35,6 \pm 0,2	2,78 \pm 0,01
IPT253	43,4 \pm 0,5	1,36 \pm 0,03
IPT254	39,6 \pm 0,3	1,31 \pm 0,01
IPT272	33,8 \pm 0,6	1,50 \pm 0,04
IPT273	35,9 \pm 0,2	2,47 \pm 0,01
IPT308	44,5 \pm 1,3	0,4 \pm 0,02
IPT310	39,0 \pm 1,0	0,48 \pm 0,01
IPT317	35,9 \pm 0,3	0,49 \pm 0,01
IPT360	36,4 \pm 0,4	0,61 \pm 0,02
IPT361	36,3 \pm 1,0	0,57 \pm 0,01
IPT364	35,7 \pm 0,5	0,62 \pm 0,02

Tablica 9. Sadržaj inulina i saharoze ekotipova češnjaka s područja Dalmacije. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

Interna šifra ekotipa	Inulin	Saharoza
	g / 100 g ST	g / 100 g ST
IPT191	44,1 \pm 0,3	1,04 \pm 0,01
IPT192	43,2 \pm 0,2	1,21 \pm 0,03
IPT193	42,5 \pm 0,1	1,02 \pm 0,03
IPT195	41,6 \pm 0,2	0,80 \pm 0,01
IPT196	45,7 \pm 0,1	1,11 \pm 0,02
IPT199	43,1 \pm 0,1	1,03 \pm 0,02
IPT200	43,4 \pm 0,4	1,20 \pm 0,02
IPT204	44,3 \pm 0,2	2,80 \pm 0,09
IPT255	41,3 \pm 1,1	2,65 \pm 0,04
IPT259	41,2 \pm 0,2	1,01 \pm 0,03
IPT260	42,5 \pm 0,2	1,18 \pm 0,03
IPT266	44,7 \pm 0,2	0,77 \pm 0,01
IPT268	41,4 \pm 0,4	1,91 \pm 0,02
IPT269	41,7 \pm 0,6	1,74 \pm 0,05
IPT270	39,3 \pm 0,2	0,91 \pm 0,07
IPT276	41,7 \pm 0,3	0,79 \pm 0,11
IPT306	28,6 \pm 0,7	0,70 \pm 0,01
IPT309	32,9 \pm 0,2	1,30 \pm 0,02
IPT351	34,9 \pm 0,4	0,98 \pm 0,01

Tablica 10. Sadržaj inulina i saharoze ekotipova češnjaka s područja Istre. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

Interna šifra ekotipa	Inulin	Saharoza
	g / 100 g ST	g / 100 g ST
IPT010	43,9 \pm 2,4	3,07 \pm 0,62
IPT011	44,5 \pm 0,3	3,41 \pm 0,07
IPT012	44,6 \pm 0,3	3,24 \pm 0,03
IPT013	40,6 \pm 0,6	3,19 \pm 0,05
IPT014	44,6 \pm 0,2	3,13 \pm 0,10
IPT015	44,7 \pm 0,2	1,55 \pm 0,02
IPT016	44,2 \pm 0,4	3,42 \pm 0,18
IPT017	45,2 \pm 0,2	3,31 \pm 0,06
IPT019	48,1 \pm 0,3	1,59 \pm 0,01
IPT020	40,4 \pm 0,2	3,05 \pm 0,09
IPT337	42,8 \pm 1,6	0,80 \pm 0,00
IPT338	36,5 \pm 1,6	0,63 \pm 0,04
IPT340	41,2 \pm 1,8	1,20 \pm 0,01
IPT341	43,8 \pm 0,7	0,83 \pm 0,03
IPT342	33,8 \pm 1,9	0,65 \pm 0,04
IPT343	38,0 \pm 0,8	0,82 \pm 0,02
IPT344	39,4 \pm 0,3	0,54 \pm 0,02
IPT345	37,6 \pm 1,1	0,54 \pm 0,01
IPT346	35,6 \pm 0,6	0,50 \pm 0,02
IPT347	38,1 \pm 0,8	1,02 \pm 0,02
IPT348	39,1 \pm 0,7	0,57 \pm 0,02
IPT349	31,3 \pm 0,5	0,98 \pm 0,03

Tablica 11. Sadržaj inulina i saharoze ekotipova češnjaka s područja izvan granica Republike Hrvatske. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna pogreška (N = 3)

Interna šifra ekotipa	Inulin	Saharoza
	g / 100 g ST	g / 100 g ST
IPT206	41,7 \pm 0,3	2,41 \pm 0,07
IPT219	43,8 \pm 0,4	2,18 \pm 0,02
IPT220	41,4 \pm 0,2	2,64 \pm 0,04
IPT222	44,7 \pm 0,3	3,44 \pm 0,04
IPT265	43,0 \pm 0,3	0,87 \pm 0,00
IPT283	39,5 \pm 1,2	1,03 \pm 0,16
IPT284	37,0 \pm 0,9	1,22 \pm 0,04
IPT285	45,2 \pm 1,8	1,10 \pm 0,03
IPT287	42,4 \pm 0,7	0,56 \pm 0,02
IPT288	38,8 \pm 0,4	0,70 \pm 0,01
IPT293	36,3 \pm 0,4	1,03 \pm 0,05
IPT296	43,1 \pm 0,2	0,36 \pm 0,03
IPT299	38,8 \pm 0,7	0,88 \pm 0,01
IPT301	31,2 \pm 0,9	0,62 \pm 0,03
IPT302	44,5 \pm 1,3	0,52 \pm 0,01
IPT322	39,8 \pm 0,3	1,01 \pm 0,02
IPT324	41,2 \pm 0,4	0,79 \pm 0,02
IPT326	32,3 \pm 0,5	0,65 \pm 0,01
IPT329	37,5 \pm 1,7	0,70 \pm 0,02
IPT330	35,8 \pm 0,7	0,85 \pm 0,05
IPT339	38,7 \pm 0,7	1,10 \pm 0,04
IPT354	37,0 \pm 0,6	0,90 \pm 0,02

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih ispitivanja može se zaključiti sljedeće:

1. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva kretao se između 3,24 mg GAE / g ST u ekotipu IPT 329 s područja izvan Republike Hrvatske i 11,36 mg GAE / g ST u ekotipu IPT019 s područja Istre, a ukupno gledano najmanji udio fenolnih spojeva sadrže ekotipovi s područja kontinentalne Hrvatske.
2. Antioksidacijski kapacitet mjeren DPPH metodom, kretao se između 4,24 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT192 s područja Dalmacije do 11,40 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT288 s područja izvan Republike Hrvatske. Sveukupno gledano, najmanji antioksidacijski kapacitet imaju ekotipovi s područja Dalmacije, a najveći kapacitet ekotipovi s područja izvan Republike Hrvatske.
3. Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom iznosio je između 1,39 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT308 s područja kontinentalne Hrvatske do 6,25 $\mu\text{mol TE / g ST}$ u ekotipu IPT288 s područja izvan Republike Hrvatske. Najmanji antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom imaju ekotipovi s područja kontinentalne Hrvatske, dok najveći imaju ekotipovi s područja izvan granica Hrvatske.
4. Sadržaj inulina u ekotipovima češnjaka kretao se od 28,6 g / 100 g ST u ekotipu IPT306 s područja Dalmacije do 48,1 g / 100 g ST u ekotipu IPT019 s područja Istre. Ekotipovi s područja kontinentalne Hrvatske, nakon analize varijance, pokazuju značajno niži sadržaj inulina naspram ekotipova s drugih područja.
5. Udio saharoze u ekotipovima češnjaka kretao se između 0,36 g / 100 g ST u ekotipu IPT296 i 3,44 g / 100 g ST u ekotipu IPT296, oba s područja izvan Republike Hrvatske, premda ekotipovi s područja Istre, sveukupno gledano, pokazuju značajno veći udio saharoze naspram svih drugih ekotipova.

6. LITERATURA

Ahuja S, Dong MW (2005) Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC, 1. izd., Elsevier Science, Amsterdam.

Atashi S, Akbarpour V, Mashayekhi K, Mousavizadeh SJ (2011) Garlic physiological characteristics from harvest to sprouting in response to low temperature. *J. Stored Prod. Postharvest Res.* **15**, 285–291. <https://doi.org/10.5897/JSPPR11.023>

Baghalian K, Ziai SA, Naghavi MR, Badi HN, Khalighi A (2005) Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Sci. Hortic.* **2**, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.07.001>

Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **1**, 191–203. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.07.042>

Bansal MR, Pal OP, Sharma PK (2009) High performance liquid chromatography: a short review. *J. Glob. Pharma Technol.* **5**, 22-26.

Beato VM, Orgaz F, Mansilla F, Montaña A (2011). Changes in Phenolic Compounds in Garlic (*Allium sativum* L.) Owing to the Cultivar and Location of Growth. *Plant Foods Hum Nutr.* **3**, 218–223. <https://doi.org/10.1007/S11130-011-0236-2>

Benzie IFF, Strain, JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1**, 70–76. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>

Berend S, Grabarić Z (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol.* **3**, 205–212. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-59-2008-1868>

Bhusal R, Islam S, Khar A, Singh S, Jain N, Tomar BS (2019) Diversity analysis and trait association study for antioxidants and quality traits in landraces, farmers’ varieties and commercial varieties of Indian short day garlic (*Allium sativum* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* **8**, 1843–1859. <https://doi.org/10.1007/S10722-019-00811-8>

Block E (2010) Garlic and Other Alliums: The Lore and The Science, 1. izd., Royal Society of Chemistry, London.

Bors W, Michel C, Saran M (1994) Flavonoid antioxidants: Rate constants for reactions with oxygen radicals. *Meth. Enzymol.* **234**, 420–429. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34112-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34112-5)

- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* **1**, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bravo L (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **11**, 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **5**, 749–760. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)
- Capparella M, Foster W, Larrousse M, Phillips DJ, Pomfret A, Tuvim Y (1995) Characteristics and applications of a new high-performance liquid chromatography guard column. *J. Chromatogr. A.* **1-2**, 141–150. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01002-V](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01002-V)
- Cazes J, Ewing GW (2005) Ewing's analytical instrumentation handbook, 3.izd., CRC Press, Boca Raton.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **3**, 481–493. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.BMB.A072625>
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Secondary metabolites. U: Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (ured.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 2. izd., John Wiley & Sons, Hoboken, str. 1132–1205.
- Czaplicki S (2013) *Column Chromatography*, 1. izd., InTechOpen, London, str. 99–122 <https://doi.org/10.5772/55620>
- Djilas S, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G (2002) Antioxidants in food. *Hem Ind.* **3**, 105–112. <https://doi.org/10.2298/hemind0203105d>
- Dong MW (2006) *Modern HPLC for practicing scientists*, 1. izd., John Wiley & Sons, Hoboken, str. 286.
- Dumičić G, Čagalj M, Urlić B, Runjić M, Ban G (2012) Komponente prinosa češnjaka (*Allium sativum* L.). U: *Proceedings of the 8th International Agronomist Symposium '13, 48th Croatian Agronomist Symposium '13, Dubrovnik*, str. 349–352.
- Dumičić G, Miloš B, Žanić K, Urlić B, Jukić Špika M (2015) *Jadranski češnjak*, 1. izd., Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split.
- Dureja AG, Dhiman K (2012) Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritiana* and *Ziziphus nummularia* fruit extracts. *Int. J. Green Pharm.* **3**, 187–192. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.104929>

Gorinstein S, Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Najman K, Park YS, Heo BG, Cho JY, Bae JH (2009) Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Control*, **4**, 407–413. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2008.07.008>

Huang D, Boxin OU, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **6**, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Kang OJ (2016) Physicochemical Characteristics of Black Garlic after Different Thermal Processing Steps. *Prev Nutr Food Sci.* **4**, 348. <https://doi.org/10.3746/PNF.2016.21.4.348>

Katalinić V, Možina SS, Skroza D, Generalić I, Abramović H, Miloš M, Ljubenković I, Piskernik S, Pezo I, Terpinč P, Boban M (2010) Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* **2**, 715–723. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.019>

Kazazić SP (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol.* **4**, 279–290.

Kinalski T, Noreña CPZ (2019) Effect of spray drying encapsulation of garlic extract on inulin and thiosulfinate contents. *J. Food Meas. Charact.* **3**, 2438–2447. <https://doi.org/10.1007/S11694-019-00164-X>

Llano S, Gómez S, Londoño J, Restrepo A (2019) Antioxidant activity of curcuminoids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 3752–3760. <https://doi.org/10.1039/C8CP06708B>

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* **8**, 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang SW, Patapoutian A (2005) The pungency of garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.* **10**, 929–934. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.018>

Major N, Prekalj B, Perković J, Ban D, Užila Z, Ban SG (2020) The Effect of Different Extraction Protocols on Brassica oleracea var. acephala Antioxidant Activity, Bioactive Compounds, and Sugar Profile. *Plants.* **12**, 1792. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9121792>

Mathew S, Abraham TE, Zakaria ZA (2015) Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *J. Food Sci. Technol.* **9**, 5790–5798. <https://doi.org/10.1007/S13197-014-1704-0>

Miller HE, Rigelhof F, Marquart L, Prakash A, Kanter M (2000) Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables. *J Am Coll Nutr.* **19**, 312-319. <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718966>

- Nuutila AM, Puupponen-Pimiä R, Aarni M, Oksman-Caldentey KM (2003) Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chem.* **4**, 485–493. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00476-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00476-4)
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **10**, 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Queiroz YS, Ishimoto EY, Bastos DHM, Sampaio GR, Torres EAFS (2009) Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. *Food Chem.* **1**, 371–374. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.11.105>
- Rutherford A (2001) *Introducing ANOVA and ANCOVA : a GLM approach*, 1. izd., SAGE, London.
- Santos-Sánchez N, Salas-Coronado R (2019) *Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism*, 1. izd., IntechOpen, London.
- Schulz V, Hänsel R, Blumenthal M, Tyler VE (2004) *Rational Phytotherapy*, 5. izd., Springer, Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-09666-6>
- Shang Y, Zhou H, Li X, Zhou J, Chen K (2019) Theoretical studies on the antioxidant activity of viniferifuran. *New J. Chem.* **39**, 15736–15742. <https://doi.org/10.1039/C9NJ02735A>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* **3**.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2013) *Fundamentals of analytical chemistry*, 9. izd., Cengage Learning, Boston. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85208-1.00006-1>
- Suciu A, Tamaş V, Alexandru G, Bordei N (2016) Evaluation of Allicin Stability in Lyophilized Aqueous Garlic Extract for New Pharmaceutical Solid Formulations With Bioavailable Allicin. *JEAT.* **2**.
- Tucak M, Čupić T, Popović S, Stjepanović M, Gantner R, Meglič V (2009) Agronomic evaluation and utilization of red clover (*Trifolium pratense* L.) germplasm. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca.* **2**, 206–210. <https://doi.org/10.15835/nbha3723081>
- Wang H, Li X, Shen D, Oiu Y, Song J (2014) Diversity evaluation of morphological traits and allicin content in garlic (*Allium sativum* L.) from China. *Euphytica.* **2**, 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1097-1>
- WHO (2005) *WHO monographs on selected medicinal plants*, 4. izd., WHO Publications

Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB (2017) Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci.* **1**, 96.
<https://doi.org/10.3390/IJMS18010096>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Tvrtko Karlo Kovačević, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis