

# Utjecaj staništa na kemijski sastav i biološka svojstva motra

---

Mimica, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:364348>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-31**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**UTJECAJ STANIŠTA NA KEMIJSKI SASTAV I  
BIOLOŠKA SVOJSTVA MOTRA**

**DIPLOMSKI RAD**

**NINA MIMICA**

**Matični broj: 22**

**Split, rujan 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**UTJECAJ STANIŠTA NA KEMIJSKI SASTAV I**  
**BIOLOŠKA SVOJSTVA MOTRA**

**DIPLOMSKI RAD**

**NINA MIMICA**

**Matični broj: 22**

**Split, rujan 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**INFLUENCE OF HARVEST LOCATION ON**  
**CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL**  
**ACTIVITY OF SEA FENNEL**

**DIPLOMA THESIS**

**NINA MIMICA**

**Parent number: 22**

**Split, September 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij Prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta  
**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

### UTJECAJ STANIŠTA NA KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA SVOJSTVA MOTRA

Nina Mimica, 22

**Sažetak:**

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je vjerojatno jedan od najpoznatijih halofita na području Mediterana. Ova biljka se od davnina koristi u prehrambene i ljekovite svrhe obzirom da je odlikuje prisutnost visokih koncentracija vitamina C, polifenola, karotenoida te ostalih bioaktivnih spojeva. Cilj ovog rada bio je istražiti razlike u kemijskom sastavu i biološkim svojstvima motra prikupljenog sa tri različite lokacije; na riječnom staništu, staništu na samom ušću te na morskom staništu. Korištenjem uređaja za mikrovalnu ekstrakciju pripremljeni su biljni ekstrakti (94°C, 500 W, 30 min) kojima je određen udio ukupnih fenola, flavonoida te ukupnih tanina, dok je sadržaj klorogenske kiseline, koja je dominantan fenolni spoj u motru, određen primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije. Uzorcima je testirana i antioksidacijska aktivnost metodom određivanja redukcijske aktivnosti uzoraka (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP) te korištenjem dviju metoda određivanja sposobnosti hvatanja molekula slobodnog radikala pri čemu je korišten dušikov monoksid (NO<sup>\*</sup>) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da lokacija uzorkovanja biljke motar ima veliki utjecaj na kemijski sastav i antioksidacijska svojstva ekstrakata. Također, rezultati ukazuju na važnost individualnih fenolnih spojeva (klorogenske kiseline) na biološka svojstva ekstrakata.

**Ključne riječi:** motar, mikrovalna ekstrakcija, fenolni spojevi, klorogenska kiselina, antioksidacijska aktivnost.

**Rad sadrži:** 42 stranice, 16 slika, 6 tablica, 46 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

**Datum obrane:** 30. rujna 2021. g.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate Study of Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food Technology  
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6  
**Mentor:** Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Associate Professor

### INFLUENCE OF HARVEST LOCATION ON CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF SEA FENNEL

Nina Mimica, 22

**Abstract:**

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is probably one of the most known halophytes in the Mediterranean region. This plant has been used from the earliest times for nutritional and medicinal purposes because it is characterized by a high concentration of vitamin C, polyphenols, carotenoids, and other bioactive compounds. The aim of this study was to explore the differences in chemical composition and biological properties of sea fennel collected from three different locations: river habitat, estuarine habitat, and marine habitat. Extracts of sea fennel were prepared by microwave-assisted extraction (94°C, 500 W, 30 min). Obtained extracts were tested for total phenolics, flavonoids, and tannins, while the content of chlorogenic acid, which is the dominant phenolic compound in sea fennel, was determined by using high-performance liquid chromatography. The antioxidant activity of the samples was also tested by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay, and using two free radical scavenging methods using nitric oxide (NO•), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH). From the obtained results it could be concluded that the sea fennel harvest location has great effect on the chemical composition and antioxidant activity of the extracts. Furthermore, the results point out the importance of the individual phenolics (chlorogenic acid) on the overall activity of the sea fennel extracts.

**Keywords:** sea fennel, microwave-assisted extraction, phenolics, chlorogenic acid, antioxidant activity.

**Thesis contains:** 42 pages, 16 figures, 6 tables, 46 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Mario Nikola Mužek, Ph. D., Assistant Prof.
2. Zvonimir Marijanović, Ph. D., Assistant Prof.
3. Ivana Generalić Mekinić, Ph. D., Associate Prof.

**Defence date:** September 30 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of** thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju,  
Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Generalić  
Mekinić u razdoblju od travnja do rujna 2021. godine.*

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na ukazanom povjerenju, savjetima i pomoći prilikom izrade diplomskog rada. Također, zahvaljujem se i doc. dr. sc. Danijeli Skrozi i mag. ing. cheming Ivani Vrci na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala mom dečku, obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci tijekom školovanja.*



## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

Zadatak ovog rada bio je utvrditi razliku i dokazati poveznicu između kemijskog sastava i antioksidacijskih svojstava motra prikupljenog sa tri različita staništa; s riječnog staništa, staništa na ušću te s morskog staništa.

## SAŽETAK

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je vjerojatno jedan od najpoznatijih halofita na području Mediterana. Ova biljka se od davnina koristi u prehrambene i ljekovite svrhe obzirom da je odlikuje prisutnost visokih koncentracija vitamina C, polifenola, karotenoida te ostalih bioaktivnih spojeva. Cilj ovog rada bio je istražiti razlike u kemijskom sastavu i biološkim svojstvima motra prikupljenog sa tri različite lokacije; na riječnom staništu, staništu na samom ušću te na morskom staništu. Korištenjem uređaja za mikrovalnu ekstrakciju pripremljeni su biljni ekstrakti (94°C, 500 W, 30 min) kojima je određen udio ukupnih fenola, flavonoida te ukupnih tanina, dok je sadržaj klorogenske kiseline, koja je dominantan fenolni spoj u motru, određen primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije. Uzorcima je testirana i antioksidacijska aktivnost metodom određivanja redukcijske aktivnosti uzoraka (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP) te korištenjem dviju metoda određivanja sposobnosti hvatanja molekula slobodnog radikala pri čemu je korišten dušikov monoksid (NO<sup>•</sup>) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da lokacija uzorkovanja biljke motar ima veliki utjecaj na kemijski sastav i antioksidacijska svojstva ekstrakata. Također, rezultati ukazuju na važnost individualnih fenolnih spojeva (klorogenske kiseline) na biološka svojstva ekstrakata.

**Ključne riječi:** motar, mikrovalna ekstrakcija, fenolni spojevi, klorogenska kiselina, antioksidacijska aktivnost.

## SUMMARY

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is probably one of the most known halophytes in the Mediterranean region. This plant has been used from the earliest times for nutritional and medicinal purposes because it is characterized by a high concentration of vitamin C, polyphenols, carotenoids, and other bioactive compounds. The aim of this study was to explore the differences in chemical composition and biological properties of sea fennel collected from three different locations: river habitat, estuarine habitat, and marine habitat. Extracts of sea fennel were prepared by microwave-assisted extraction (94°C, 500 W, 30 min). Obtained extracts were tested for total phenolics, flavonoids, and tannins, while the content of chlorogenic acid, which is the dominant phenolic compound in sea fennel, was determined by using high-performance liquid chromatography. The antioxidant activity of the samples was also tested by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay, and using two free radical scavenging methods using nitric oxide (NO<sup>•</sup>), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH). From the obtained results it could be concluded that the sea fennel harvest location has great effect on the chemical composition and antioxidant activity of the extracts. Furthermore, the results point out the importance of the individual phenolics (chlorogenic acid) on the overall activity of the sea fennel extracts.

**Keywords:** sea fennel, microwave-assisted extraction, phenolics, chlorogenic acid, antioxidant activity.

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>UVOD</b> .....   | 1  |
| <b>1. OPĆI DIO</b> .....                                      | 2  |
| 1.1. Halofiti.....  | 2  |
| 1.1.1. Motar ( <i>Crithmum maritimum</i> L.).....             | 3  |
| 1.1.2. Motar kao predmet znanstvenih istraživanja .....       | 9  |
| 1.2. Ekstrakcija.....   | 12 |
| 1.2.1. Mikrovalna ekstrakcija .....                           | 12 |
| 1.2.2. Prednosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ..... | 15 |
| <b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....                           | 17 |
| 2.1. Biljni materijal .....                                   | 17 |
| 2.2. Postupak ekstrakcije .....                               | 18 |
| 2.3. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom ..... | 20 |
| 2.4. Određivanje ukupnih tanina .....                         | 21 |
| 2.5. Određivanje ukupnih flavonoida .....                     | 22 |
| 2.6. Određivanje klorogenske kiseline .....                   | 23 |
| 2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....            | 24 |
| 2.7.1. DPPH metoda.....                                       | 24 |
| 2.7.2. FRAP metoda.....                                       | 25 |
| 2.7.3. NO <sup>•</sup> metoda.....                            | 26 |
| 2.8. Statistička obrada podataka .....                        | 27 |
| <b>3. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....                          | 28 |
| 3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola.....                | 29 |
| 3.2. Rezultati određivanja ukupnih tanina .....               | 30 |
| 3.3. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida.....            | 30 |
| 3.4. Rezultati određivanja klorogenske kiseline .....         | 31 |
| 3.5. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti .....  | 33 |
| 3.6. Rezultati statističke obrade podataka .....              | 36 |
| <b>4. ZAKLJUČAK</b> .....                                     | 37 |
| <b>5. LITERATURA</b> .....                                    | 38 |

## UVOD

Motar (*Crithmum Maritimum* L.) je divlja, grmolika biljka koja je u Hrvatskoj još poznata i kao obalni petrovac, primorski petrovac, šćulac, morski komorač i obalac. Spada u skupinu halofita, odnosno biljaka prilagođenih životu na staništima visokog saliniteta. Sastav motra ovisi o brojnim čimbenicima poput vrste (divlji ili kultivirani), vremenu uzorkovanja, lokaciji uzorkovanja te ostalim okolišnim čimbenicima. Veliki utjecaj na sastav i svojstva ekstrakta također ima i korištena tehnika ekstrakcije ciljanih spojeva pri čemu se u novije vrijeme konvencionalne metode ekstrakcije sve više zamjenjuju novijim, bržim i pouzdanijim tehnikama. Posljednjih godina se zahvaljujući visokoj učinkovitosti, kratkom vremenu ekstrakcije te maloj potrošnji organskih otapala mikrovalna ekstrakcija pokazala posebno značajnom za izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala, a samim time i kao dobra alternativa do sada korištenim konvencionalnim postupcima ekstrakcije.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Halofiti

Halofiti ili slanjače su biljke prilagođene životu na staništima koja se odlikuju visokim salinitetom. Neka od takvih područja su slane močvare, estuariji izloženi djelovanju morskih mijena, unutrašnje pustinje bogate lako topljivim solima, područja u blizini obala unutrašnjih jezera te poljoprivredna tla koja se pretjerano navodnjavaju. U takvim područjima dolazi do velikih gubitaka vode evapotranspiracijom uslijed čega se iz vode oslobađa sol i na taj način povećava njena koncentracija u tlu.<sup>1</sup>

Halofiti su biljke koje su razvile posebne prilagodbe kako bi opstali na staništima visokog saliniteta kao što su nakupljanje velike količine vode u staničnom soku, izlučivanje vode žlijezdama te odbacivanje određenih dijelova u kojima se nakupljaju soli. Na temelju tolerancije halofita, odnosno njihove potrebe za soli razlikuju se obligatni i fakultativni halofiti. Obligatni halofiti su vrste koje za opstanak moraju živjeti na zaslanjenim staništima, dok fakultativnim halofitima više odgovaraju slatkovodna staništa ili staništa s niskim koncentracijama soli.<sup>2</sup>

Postoji još jedna podjela halofita, i to na ksero-halofite i hidro-halofite. Hidro-halofitima je za život potrebna voda, odnosno mogu živjeti u vodi ili na vlažnom tlu, dok s druge strane, ksero-halofitima je važno samo da im je stanište slano te su oni najčešće stanovnici unutrašnjih pustinja. Stoga tla na kojima ove vrste rastu sadrže visoke koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i karbonata.<sup>1</sup>

Hrvatska flora broji nekoliko desetaka halofita od kojih su najpoznatiji motar, morska blitva, primorski oman, caklenjača i omaklina (slika 1).<sup>3</sup>



a) Omaklina



b) Morska blitva



c) Caklenjača



d) Primorski oman

**Slika 1.** Najčešće halofitne vrste u Hrvatskoj <sup>4-7</sup>

### 1.1.1. Motar (*Crithmum maritimum* L.)

Motar ili obalni petrovac (*Crithmum maritimum* L.) je višegodišnja biljna vrsta iz porodice štitarki (Apiaceae). Ime roda *Crithmum* dolazi od grčke riječi *krithe* što znači ječam, a odnosi se na oblik ploda, dok ime vrste *maritimum* znači od mora, a odnosi se na stanište na kojem ova biljka obitava.<sup>8</sup> Rasprostranjen je na većini europskih morskih obala. Može se naći na jugoistočnoj i zapadnoj afričkoj obali, na sjeveru arapskog poluotoka te na istočnoj obali Australije. U Hrvatskoj motar raste uzduž cijele Jadranske obale. Raste po stijenama, klifovima te pješčanom i kamenitom tlu, najčešće u većim skupinama. Može se naći i na područjima udaljenijim od mora gdje je tlo zaslanjeno kao posljedica posolice uzrokovane snažnim vjetrovima.<sup>9</sup>

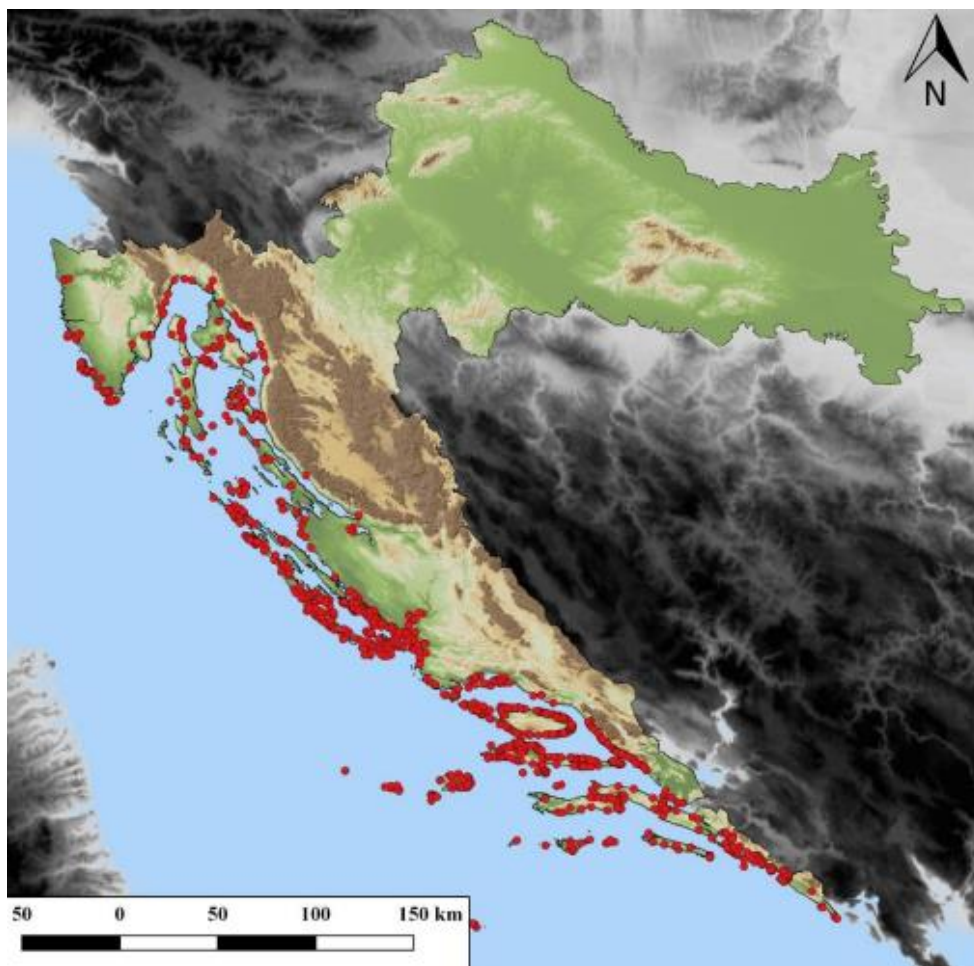
**Tablica 1.** Sistematizacija motra<sup>10</sup>

|                 |                              |
|-----------------|------------------------------|
| <b>Carstvo</b>  | Plantae                      |
| <b>Odjeljak</b> | Magnoliophyta                |
| <b>Razred</b>   | Magnoliopsida                |
| <b>Red</b>      | Apiales                      |
| <b>Porodica</b> | Apiaceae                     |
| <b>Rod</b>      | <i>Crithmum</i>              |
| <b>Vrsta</b>    | <i>Crithmum maritimum</i> L. |



**Slika 2.** Motar (*Crithmum maritimum* L.)<sup>11</sup>





**Slika 3.** Rasprostranjenost motra po hrvatskoj obali<sup>12</sup>

Na slici 4 prikazane su morfološke karakteristike motra. Stabljika biljke je okrugla, zadebljana, glatka i razgranata te može narasti do 60 cm visine, dok mu je korijen gust i jak. Listovi biljke su složeni, debeli i mesnati te razdijeljeni na 2,5 – 5 cm duge segmente sivo-zelene ili plavo-zelene boje. Cvjetovi cvatu od srpnja do rujna, mali su, skupljeni u štitaste cvatove i imaju 5 žućkasto-zelenih ili zelenkasto-bijelih ovalnih latica. Plod motra je kalavac duljine 5 – 6 mm. Sjeme mu je zelenkasto ili žućkasto, duljine oko 5 mm, a širine oko 2 mm. Klijanje se odvija od kraja travnja do kraja lipnja, dok isto dozrijeva od početka listopada do prosinca.<sup>13</sup>



**Slika 4.** Morfološke karakteristike motra<sup>14</sup>

Iako je cijela biljka motra jestiva, najčešće se konzumiraju listovi koji su bogati karotenoidima, polifenolima, vitaminom C te ostalim bioaktivnim spojevima. Motar su zbog visoke koncentracije vitamina C konzumirali mornari kao prirodni lijek za prevenciju oboljevanja od skorbuta. Također, biljka se učestalo koristila za liječenje nadutosti i probavnih tegoba te u liječenju tegoba urinarnog trakta. Listovi se mogu upotrebljavati kao začim u brojnim jelima, jesti u svježem ili ukiseljenom obliku.<sup>15,16</sup>

Nutritivni sastav motra prikazan je u tablici 2.

**Tablica 2.** Hranidbena vrijednost motra na 100 grama svježe biljke<sup>16</sup>

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| <b>Energetska vrijednost</b> | 26 kcal |
| <b>Voda</b>                  | 88,87 g |
| <b>Masti</b>                 | 0,39 g  |
| <b>Proteini</b>              | 0,31 g  |
| <b>Ugljikohidrati</b>        | 2,48 g  |
| <b>Vlakna</b>                | 5,70 g  |
| <b>Pepeo</b>                 | 2,25 g  |

Ulje dobiveno iz listova motra sadrži visoke koncentracije  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina, dok je sastav ulja dobivenog iz sjemenki sličan sastavu ulja masline. Kultivacija i proizvodnja motra predstavlja velik ekonomski potencijal jer se njegova eterična ulja zbog ljekovitih svojstava mogu koristiti u farmaceutskoj i medicinskoj industriji.<sup>15</sup>

U tablici 3 prikazana je usporedba sadržaja pojedinih iona između divljeg i kultiviranog motra. Vidljivo je da je u samoniklim jedinkama viši sadržaj natrija i kalcija, a niži sadržaj kalija i magnezija što može biti rezultat toga što su na morskim obalnim staništima biljke izložnije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  ionima. Iako kalij nije sastavni dio biljnih struktura potreban je biljkama u visokim koncentracijama za različite metaboličke procese. Stoga, veća količina natrija u divljim jedinkama motra može biti odgovor biljke za ublažavanje negativnih učinaka niže razine kalija.<sup>16</sup>

**Tablica 3.** Prosječni sadržaj iona metala u divljem i kultiviranom motru<sup>16</sup>

| Tip motra   | Na <sup>+</sup> (mg/100 g) | K <sup>+</sup> (mg/100 g) | Mg <sup>2+</sup> (mg/100 g) | Ca <sup>2+</sup> (mg/100 g) |
|-------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Divlji      | 291                        | 335                       | 28                          | 310                         |
| Kultivirani | 168                        | 588                       | 41                          | 250                         |

**Tablica 4.** Prosječni sastav vitamina C, flavonoida, ukupnih polifenola i karotenoida u nadzemnim dijelovima motra<sup>13,17</sup>

| Spoj              | Mjerna jedinica        | Vrijednost |
|-------------------|------------------------|------------|
| Vitamin C         | mg/100 g svježe biljke | 76,6       |
| Flavonoidi        | mg/100 g suhe biljke   | 230,0      |
| Tanini            |                        | 680,0      |
| Ukupni polifenoli |                        | 230,0      |
| Karotenoidi       |                        | 33,8       |

Motar sadrži i velike količine eteričnog ulja koje mogu značajno varirati između različitih dijelova biljke pa je tako sadržaj eteričnog ulja u lišću oko 0,5%, u stabljici je znatno niži, dok udio ulja u cvijetu može biti viši i od 2%.<sup>18</sup>

Motar u usporedbi s ostalim halofitima ima znatno viši sadržaj fenolnih spojeva od kojih dominiraju klorogenska kiselina i ostale fenolne kiseline. Ipak, sadržaj ukupnih fenola u biljci može značajno varirati ovisno o razdoblju vegetacije. Utvrđeno je da je tijekom travnja ekstrakt motra sadrži najveću količinu fenola i najvišu koncentraciju klorogenske kiseline u odnosu na ostale mjesece u kojima je biljka uzorkovana.<sup>18</sup>

### 1.1.2. Motar kao predmet znanstvenih istraživanja

Posljednjih godina provedena su različita znanstvena istraživanja na motru u kojima je ispitan kemijski sastav pojedinih dijelova biljke tijekom različitih perioda vegetacije, sastav njegovog eteričnog ulja te antimikrobno i antibakterijsko djelovanje pojedinih dijelova biljke ili biljnih izolata.

Generalić Mekinić i sur.<sup>19</sup> su ispitivali kemijski profil etanolnih ekstrakata i eteričnog ulja motra te je potvrđeno je da su dominantni spojevi u ulju limonen (58 – 74%), a u ekstraktima klorogenska kiselina (0,7 – 8,1 mg/g). Dobivenim uzorcima je testirana sposobnost inhibicije acetilkolinesteraza, antioksidacijska i vazodilacijska aktivnost te je dokazana poveznica između testiranih aktivnosti i koncentracije dominantnih spojeva, i u ulju i u ekstraktu.

Maleš i sur.<sup>20</sup> su ispitivali sastav flavonoida, tanina i ukupnih polifenola u uzorcima motra uzorkovanim na tri geografski odvojene lokacije duž Jadranske obale te u različitim periodima vegetacije. Sadržaj flavonoida u istraživanim uzorcima se kretao od 0,08 do 0,42%, sadržaj tanina od 0,1 do 2,7%, dok je sadržaj ukupnih polifenola iznosio od 4,7 do 9,5%. Najveći sadržaj flavonoida pronađen je u uzorku branom prije cvatnje, dok je najveći sadržaj tanina i ukupnih polifenola dokazan prije i na samom početku cvatnje.

Istraživanja su pokazala da motar zajedno sa ostalim halofitima pokazuje visoku antioksidacijsku aktivnost što omogućuje potencijalnu primjenu halofita u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Međutim, Meot-Duros i sur.<sup>21</sup> su dokazali da postoje razlike između populacija motra koje rastu na različitim staništima. Motar koji raste na pješćano-brdovitom području ima veći sadržaj klorogenske kiseline u odnosu na motar koji raste na stjenovitom području. Očekivano, populacija motra sakupljena sa pješćano-brdovitog područja pokazala je veću antioksidacijsku aktivnost.

Mihajlovski<sup>22</sup> je ispitala fenolni profil ekstrakta motra tijekom različitih perioda vegetacije uslijed čega se pokazalo da najmanje ukupnih fenola sadrži lišće motra ubranog u kolovozu (1240 mg GAE/L), a najviše lišće motra ubranog u travnju (2215 mg GAE/L).

Lončar<sup>23</sup> je korištenjem dviju antioksidacijskih metoda, metode DPPH i FRAP metode, ispitala biološku aktivnost ekstrakta motra iz različitih perioda vegetacije. FRAP metodom je najbolju redukcijsku snagu pokazao ekstrakt motra iz travnja, dok je ekstrakt motra iz kolovoza imao najslabije djelovanje. Najbolju inhibiciju DPPH radikala su pokazali ekstrakti iz travnja (53%) i lipnja (58%).

Dokazano je da eterično ulje motra sadrži nekoliko značajnih hlapljivih spojeva kao što su limonen,  $\alpha$ -pinen, sabinen, terpinen, timol i karvakrol koji su zaslužni za aromatične note koje podsjećaju na celer, komorač i koru zelenih agruma. Također, eterično ulje motra je pokazalo i dobro antibakterijsko djelovanje. Ipak, sadržaj eteričnog ulja motra može varirati ovisno o različitim čimbenicima pa tako količina eteričnog ulja iz sjemenki motra iznosi oko 0,8%, dok se ista u lišću kreće od 0,15 do 0,3%. Velik utjecaj na karakteristike eteričnog ulja ima i podrijetlo same biljke, faza njenog životnog ciklusa i period branja.<sup>24,25</sup>

Senatore i sur.<sup>26</sup> su ispitivali eterična ulja izolirana iz svježih nadzemnih dijelova motra koji raste na području Turske i u njihovom istraživanju udio ulja bio je 0,17 – 0,19%, a u uzorcima je identificirano oko 20 različitih komponenata. U jednom uzorku dominantan su bili  $\beta$ -felandren (30%) i timol etil eter (25%), dok su u drugom prevladavali  $\gamma$ -terpinen (24%) i dilapiol (21%). Vrlo dobra antibakterijska aktivnost, posebice prema gram-pozitivnim vrstama je također dokazana u ovom istraživanju.

Özcan i sur.<sup>27</sup> su istraživali eterična ulja izolirana iz nadzemnih dijelova motra sakupljenih na dvije lokacije na području Turske. Kemijski profil ulja analiziran je tehnikom plinske kromatografije te su u njima identificirana 23 različita spoja od kojih su najzastupljeniji bili spojevi iz grupe monoterpena (89 – 99%), i to  $\gamma$ -terpinen,  $\beta$ -felandren i sabinen.

Zbog visokog sadržaja  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina konzumacija motra bi mogla imati blagotvorne učinke u prevenciji koronarnih srčanih bolesti. Motar pokazuje i citotoksično djelovanje na određene stanice tumora te vrlo dobro antimikrobno djelovanje protiv patogenih bakterija. U istraživanju antifungalnog djelovanja eteričnog ulja motra protiv

mikropatogene gljive *Mycogone perniciosa*, isto je pokazalo bolju antifungalnu aktivnost u usporedbi s komercijalnim fungicidom.<sup>19,28</sup>

Kao što je prethodno spomenuto, motar se kao halofitna biljka svojom građom prilagođava slanim uvjetima, a karakterizira ga i visoka tolerantnost na vodeni stres te visoke i niske temperature. Međutim, u literaturi je dostupno malo podataka o mogućim tehnikama uzgoja. Poznato je da čimbenici poput temperature, saliniteta i svjetlosti imaju značajan utjecaj na proces klijanja sjemena i proizvodnju presadnica motra. Utvrđeno je da upotreba crvenog svjetla i spojeva na bazi dušika može značajno potaknuti i ubrzati proces klijanja te da prethodna obrada sjemena L-askorbinskom kiselinom ili etanolom može poboljšati klijavost sjemena za 30%. Kultivacija i uzgajanje motra na zaslanjenim tlima je vrlo laka, a preporučuje se uzgajanje iz presadnica. Mladi motar mora se navodnjavati morskom vodom ili blago slanom vodom. Utvrđeno je da proizvodnja sadnica motra *in vitro* tehnikama nema negativnog utjecaja na performance rasta korijena i biljke.<sup>10,15,29</sup>

## **1.2. Ekstrakcija**

Ekstrakcija je tehnološki postupak potpunog ili djelomičnog razdvajanja smjese tvari.<sup>30</sup>

Postoje konvencionalne i nekonvencionalne metode ekstrakcije. Konvencionalne metode ekstrakcije (destilacija, postupak hladnog prešanja i ekstrakcija otapalima) su skupi i dugotrajni procesi koji su vrlo često slabe učinkovitosti te su popraćeni nepoželjnim i degradacijskim reakcijama. Osim toga zbog brojnih ekoloških čimbenika i smanjenja štetnih utjecaja otapala na zdravlje sve češće se koriste nekonvencionalne metode, odnosno tzv. “zelene” tehnike ekstrakcije.<sup>31</sup>

Ove metode ekstrakcije ubrzavaju sam proces, ali zahtijevaju i veća investicijska ulaganja. Neke od nekonvencionalnih metoda ekstrakcije su ekstrakcija superkričnim kapljevinama, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija pod visokim tlakom, ekstrakcija na čvrstoj fazi, mikrovalna ekstrakcija, itd., a neki od ovih postupaka se već uspješno koriste za izolaciju bioaktivnih spojeva iz različitih materijala u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.<sup>31,32</sup>

### **1.2.1. Mikrovalna ekstrakcija**

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja u frekvencijskom rasponu 1 – 300 GHz. Mikrovalovi imaju široku primjenu u različitim granama industrije; mobilnoj industriji, radarskoj tehnici, bežičnoj mreži, prehrambenoj industriji i drugdje. U procesu zagrijavanja hrane u mikrovalnim pećnicama koje rade na principu energije mikrovalova, mikrovalovi zagrijavaju vodu, a da pritom ne dolazi do promjena u strukturi hrane što je moguće zbog njihovog ograničenog energetskog potencijala.<sup>33,34</sup>

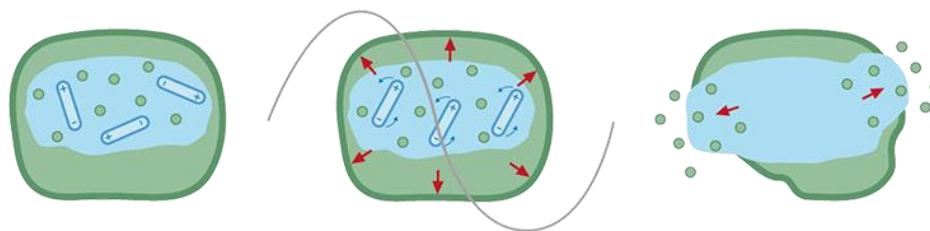


Mikrovalna ekstrakcija (engl. *Microwave Assisted Extraction*, MAE) je nekonvencionalna tehnika koja se temelji na dielektričnom zagrijavanju matriksa upotrebom mikrovalova. Apsorpcija mikrovalne energije ovisi o dielektričnim konstantama kemijskih spojeva tako da veća vrijednost dielektrične konstante znači veću vrijednost apsorpcije i samim time bolju pretvorbu mikrovalne energije u toplinu. Za razliku od konvencionalnih metoda kod kojih se na uzorak energija prenosi zračenjem iz vanjskog medija, kod MAE energija mikrovalova ima izravnu interakciju s elektromagnetskim poljem čime dolazi do zagrijavanja. Stoga se može zaključiti da kod klasičnih metoda toplina prelazi s medija za zagrijavanje u unutrašnjost materijala, dok se kod mikrovalne ekstrakcije proces zagrijavanja odvija unutar ozračenog medija.<sup>34,35</sup>



**Slika 5.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju<sup>36</sup>

Mikrovalno zagrijavanje se temelji na dva mehanizma, a to su ionska vodljivost i rotacija dipola. Ionska vodljivost predstavlja migraciju iona pod djelovanjem promjene električnog polja pri čemu nastaje otpor koji uzrokuje trenje, dok se rotacija dipola odnosi na poravnanje polova molekule i električnog polja koje se brzo mijenja. Kretanjem otopljenih iona dolazi do povećanja prodiranja otapala u materiju čime se potiče otapanje.<sup>35</sup>



**Slika 6.** Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja<sup>37</sup>

Postupak MAE koja se provodi s otapalom može se opisati pomoću 6 koraka:<sup>35</sup>

- Prodiranje otapala u krutu maticu
- Solubilizacija i/ili razgradnja sastavnica
- Transport otapala čvrste tvari unutarnjom difuzijom
- Migracije ekstrahirane topline vanjskom difuzijom
- Kretanje ekstrakta u odnosu na krutu tvar
- Odvajanje i ispuštanje ekstrakta i krute tvari.

Učinkovitost MAE ovisi o temperaturi, izboru otapala, veličini i raspodjeli čestica, vremenu ekstrakcije, primijenjenoj snazi mikrovalova i drugim čimbenicima.<sup>30</sup> U procesu mikrovalne ekstrakcije mora se točno definirati temperatura kako ne bi došlo do razgradnje termo-osjetljivih spojeva. Ako je optimalna temperatura koja se koristi uvjetovana dobro odabranom snagom mikrovalova, bolji učinak ekstrakcije postiže se povećanjem temperature.<sup>35,38</sup>

Veličina čestica medija koji se podvrgava postupku mikrovalne ekstrakcije najčešće je u rasponu od 100  $\mu\text{m}$  do 2 mm. Iako se povećanjem kontaktne površine povećava učinkovitost ekstrakcije, čestice malih dimenzija uzrokuju otežano odvajanje biljnog materijala i otapala nakon postupka ekstrakcije.<sup>38</sup> Izbor otapala temelji se na topljivosti ekstrakta, sposobnosti otapala da upija mikrovalove i o mogućoj interakciji između otapala i matriksa. Pogodna otapala su metanol, voda i etanol jer imaju visoku dielektričnu konstantu i dobro upijaju energiju mikrovalova. Trajanje ekstrakcije ovisi o svojstvima uzorka i otapala, a postupak najčešće traje od 15 do 20 minuta.<sup>35</sup>

### **1.2.2. Prednosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima**

Dostupne su dvije vrste sustava MAE, a to su ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku i ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranoj temperaturi i tlaku.<sup>39,40</sup> Ekstrakcija u zatvorenoj posudi zbog povećanja tlaka unutar posude omogućava razvoj viših temperatura što smanjuje vrijeme trajanja procesa. Kod ove vrste sustava potrebna je i manja količina otapala, a izbjegnuta je opasnost od kontaminacije i gubitak hlapljivih tvari. Negativne karakteristike zatvorenog sustava su ograničenje količine uzorka, opasnost od eksplozije uzrokovane povišenjem tlaka, negativan učinak visokih temperatura na konstrukcijske materijale i nemogućnost dodatka reagensa tijekom procesa. S druge strane, ekstrakcija u otvorenoj posudi omogućava korištenje posuda od različitih materijala, uklanjanje viška otapala, dodatak reagensa tijekom procesa te obradu veće količine uzorka. Rad u ovim sustavima je najčešće potpuno automatiziran, a cijena opreme niža. Nedostatci su manja preciznost zbog potencijalnih gubitaka, nemogućnost obrade više uzoraka istovremeno i dulje trajanje procesa.<sup>39</sup>

Općenito, osnovni čimbenici koji ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima čine boljom i učinkovitijom od ostalih metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva su manji rizik od termičke degradacije spojeva prisutnih u matriksu, uporaba manjih količina otapala, kraće vrijeme trajanja ekstrakcije te bolja prevencija od onečišćenja.

Prednosti mikrovalne ekstrakcije u usporedbi sa Soxhlet ekstrakcijom su znatno kreće trajanje mikrovalne ekstrakcije (obično 30 minuta) što rezultira manjim utroškom energije. Također, ne dolazi do gubitka energije zbog ciljanog i selektivnog načina zagrijavanja. Kod mikrovalne ekstrakcije ne postoje ograničenja kod odabira otapala, odnosno mogu se koristiti i polarna i nepolarna otapala te se mogu izdvojiti i sastojci koji su u uzorku prisutni u tragovima.<sup>30,35</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog rada su korišteni uzorci motra prikupljeni u svibnju 2021. godine na tri različite lokacije na području Omiša (slika 7). Prvi biljni materijal (žuto) je uzorkovan na najdaljem nalazištu biljke uz tok rijeke Cetine, drugi materijal (crveno) je uzorkovan na samom ušću rijeke Cetine, dok je treći materijal (zeleno) prikupljen na izrazito morskom staništu.



Slika 7. Područja uzorkovanja motra<sup>41</sup>



**Slika 8.** Uzorci motra prikupljeni uz rijeku (a), na ušću (b) i uz more (c)

## 2.2. Postupak ekstrakcije

Uzorci motra su u laboratoriju prije postupka ekstrakcije podvrgnuti postupku predobrade koji je uključivao čišćenje i odvajanje suhih listova i drvenastih dijelova biljke te uklanjanje različitih nečistoća s biljnog materijala njegovim ispiranjem vodovodnom vodom.

Prije ekstrakcije uzorci motra su liofilizirani (FD-1D-50; Shanghai Bilon Instrument Co. Ltd, Shanghai, PRC) te je za svaki postupak ekstrakcije odvagano po 20 g homogeniziranog biljnog materijala. Biljni materijal je zatim prebačen u tikvicu s okruglim dnom te mu je dodana destilirana voda tako da je omjer uzorka i vode u konačnici bio 1:10. Na taj način pripremljeni uzorci podvrgnuti su postupku ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE Ethos X, Milestone Srl, Italy, slika 9).



**Slika 9.** Korišteni uređaj za mikrovalnu ekstrakciju

Za ekstrakciju potpomognute mikrovalovima postavljeni su sljedeći parametri: temperatura  $94^{\circ}\text{C}$ , snaga mikrovalova 500 W te vrijeme trajanja ekstrakcije 30 minuta. Nakon završetka ekstrakcije smjesa zaostala u tikvici je profiltrirana, a dobiveni bistri ekstrakt je skladišten na temperaturi od  $+4^{\circ}\text{C}$  do analiza.

### 2.3. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu metoda zasniva se na oksidaciji fenolnih grupa do kinona dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa pri čemu se stvara plavo obojeni produkt. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri 765 nm i direktno je proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u uzorku.<sup>42</sup>

#### Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens.
- Zasićena otopina natrijevog karbonata;  $w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 20\%$ .
- Otopine klorogenske kiseline,  $c = 1000 \text{ mg/L}$ .

#### Izrada umjernog pravca:

Za izradu umjernog pravca prema opisanom postupku određivanja testiraju se otopine klorogenske kiseline koncentracija 50 – 1000 mg/L.

#### Postupak određivanja:

U kivetu se doda 25  $\mu\text{L}$  uzorka, 1,975 mL destilirane vode i 125  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Smjesa se dobro promiješa te joj se nakon 1 minute doda 375  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nakon čega se otopina ostavi stajati tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Apsorbancija reakcijske smjese se očitava pri valnoj duljini od 765 nm, a konačni rezultat računa se preko jednadžbe umjernog pravca dobivene za otopine klorogenske kiseline ( $y=0,0007x-0,0026$ ) i izražava kao mg ekvivalenata klorogenske kiseline po 1 L ekstrakta (mg CA/L).



## 2.4. Određivanje ukupnih tanina

Ukupni tanini određuju se vanilin metodom prema Julkunen-Titto (1985). Kod ove metode flavonoidi s reaktivnom floroglucinol strukturom reagiraju s vanilinom pri čemu nastaje obojeni produkt koji se određuje kolorimetrijski.<sup>43</sup>

### Reagensi:

- Otopina vanilina, w (vanilina) = 4%.

### Izrada umjernog pravca:

Za izradu umjernog pravca prema opisanom postupku određivanja testiraju se otopine katehina koncentracija 25 – 500 mg/L.

### Postupak određivanja:

U kivetu se doda 50  $\mu$ L uzorka, 1,5 mL otopine vanilina i 750  $\mu$ L koncentrirane klorovodične kiseline. Sve se dobro promiješa i ostavi na mračnom mjestu 20 minuta, nakon čega se očita apsorbancija pri valnoj duljini od 500 nm.

Udio tanina se računa preko jednadžbe umjernog pravca ( $y=0,0009x+0,0167$ ) dobivene testiranjem otopina katehina različitih koncentracija (25 – 500 mg/L) prema postupku određivanja. Konačni rezultat se izražava u miligramima ekvivalenta katehina po 1 L ekstrakta (mg KE/L).

## 2.5. Određivanje ukupnih flavonoida

Udio ukupnih flavonoida određen je pomoću kolorimetrijske metode. Reagensi korišteni u metodi su natrijev nitrit i aluminijev klorid pri čemu dolazi do nastanka žutog obojenja čiji se intenzitet mjeri pri 510 nm.<sup>44</sup>

### Reagensi:

- Otopina aluminijeva klorida, w (AlCl<sub>3</sub>) = 10%.
- Otopina natrijeva nitrita, w (NaNO<sub>2</sub>) = 5%.
- Otopina natrijevog hidroksida, c (NaOH) = 1 mol/L.

### Izrada umjernog pravca:

Za izradu umjernog pravca prema opisanom postupku određivanja testiraju se otopine kvercetina koncentracija 25 – 500 mg/L.

### Postupak određivanja:

U kivetu se otpipetira 250 μL uzorka, 1,525 mL vode i 75 μL otopine natrijevog nitrita. Otopina odstoji 6 minuta nakon čega joj se doda 150 μL otopine AlCl<sub>3</sub>. Otopina ponovno odstoji 5 minuta nakon čega se doda 500 μL otopine NaOH i odmah mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm.

Ukupni flavonoidi se računaju preko jednadžbe umjernog pravca ( $y=0,002x+0,027$ ) dobivenog testiranjem otopina kvercetina prema opisanom postupku, a konačni rezultat izražava se u mg kvercetina po 1 L ekstrakta (mg QE/L).

## 2.6. Određivanje klorogenske kiseline

Klorogenska kiselina u uzorcima je određena primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije u kombinaciji s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD Ultimate 3000, Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Separacija fenolnih spojeva je provedena korištenjem Synchronis™ C18 kolone (250×4,6 mm, 5 μm, Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), dok su kao otapala korištene smjese 0,2% otopine mravlje kiseline (A), acetonitrila (B) i metanol (C). Trajanje metode je 80 min, a program gradijentne elucije je prikazan u tablici 5. Temperatura kolone je 25°C, protok otapala 0,8 mL/min, a volumen injektiranog uzorka 10 μL.

**Tablica 5.** Program gradijentne elucije

| <b>t, min</b> | <b>Otapalo A, %</b> | <b>Otapalo B, %</b> | <b>Otapalo C, %</b> |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 0             | 96                  | 2                   | 2                   |
| 40            | 50                  | 25                  | 25                  |
| 45            | 40                  | 30                  | 30                  |
| 60            | 0                   | 50                  | 50                  |
| 68            | 0                   | 50                  | 50                  |
| 70            | 96                  | 2                   | 2                   |
| 80            | 96                  | 2                   | 2                   |

Klorogenska kiselina je identificirana usporedbom retencijskog vremena spoja s onim dobivenim za standard kao i usporedbom UV-Vis spektra spoja, dok je kvantifikacija urađena preko jednadžbe baždarnog pravca dobivenog za standard ( $y=1,7907x+0,7715$ ,  $R^2=0,9996$ ).

## 2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

### 2.7.1. DPPH metoda

DPPH metoda je jedna od najkorištenijih metoda za određivanje antioksidacijske, odnosno antiradikalne aktivnosti različitih uzoraka. Metoda se temelji na redukciji 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil slobodnog radikala koji u prisutnosti antioksidansa, odnosno elektron donora, mijenja boju iz ljubičaste u žutu. Navedeni proces prati se spektrofotometrijski pri 517 nm.<sup>45</sup>

#### Reagensi:

- Etanolna otopina DPPH radikala apsorbancije  $1,2 \pm 0,05$ .

#### Postupak određivanja:

U kivetu se doda 2 mL otopine DPPH reagensa te se očita apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 517 nm ( $A_{C(0)}$ ). Potom se u kivetu otpipetira 50  $\mu$ L uzorka. Reakcijska smjesa odstoji 1 sat nakon čega joj se ponovno izmjeri apsorbancija ( $A_{A(t)}$ ). Konačni rezultat, odnosno inhibicija slobodnog radikala računa se prema izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)})/A_{C(0)}] \times 100$$

gdje je,

$A_{C(0)}$  – apsorbancija otopine DPPH radikala bez dodatka uzorka,  $t = 0$  minuta

$A_{A(t)}$  – apsorbancija reakcijske smjese nakon sat vremena od dodatka uzorka,  $t = 1$  h.

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom korišteni ekstrakti su razrijeđeni 10 puta.

### 2.7.2. FRAP metoda

Metoda FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) služi za određivanje redukcijske sposobnosti uzorka, odnosno antioksidansa da reducira  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Ioni nastali u reakciji reagiraju s 2,4,6-tripiridil-*s*-triazin reagensom (TPTZ) pri čemu dolazi do promjene bolje reakcijske smjese iz žute u plavu što se prati pri 593 nm.<sup>45</sup>

#### Reagensi:

- Otopina klorovodične kiseline,  $c(\text{HCl}) = 40 \text{ mmol/L}$ .
- Acetatni pufer,  $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH} = 3,6$ .
- Otopina željezovog(III) klorida,  $c(\text{FeCl}_3) = 20 \text{ mol/L}$ .
- Otopina 2,4,6-tripiridil-*s*-tirazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl.

FRAP reagens: 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine  $\text{FeCl}_3$  i 2,5 mL otopine TPTZ-a.

#### Izrada umjernog pravca:

Za izradu umjernog pravca prema opisanom postupku određivanja testiraju se otopine Fe(II) iona koncentracija 25 – 1000 mg/L.

#### Postupak određivanja:

U kivetu se doda 3 mL FRAP reagensa, a zatim se očita apsorbancija reagensa pri valnoj duljini od 593 nm. Otpipetira se još 100  $\mu\text{L}$  uzorka pri čemu se pojavljuje plavo obojenje kojemu se očita apsorbancija nakon 4 minute. Razlika između konačne vrijednosti apsorbancije i vrijednosti apsorbancije očitane prije dodatka uzorka označava promjenu apsorbancije.

Konačni rezultat računa se preko jednadžbe umjernog pravca ( $y=0,0007x+0,0037$ ) dobivene za otopinu Fe (II) iona, a izražava se kao  $\mu\text{M}$  ekvivalenata Fe (II).

### 2.7.3. NO• metoda

Kod NO• metode dušikov oksid se u vodenoj otopini kod fiziološkog pH spontano stvara iz nitroprusida. Oksid koji nastaje u ovoj reakciji reagira s kisikom pri čemu nastaju nitritni ioni koji se određuju pomoću Griessovog reagensa. Tzv. *hvatači*, odnosno antioksidansi, natječu se s kisikom što u konačnici rezultira smanjenjem nastanka nitritnih iona i direktna je mjera antioksidacijskog potencijala uzoraka.<sup>46</sup>

#### Reagensi:

- Otopina natrij-nitroprusida, c = 10 mmol/L
- Griess reagens

#### Postupak određivanja:

U epruvetu se doda 0,5 mL ekstrakta i 0,5 mL otopine natrij-nitroprusida te se sve stavi na inkubaciju pri 37 °C nakon čega se stavi na mračno mjesto tijekom 20 minuta. Po završetku prethodnih koraka se u otopinu uzorka doda 1 mL Griess reagensa i nakon 40 minuta izmjeri apsorbancija pri 546 nm.

$$\% \text{ inhibicije NO}^\bullet = [(A_{SP} - A_E)/A_{SP}] \times 100$$

gdje je,

$A_{SP}$  – apsorbancija slijepe probe

$A_E$  – apsorbancija uzorka.

Prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti NO• metodom korišteni su ekstrakti razrijeđeni 10 puta.

## **2.8. Statistička obrada podataka**

U ovom radu svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Za određivanje odnosa između varijabli korišten je Pearsonov korelacijski koeficijent i statistički program GraphPad InStat3 package (Version 4.03 for Windows, GraphPad Software, San Diego, SAD).

### **3. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti razliku u sadržaju ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonoida te klorogenske kiseline kao i razliku u antioksidacijskoj aktivnosti testiranoj korištenjem tri metode (FRAP, NO• i DPPH metoda) između ekstrakata motra prikupljenog na tri različita područja. U radu su analizirani sljedeći uzorci:

**A** – vodeni ekstrakt motra prikupljenog uz rijeku Cetinu

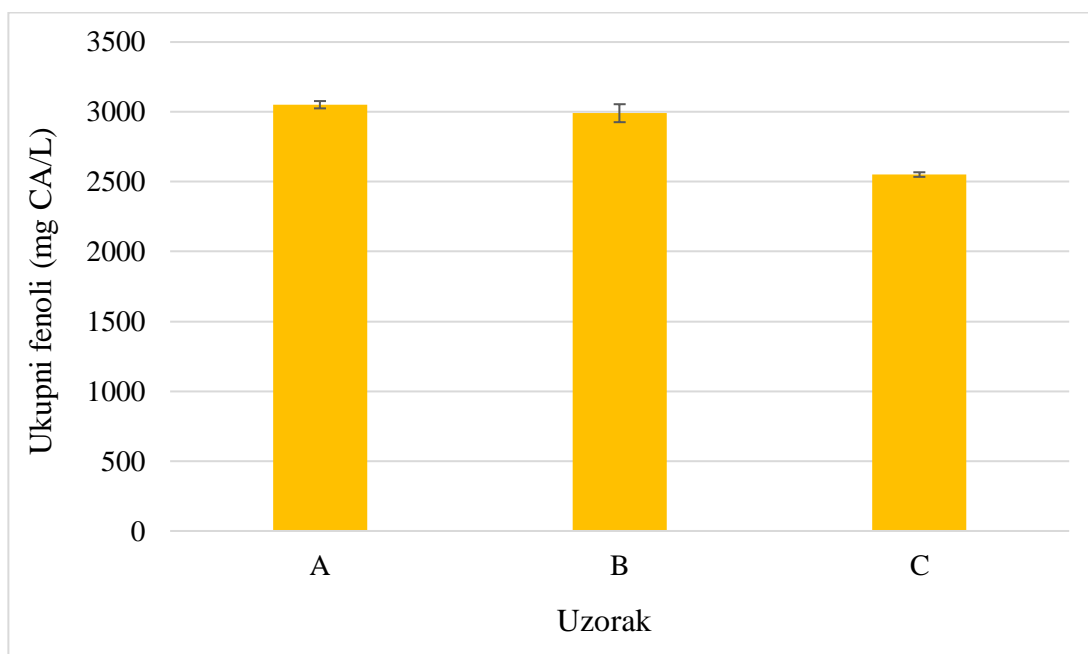
**B** – vodeni ekstrakt motra prikupljenog na ušću rijeke Cetine

**C** – vodeni ekstrakt motra prikupljenog uz more.



### 3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Na slici 10 prikazani su rezultati određivanja ukupnih fenola korištenjem Folin-Ciocalteu metode izraženi u mg CA/L ekstrakta iz kojih se može primijetiti neznatna razlika u sadržaju ukupnih fenola kod uzorka A (3051 mg CA/L) i uzorka B (2991 mg CA/L), dok je kod C uzorka detektirana koncentracija fenola dosta niža (2551 mg CA/L).



mg CA/L- miligrami ekvivalenta klorogenske kiseline po 1 L ekstrakta

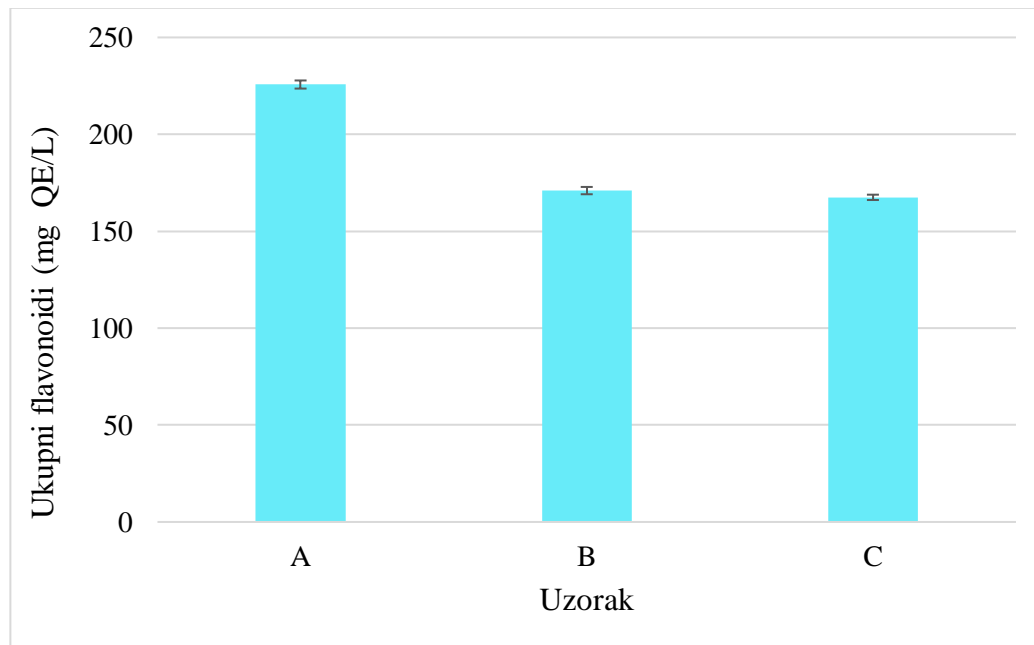
**Slika 10.** Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola u ekstraktima motra prikupljenog na tri različita područja

### 3.2. Rezultati određivanja ukupnih tanina

Sadržaj tanina određen je vanilin metodom, a koncentracija je izračunata korištenjem umjernog pravca dobivenog za katehin. Rezultati određivanja ukupnih tanina pokazali su odsutnost ove grupe spojeva u svim uzorcima.

### 3.3. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida

Na slici 11 prikazani su rezultati određivanja koncentracije ukupnih flavonoida izraženih u mg QE/L. Vidljivo je da kod ekstrakata B i C nema značajne razlike između koncentracija ukupnih flavonoida, dok je kod ekstrakta A koncentracija ukupnih flavonoida nešto veća. Koncentracija ukupnih flavonoida za ekstrakt motra prikupljenog uz rijeku Cetinu iznosi 225,7 mg QE/L, za ekstrakt motra prikupljenog na ušću Cetine iznosi 171,0 mg QE/L, a za ekstrakt motra prikupljenog uz more 167,5 mg QE/L.

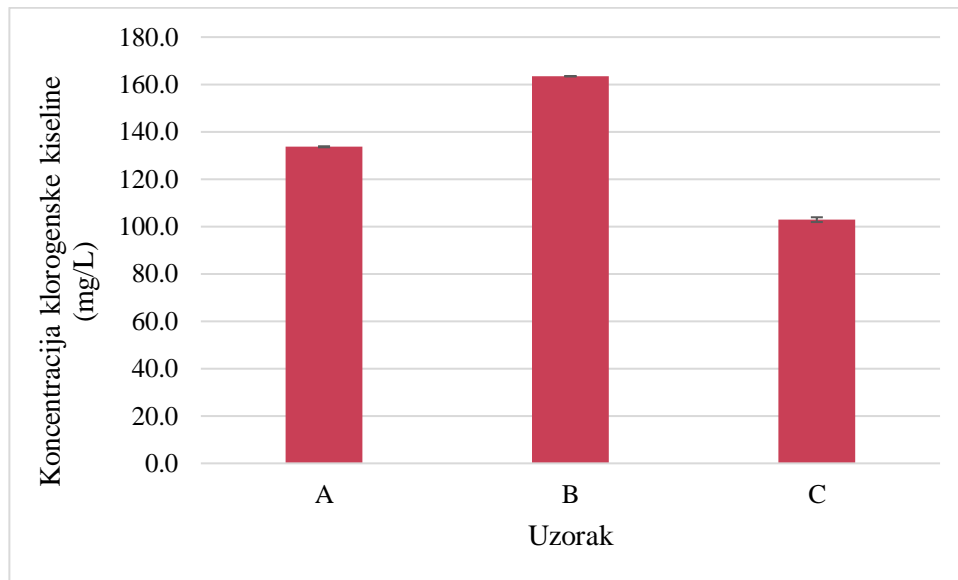


mg QE/L – miligrami ekvivalenta kvercetina po 1 L ekstrakta

**Slika 11.** Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima motra prikupljenog na tri različita područja

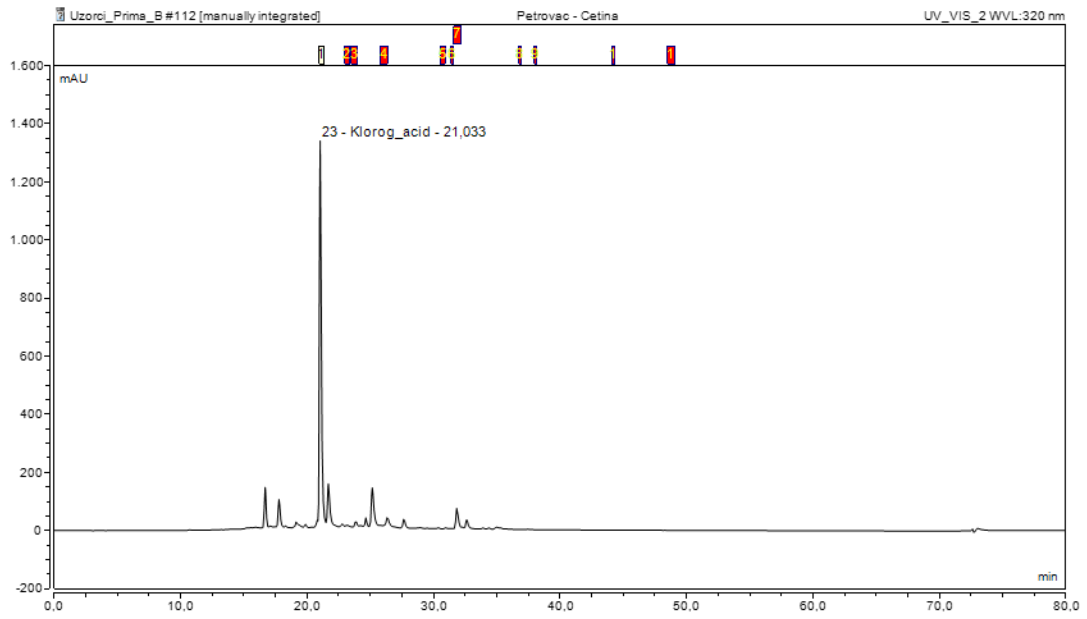
### 3.4. Rezultati određivanja klorogenske kiseline

Na slici 12 prikazani su rezultati određivanja koncentracije klorogenske kiseline izražene u mg/L. Iz rezultata je vidljivo da ekstrakt motra prikupljenog na ušću rijeke Cetine sadrži najveću koncentraciju klorogenske kiseline (163,5 mg/L), zatim ekstrakt motra prikupljenog uz rijeku Cetinu (133,7 mg/L), a najmanju koncentraciju klorogenske kiseline ima ekstrakt motra prikupljenog uz more (102,9 mg/L).



**Slika 12.** Usporedni prikaz rezultata određivanja koncentracije klorogenske kiseline u ekstraktima motra prikupljenog na tri različita područja

Na slici 13 je prikazan kromatogram HPLC analize ekstrakta motra iz kojeg je vidljiva dominacija klorogenske kiseline (izlazi na retencijskom vremenu od 21 min) u uzorku (najviši pik kromatograma) u odnosu na ostale spojeve koji su prisutni.

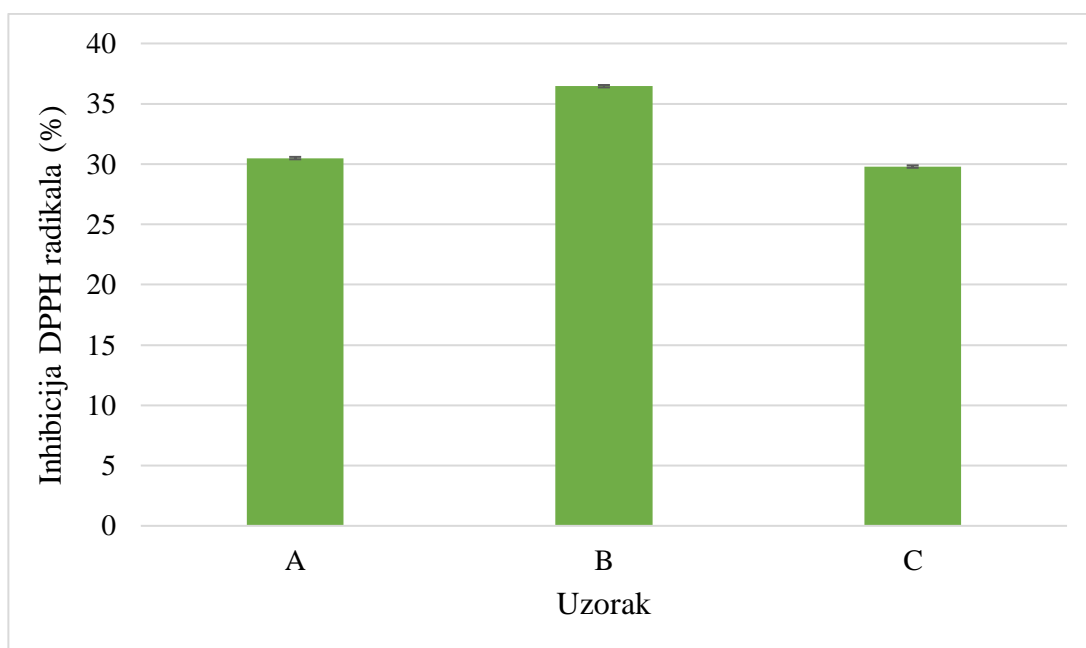


**Slika 13.** Kromatogram HPLC analize motra

### 3.5. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

#### DPPH metoda

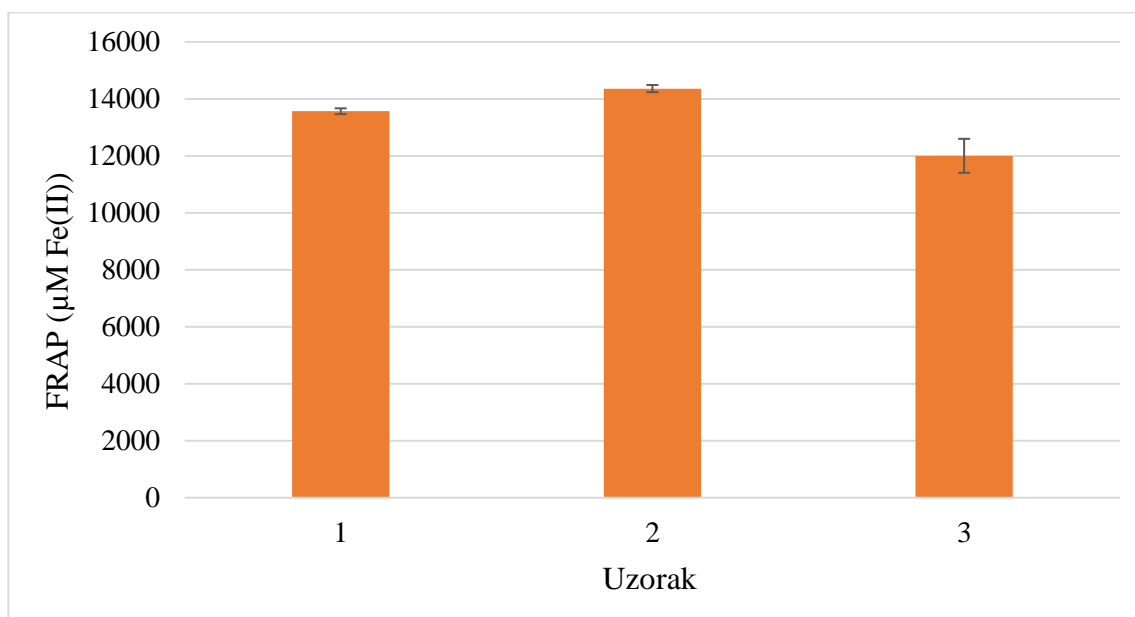
Na slici 14 su prikazani rezultati antioksidacijske aktivnosti istraživanih uzoraka dobiveni DPPH metodom iz kojih je vidljivo da su ekstrakti A i C pokazali približno jednaku antioksidacijsku aktivnost ovom metodom, dok je kod B uzorka aktivnost bila nešto bolja. Postotak inhibicije DPPH radikala za motar prikupljen uz rijeku Cetinu je iznosio 30,5%, za motar prikupljen na ušću rijeke Cetine 36,5%, a za motar prikupljen uz more 29,8%.



**Slika 14.** Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti korištenjem DPPH metode u ekstraktima motra prikupljenog na tri različita područja

#### FRAP metoda

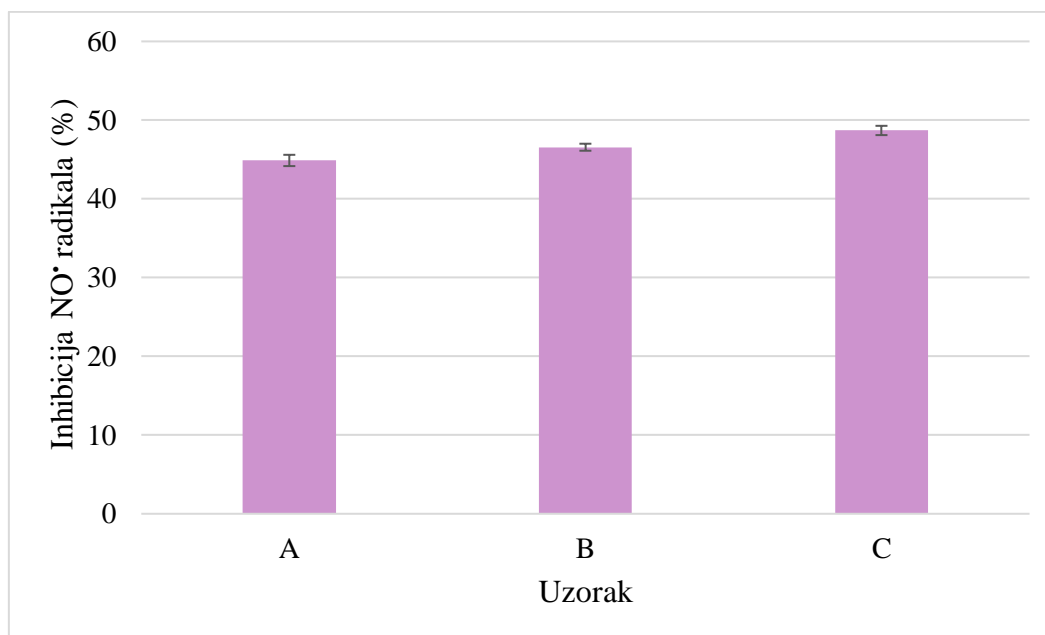
Rezultati dobiveni FRAP metodom izraženi su kao  $\mu\text{M Fe(II)}$  i prikazani na slici 15 iz koje je vidljivo da su ekstrakti A i B imali približno jednake vrijednosti antioksidacijske aktivnosti, dok je kod C uzorka zabilježena aktivnost nešto manja. Za uzorak motra prikupljen uz rijeku Cetinu FRAP vrijednost je iznosila  $13565 \mu\text{M Fe(II)}$ , za uzorak motra prikupljen na ušću rijeke Cetine  $14361 \mu\text{M Fe(II)}$  te za uzorak motra prikupljen uz more  $12001 \mu\text{M Fe(II)}$ .



**Slika 15.** Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti korištenjem FRAP metode u ekstraktima motra prikupljenog na tri različita područja

### **NO<sup>•</sup> metoda**

Rezultati dobiveni NO• metodom izraženi su preko inhibicije NO• radikala (u postotcima) i prikazani na slici 16. Sa slike je vidljivo da je ekstrakt motra prikupljenog uz rijeku Cetinu pokazao postotak inhibicije NO• radikala 44,9%, onaj prikupljen na ušću rijeke Cetine 46,6% te uzorak motra prikupljenog uz more 48,7%.



**Slika 16.** Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti korištenjem NO• metode u ekstraktima motra prikupljenog na tri različita područja

### 3.6. Rezultati statističke obrade podataka

U tablici 6 prikazani su Pearsonovi korelacijski koeficijenti za istraživane parametre. Iako je kod svih relacija dokazana korelacija, zbog malog broja uzoraka ( $n = 3$ ) niti jedan korelacijski odnos nije značajan na razini 95% vjerojatnosti ( $p \geq 0,05$ ). Zanimljivo je primijetiti da se kod odnosa ukupnih fenola s ostalim parametrima javlja negativna korelacija, dok u svim drugim slučajevima ima pozitivan predznak.

Tablica 6. Pearsonovi korelacijski koeficijenti za istraživane parametre ekstrakata motra

|                            | Ukupni fenoli | Flavonoidi | Inhibicija DPPH | FRAP    | Inhibicija NO <sup>•</sup> | Klorogenska kiselina |
|----------------------------|---------------|------------|-----------------|---------|----------------------------|----------------------|
| Ukupni fenoli              | -             | -0,9273    | -0,9362         | -0,9323 | -0,9484                    | -0,9093              |
| Flavonoidi                 | -             | -          | 0,9525          | 0,9810  | 0,9672                     | 0,9473               |
| Inhibicija DPPH            | -             | -          | -               | 0,9913  | 0,9782                     | 0,9891               |
| FRAP                       | -             | -          | -               | -       | 0,9847                     | 0,9869               |
| Inhibicija NO <sup>•</sup> | -             | -          | -               | -       | -                          | 0,9521               |
| Klorogenska kiselina       | -             | -          | -               | -       | -                          | -                    |



#### 4. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da lokacija uzorkovanja biljke motar ima utjecaj na kemijski sastav i antioksidacijska svojstva ekstrakata. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da motar prikupljen na staništu koje je najmanje izloženo posolici i utjecaju visokog saliniteta sadrži najveću količinu fenolnih spojeva i spojeva iz skupine flavonoida, međutim ne odlikuju ga i najbolja antioksidacijska svojstva. Uzorak ubran na ušću rijeke ima najveći sadržaj klorogenske kiseline i pokazao je najbolja antioksidacijska svojstva primjenom DPPH i FRAP metode što potvrđuje pretpostavku da je ovaj fenolni spoj ključan za biološku aktivnost petrovca. Zahvaljujući pozitivnim biološkim svojstvima i bogatom fenolnom sastavu motra, što je dokazano i u ovom istraživanju, može se zaključiti da ova biljka posjeduje veliki ekonomski potencijal kao i opravdanost uporabe u farmaceutskoj, medicinskoj i prehrambenoj industriji.

## 5. LITERATURA

1. Aronson J, Blondel J. Biology and wildlife of the Mediterranean region; Oxford University Press. New York. 1999:125-127.
2. Cronk J. K, Fennessy MS. Wetland plants biology and ecology. SAD. 2001;110-112.
3. Cutler C, Russell T. The world encyclopedia of trees. Leo commerce, Rijeka. 2004:55.
4. URL: [https://3.bp.blogspot.com/-z0OSrYqsB50/WAnIBgT6TbI/AAAAAAAAAH3o/0\\_8caZfy5osq01qT8pxo5SIDwpJ9iKIoQCLcB/s1600/Halimione%2Bportulacoides-6857.jpg](https://3.bp.blogspot.com/-z0OSrYqsB50/WAnIBgT6TbI/AAAAAAAAAH3o/0_8caZfy5osq01qT8pxo5SIDwpJ9iKIoQCLcB/s1600/Halimione%2Bportulacoides-6857.jpg) Pristupljeno: 20. rujna 2021.
5. URL: <https://gohvar.files.wordpress.com/2016/10/inula-crithmoides-golden-samphire.jpg> Pristupljeno: 20. rujna 2021.
6. URL: <https://www.researchgate.net/profile/Eric-Petit/publication/261719699/figure/fig1/AS:214253823893508@1428093500230/Wild-sea-beet-Beta-vulgaris-subsp-maritima-the-wild-ancestor-of-all-cultivated-beets.png> Pristupljeno: 20. rujna 2021.
7. URL: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/76/Salicornia\\_europaea\\_en\\_Bretagne.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/76/Salicornia_europaea_en_Bretagne.jpg) Pristupljeno: 20. rujna 2021.
8. Ljubiša G. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. August Cesarec, Zagreb. 2005;86-393-0172-7
9. Bocchieri E, Marchioni-Ortu A. A study of the germination responses of a Sardinian population of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.). Canad J Bot. 1983;62(9):1832-1835.
10. Atia A, Debez A, Rabhi M, Athar H, Abdelly C. Alleviation of salt induced seed dormancy in the perennial halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). Pak J Bot. 2006;38:1367-1372.
11. URL: <https://inpn.mnhn.fr/photos/uploads/webtofs/inpn/2/254062.jpg> Pristupljeno 1. rujna 2021.

12. Nimac A. Utjecaj različitih predtretmana na kljajavost i energiju klijanja sjemena motra (*Crithmum maritimum* L.). Diplomski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu; 2017 (na hrvatskom jeziku).
13. Franke W. Vitamin C in sea fennel (*Crithmum maritimum* L.), an edible wild plant. *Econ Bot.* 1982;36:163-165.
14. URL: <https://lh3.googleusercontent.com/pw/ACtC-3eabLUK4MmfvDJ1n0PHLIC1fqUfhu4j2eEH2vsSj1TN1b6y51qxxlSnKwBK4YpfAsUrQ8NTU9RS7cbo5YkQLo8M5cjDEhxENS0MknIBhkOkzEaJE7RZZHaO-K7CIHg7nv-ckodZYMCZTZE4d8S4ocew> Pristupljeno: 2. rujna 2021.
15. Grigoriadou K, Maloupa E. Micropropagation and salt tolerance of in vitro grown *Crithmum maritimum* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 2008;94:209.
16. Bianco VV, Renna M, Santamaria P. Ortaggi liberati – Dieci prodotti straordinari della biodiversità pugliese. Università degli Studi di Bari, Italy. 2018;978866290285.
17. Guil-Guerrero JL, Rodriguez-García I. Lipids classes, fatty acids and carotenes of the leaves of six edible wild plants. *Eur Food Res Technol.* 1999;209:313-316.
18. Generalić Mekinić I, Šimat V, Ljubenković I, Burčul F, Grga M, Mihajlovski M, Lončar R, Katalinić V, Skroza D. Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities. *Ind Crops Prod.* 2018;124:947-953.
19. Generalić Mekinić I, Blažević I, Mudnić I, Burčul F, Grga M, Skroza D, Jerčić I, Ljubenković I, Boban M, Miloš M, Katalinić V. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *J Food Sci Technol.* 2016;53:3104-3112.
20. Maleš Ž, Žuntar I, Nigović B, Plazibat M, Bilušić Vundar V. Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire- *Crithmum maritimum* L., *Acta Pharm.* 2003;53:139-144.
21. Meot-Duros L, Magne C. Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiol Biochem.* 2009;47:37-41.

22. Mihajlovski M. Fenolni profil petrovca (*Crithmum maritimum* L.) kroz različite periode vegetacije. Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu; 2015 (na hrvatskom jeziku).
23. Lončar R. Biološka aktivnost ekstrakata petrovca (*Crithmum maritimum* L.) u različitim periodima vegetacije. Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu; 2015 (na hrvatskom jeziku).
24. Burczyk J, Wierzchowska-Renke K, Glowniak K, Glowniak P, Marek D. Geographic and environmental influences on the variation of essential oil and coumarins in *Crithmum maritimum* L. J Herbs Spices Med Plants. 2002;9:305-311.
25. Renna M, Gonnella M. The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations. Int J Gastron Food Sci. 2012;1:111-115.
26. Senatore F, Napolitano F, Ozcan M. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L (Apiaceae) growing wild in Turkey, Flavour Frag J. 2000;15:186-189.
27. Ozcan M, Akgul A, Bascr KHC, Ozck T, Tabanca N. Essential oil composition of sea fennel (*Crithmum maritimum*) from Turkey, Nahrung/Food. 2001;45:353-356.
28. Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. J Ethnopharmacol. 2003;89:221-244.
29. Waisel Y. Biology of halophytes. Academic press, Tel-Aviv, Israel. 1972.
30. Eskilsson S, Bjorklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. J Chrom A. 2000;902:227-250.
31. Tierney MS, Smyth TJ, Hayes M, Soler-Vila A, Croft AK, Brunton N. Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. Int J Food Sci Tech. 2013;48:860-869.
32. Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Lann KL, Pouvreau VS, Fauchon M, Deslandes E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. Food Chem. 2009;116:693-701.

33. Gedye RN, Smith FE, Westaway KC, Ali H, Baldisera L, Laberge L, Roussel J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tetrahedron Lett.* 1986;27:279.
34. Puharić I. Mikrovalovi i njihove primjene. Završni rad. Odjel za fiziku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 2016 (na hrvatskom jeziku).
35. Ethos X application reports. Microwave Green Extraction of Natural Products, 2017. str.1-4.
36. URL: <https://ats-scientific.com/uploads/products/images/Ethos%20X%20Terpenes%20-%20new.jpg>  
Pristupljeno: 2. rujna 2021.
37. URL: <https://www.milestonesrl.com/templates/yootheme/cache/solvent-free-microwave-extraction-5458e6d8.png> Pristupljeno: 3. rujna 2021.
38. Bousbia N, Vian AM, Ferhat MA, Petitcolas E, Meklati BY, Chemat F. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chem.* 2009;114:355–362.
39. Vivekananda M, Yogesh, Hemalath S. Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacogn Rev.* 2007;1(1):7-18.
40. Blekić M, Ražek Jambrak A, Chemat F. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol.* 2011;3(1):32-47.
41. URL: [https://satellites.pro/Omis\\_map#E43.443908,16.699304,15](https://satellites.pro/Omis_map#E43.443908,16.699304,15) Pristupljeno 5. rujna 2021.
42. Amerine MA, Ough CS. *Methods for Analysis of Musts and Wines.* New York: John Wiley & Sons, 1980.
43. Julkunen-Titto R. Phenolic constituents in the leaves of northern willow: Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem.* 1985;33:213-217.
44. Bralić D. Lišće citrusa kao izvor biološki aktivnih spojeva. Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu; 2012 (na hrvatskom jeziku).
45. Lončar R. Biološka aktivnost ekstrakta petrovca (*Crithmum maritimum* L.) u različitim periodima vegetacije. Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu; 2016 (na hrvatskom jeziku).

46. Dastmalchi K, Dorman HJD, Oinonen PP, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. LWT. 2008;41:391-400.