

Fenolni antioksidansi cvijeta jadranskog petrovca

Šantić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:199666>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

FENOLNI ANTIOKSIDANSI CVIJETA JADRANSKOG
PETROVCA

DIPLOMSKI RAD

IVONA ŠANTIĆ

Matični broj: 52

Split, veljača 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

**FENOLNI ANTIOKSIDANSI CVIJETA JADRANSKOG
PETROVCA**

DIPLOMSKI RAD

IVONA ŠANTIĆ

Matični broj: 52

Split, veljača 2024.

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

**PHENOLIC ANTIOXIDANTS OF THE ADRIATIC SEA
FENNEL FLOWERS**

DIPLOMA THESIS

IVONA ŠANTIĆ

Parent number: 52

Split, February 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
Komentor: Dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

FENOLNI ANTIOKSIDANSI CVIJETA JADRANSKOG PETROVCA

Ivona Šantić, 52

Sažetak:

Obalni petrovac (*Crithmum maritimum* L.) je višegodišnja halofitna biljka iz porodice štitarki (*Apiaceae*). Raste na priobalnim područjima Mediterana, Crnog mora te Atlantskog oceana. Kroz povijest se petrovac u narodnoj medicini koristio kao lijek, a danas predstavlja veliki potencijal za prehrambenu i farmaceutsku industriju zbog visokog sadržaja bioaktivnih komponenti. Cilj ovog rada bio je odrediti spektrofotometrijski udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata cvijeta petrovca sa deset različitih lokacija duž Jadranske obale, pomoću metode redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (engl. *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH) i metode određivanja snage redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP). Koncentracija klorogenske kiseline i njezinih derivata određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) sa UV/Vis detektorom. Rezultati su pokazali da cvjetovi petrovca sadrže visok udio ukupnih fenola te posjeduju izrazitu antioksidacijsku aktivnost što potvrđuje potencijal iskoristivosti ne samo listova, već i cvjetova biljke. Najvišu koncentraciju fenolnih kiselina i antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak sakupljen na području Senja, a najnižu uzorci sakupljeni na području Cavtata i Splita.

Ključne riječi: jadranski petrovac, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, klorogenska kiselina, tekućinska kromatografija

Rad sadrži: 37 stranica, 28 slika, 2 tablice, 57 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

- | | |
|---|-------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza | predsjednik |
| 2. Dr. sc. Maja Veršić Bratinčević | komentor |
| 3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić | mentor |

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Supervisor: Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assoc. Prof.

Co-supervisor: Ph. D. Maja Veršić Bratinčević

PHENOLIC ANTIOXIDANTS OF THE ADRIATIC SEA FENNEL FLOWERS

Ivona Šantić, 52

Abstract:

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is a perennial halophytic plant of the umbellifers family (*Apiaceae*). It grows along the coastal areas of the Mediterranean, the Black Sea and the Atlantic Ocean. Throughout history, it has been used in folk medicine, but today it represents a great potential for the food and pharmaceutical industries due to its high content of bioactive compounds. The aim of this work was to determine by spectrometry the content of total phenolics and the antioxidant activity of sea fennel flower extracts from ten different locations along the Adriatic coast using the method of reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The concentrations of chlorogenic acid and its derivatives were determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV/Vis detector. The results showed that sea fennel flowers contain a high content of total phenolics and have good antioxidant activity, which confirms the potential of use not only the leaves, but also the flowers of sea fennel. The sample collected in Senj had the highest concentration of phenolic acids and antioxidant activity, while the samples collected in Cavtat and Split areas had the lowest concentration.

Keywords: Adriatic sea fennel, phenolic compounds, antioxidant activity, chlorogenic acid, liquid chromatography

Thesis contains: 37 pages, 28 figures, 2 tables, 57 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|---|---------------|
| 1. Ph. D. Danijela Skroza, Assoc. Prof. | chair person |
| 2. Ph. D. Maja Veršić Bratinčević | co-supervisor |
| 3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assoc. Prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

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 i u Zavodu za primijenjene znanosti Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu pod komentorstvom dr. sc. Maje Veršić Bratinčević u razdoblju od svibnja 2023. godine do veljače 2024. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić i komentorici dr. sc. Maji Veršić Bratinčević na pomoći i savjetima prilikom izrade rada. Također, hvala izv. prof. dr. sc. Danijeli Skroza na izdvojenom vremenu.

Beskrajno hvala mojim roditeljima na neumornoj požrtvovnosti i ljubavi. Bili ste moja snaga kad je ja nisam imala te zagrljaj tišine kad riječima nisam umijela.

Hvala mojim prijateljima na svakom ohrabrenju i smijehu.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- 1) Odrediti udjele ukupnih fenola u ekstraktima cvjetova jadranskog petrovca s deset različitih lokacija duž Jadranske obale;
- 2) Odrediti antioksidacijsku aktivnost ekstrakata petrovca koristeći DPPH i FRAP metodu;
- 3) Identificirati i kvantificirati fenolne kiseline primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti sa UV/Vis detektorom.

SAŽETAK

Obalni petrovac (*Crithmum maritimum* L.) je višegodišnja halofitna biljka iz porodice štitarki (Apiaceae). Raste na priobalnim područjima Mediterana, Crnog mora te Atlantskog oceana. Kroz povijest se petrovac u narodnoj medicini koristio kao lijek, a danas predstavlja veliki potencijal za prehrambenu i farmaceutsku industriju zbog visokog sadržaja bioaktivnih komponenti. Cilj ovog rada bio je odrediti spektrofotometrijski udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata cvijeta petrovca sa deset različitih lokacija duž Jadranske obale, pomoću metode redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (engl. *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH) i metode određivanja snage redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP). Koncentracija klorogenske kiseline i njezinih derivata određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) sa UV/Vis detektorom. Rezultati su pokazali da cvjetovi petrovca sadrže visok udio ukupnih fenola te posjeduju izrazitu antioksidacijsku aktivnost što potvrđuje potencijal iskoristivosti ne samo listova, već i cvjetova biljke. Najvišu koncentraciju fenolnih kiselina i antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak sakupljen na području Senja, a najnižu uzorci sakupljeni na području Cavtata i Splita.

Ključne riječi: jadranski petrovac, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, klorogenska kiselina, tekućinska kromatografija

ABSTRACT

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is a perennial halophytic plant of the umbellifers family (Apiaceae). It grows along the coastal areas of the Mediterranean, the Black Sea and the Atlantic Ocean. Throughout history, it has been used in folk medicine, but today it represents a great potential for the food and pharmaceutical industries due to its high content of bioactive compounds. The aim of this work was to determine by spectrometry the content of total phenolics and the antioxidant activity of sea fennel flower extracts from ten different locations along the Adriatic coast using the method of reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The concentrations of chlorogenic acid and its derivatives were determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV/Vis detector. The results showed that sea fennel flowers contain a high content of total phenolics and have good antioxidant activity, which confirms the potential of use not only the leaves, but also the flowers of sea fennel. The sample collected in Senj had the highest concentration of phenolic acids and antioxidant activity, while the samples collected in Cavtat and Split areas had the lowest concentration.

Keywords: Adriatic sea fennel, phenolic compounds, antioxidant activity, chlorogenic acid, liquid chromatography

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| UVOD | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. Halofiti..... | 2 |
| 1.2. Vrste halofita na Jadranu | 5 |
| 1.3. Petrovac (<i>Crithmum maritimum</i> L.) | 7 |
| 1.3.1. Nutritivni sastav petrovca | 8 |
| 1.3.2. Upotreba obalnog petrovca | 9 |
| 1.3.3. Biološke aktivnosti petrovca i njegovih pripravaka..... | 10 |
| 1.3.4. Potencijal i iskoristivost petrovca | 12 |
| 1.4. Kemijski spojevi u petrovcu | 12 |
| 1.4.1. Klasifikacija fenolnih spojeva..... | 13 |
| 1.4.2. Fenolne kiseline | 15 |
| 1.5. Metode za određivanje fenola i antioksidacijske aktivnosti | 17 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 19 |
| 2.1. Biljni materijal..... | 19 |
| 2.1.1. Postupak ekstrakcije..... | 19 |
| 2.2. Određivanje ukupnih fenola | 20 |
| 2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti | 21 |
| 2.3.1. DPPH metoda..... | 21 |
| 2.3.2. FRAP metoda..... | 22 |
| 2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti | 23 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 25 |
| 3.1. Ukupni fenoli cvjetova petrovca..... | 25 |
| 3.2. Antioksidacijska aktivnost cvjetova petrovca | 27 |
| 3.3. Fenolne kiseline cvjetova petrovca..... | 29 |
| 4. ZAKLJUČAK | 31 |
| 5. POPIS KRATICA I SIMBOLA..... | 32 |
| 6. LITERATURA | 33 |

UVOD

Obalni petrovac je jestiva, samonikla biljka prilagođena životu na slanom staništu. Raste na klifovima, kamenitom i pješčanom tlu. Kroz povijest se koristila u narodnoj medicini, a u posljednje vrijeme povećan je interes za njegovom upotrebom u kulinarstvu, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Porast zaslanjenih površina predstavlja izazov za prehranu stanovništva u budućnosti i stoga je petrovac vrlo perspektivna biljka. Pored toga, bogat je bioaktivnim tvarima, čija količina ovisi o staništu i uvjetima u kojima biljka raste, vegetacijskom periodu, dijelu biljke koji se analizira, ekstrakcijskom otapalu i primijenjenim metodama ekstrakcije.

Većina istraživanja usmjerena je na proučavanje i analizu sastava listova motra, no ova studija dokazuje važnost cvjetova po pitanju prisustva i sadržaja biološki vrijednih fitokemikalija. Bogatstvo fenola u cvjetovima potencijalno može imati pozitivne zdravstvene učinke pa je provedeno istraživanje o njihovoj varijabilnosti na populacijama sakupljenim na različitim lokacijama duž Jadranske obale.

1. OPĆI DIO

1.1. Halofiti

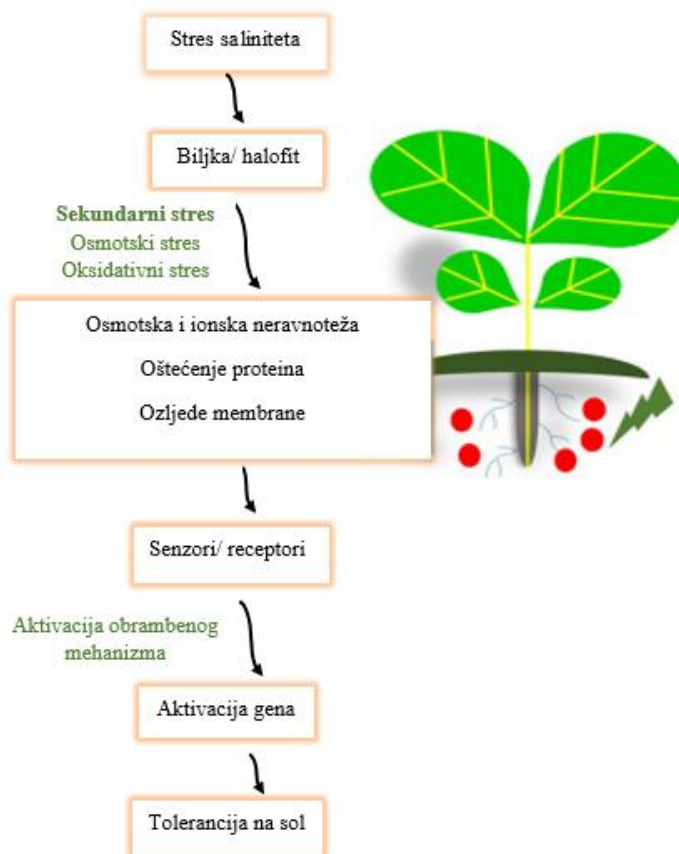
Površina Zemlje prekrivena je sa otprilike 71% mora, stoga je četvrtina pedosfere izložena utjecaju soli. Zbog nepovoljnog sustava navodnjavanja i upotrebe velike količine mineralnih gnojiva prilikom proizvodnje hrane, tla postaju izrazito slana i alkalizirana (halomorfna) što rezultira uništavanjem obradivih površina.

Prema Organizaciji za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) ukupna površina halomorfnih tala na Zemlji iznosi približno 830 mil. ha (400 mil. ha zaslanjenih, 430 mil. ha alkalnih). Od trenutno 230 mil. ha navodnjavanih površina, čak 45 mil. ha su zaslanjena tla ili tla izložena sekundarnom zaslanjivanju (19,5%), a od 1,5 milijardi ha u suhom ratarenju, 32 mil. ha (2,1%) je zaslanjeno do različitog stupnja ovisno o intenzitetu antropogenizacije.¹

Halomorfna tla u Hrvatskoj, tzv. solnjače, slatine i solončace, nalazimo na području jadranske obale i istočne Slavonije. Takva tla su poprilično nepogodna za kultivaciju klasičnih biljnih vrsta te na njima dobro uspijevaju samo halofitne biljke koje različitim prilagodbama neutraliziraju visoku koncentraciju soli u tlu.

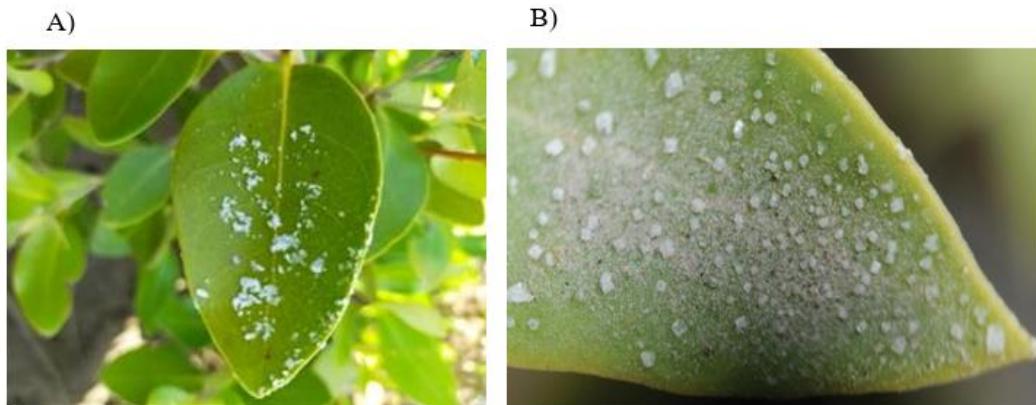
Zaslanjivanje odnosno alkalizacija je posljedica visoke koncentracije bikarbonata (HCO_3^-), karbonata (CO_3^{2-}) i visokog pH, dok slabiji utjecaj imaju hidroksidi (borovi, amonijevi, fosfatni, silikatni i organskih baza), kloridi (NaCl , CaCl_2 i MgCl_2), sulfati (Na_2SO_4 i MgSO_4) i nitrati (NaNO_3 i KNO_3).¹

Još uvijek nije u potpunosti poznat ujednačen i detaljan opis halofita i objašnjenje njihovog načina opstanka budući da su to evolucijski relativno mlade biljke. Ipak, smatra se da je razvijena tolerancija na sol rezultat složene mreže koja uključuje višestruke fiziološke odgovore gena i genskih produkata (slika 1). Obrambeni mehanizam uključuje promjene u ionskoj homeostazi, stvaranje osmoprotektora, proizvodnju antioksidansa te razvoj solnih žlijezda ili mjehura.²

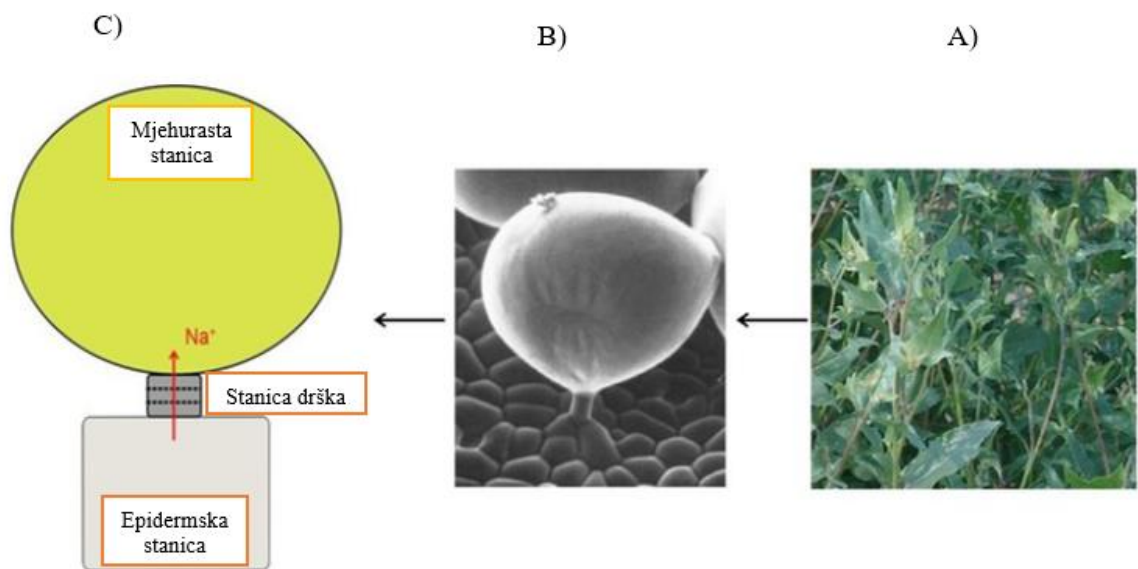


Slika 1. Shematski prikaz reakcije biljke na stres uzrokovan visokim salinitetom (prilagođena shema)²

Neke biljke jednostavno ne primaju suvišak soli, dok ih druge mogu akumulirati u vakuolama. Vrste poput *Avicennia*, biljke mangrove vegetacije, imaju sposobnost izlučivanja soli pomoću solnih žlijezda na listovima (slika 2). Drugi način adaptacije uočen je kod biljaka slanih pustinja, *Atriplex*, koje snižavaju koncentraciju soli na način da odbacuju dijelove tijela kao što su solne dlake (slika 3).



Slika 2. Kristali soli izlučeni pomoću solnih žlijezda na listovima halofita *Avicennia*^{3,4}



Slika 3. Prikaz halofitne biljke (A), mjehuraste stanice (B) i poprečnog prereza epidermske solne dlake (C)⁵

Pored adaptacije biljaka na visoke koncentracije soli, uočena je i karakteristična dvofazna obrana biljaka od soli (slika 4) kod koje u prvoj fazi dolazi do inhibicije ili čak potpunog zaustavljanja rasta biljaka zbog nastale promjene osmotskog tlaka. Ova faza se odvija poprilično brzo, u svega nekoliko minuta. Druga faza se povezuje sa skupljanjem soli u listovima te traje znatno duže, ponekad i mjesecima.



Slika 4. Dvofazna reakcija biljaka na suvišak soli¹

Zabilježeno je nekoliko tipova halofita, i to: higrohalofiti, kserohalofiti i halofiti. Higrohalofitima osim povišene koncentracije soli, odgovara i prisutnost vlage te su specifični po visokom sadržaju klora što ih svrstava u kloridhalofitni tip. Kserohalofiti predstavljaju suprotnost higrohalofitima obzirom da njima više odgovaraju sušna područja, a zbog sadržaja sulfata pripadaju sulfahalofitima. Halofiti, kao što je već navedeno, izlučuju soli među kojima prevladava natrijev klorid.⁶

Broj zaslanjenih površina raste iz dana u dan, stoga je za prehranu stanovništva u budućnosti ključna prilagodba biljaka na visoke koncentracije soli. Prisutna je i strategija ulaganja u razvoj genetski modificiranih biljaka koje će osim tolerancije na sol, biti otporne i na sušu, visoke temperature i smrzavanje, a istovremeno im neće biti izmijenjena senzorska svojstva. Genska modifikacija započeta je na uzorku rajčice i zasad nema velikih postignuća, ali napredak genetskog inženjeringa ulijeva nadu znanstvenicima.⁷

1.2. Vrste halofita na Jadranu

Jadransko tlo je uglavnom stjenovito ili pjeskovito, a biljni pokrov je izložen visokim temperaturama i u bliskom je doticaju s morem. Rezultat navedenih parametara je bogatstvo i raznolikost brojnih vrsta halofita kao što su: petrovac, mrižica, jastučni trputac, morska svilina, čvorasta morska resa, obalna zvijezda, omakalj, štulac, vrebina, veliki pelin, slizovina, morska blitva, primorski oman, caklenjača i oštri sit.⁸ U daljnjem tekstu je opisano nekoliko najčešćih halofita Jadrana.

Mrižica ili travulja (*Limonium*) je rod halofita koji raste na obalama mora ili na slanim kopnenim područjima, a koji broji više od 200 vrsta, a neke od njih su: rešetkasta mrižica (*L. cancellatum*), savitljiva mrižica (*L. anfractum*), obavijena mrižica (*L. vestitum*) i morska lavanda (*L. narbonense*) koja se smatra najljepšim halofitom (Slika 5).^{8,9}

Jastučni/busenasti trputac (*Plantago coronopus* L.) raste na pjeskovitom i slanom tlu te je karakterističan po zeljastoj stabljici bez listova- batvi. Plod biljke je tobolac koji sadrži sjemenke.¹⁰

Omakalj (*Arthrocnemum*) pripada porodici *Chenopodiaceae* te obuhvaća dvije vrste: grmoliki (*Arthrocnemum fruticosum*) i modrozeleni (*Arthrocnemum macrostachyum*). Rasprostranjeni su po cijeloj Jadranskoj obali te su karakteristični po grmolikom, polegnutom ili blago uzdignutom izgledu člankovite stabljike.^{11, 12}

Primorski oman ili talčanj (*Inula crithmoides*) može narasti do visine od jednog metra u obliku polugrma. Ima žute cvjetove sa dlakavom roškom kao plodom. Listovi su jestivi, a može se upotrebljavati i kao tonik.¹³



A) Rešetkasta mrižica



B) Jastučni trputac



C) Modrozeleni omakalj



D) Primorski oman

Slika 5. Halofitne vrste Jadrana^{14, 15}

1.3. Petrovac (*Crithmum maritimum* L.)

Obalni petrovac je halofitna, višegodišnja, jestiva i izrazito aromatična biljka. Dijeli porodicu štitarki (*Apiaceae*) sa peršinom, celerom i korijandrom, no njegova specifičnost je u tome što je jedina vrsta roda *Crithmum*. Naziv *Crithmum* je nastao od grčke riječi *krithe* po obliku ploda koji podsjeća na ječam, a *maritimum* potječe od *maritime* koji aludira na stanište blizu mora.^{16, 17}

Narodni nazivi su motar, motrika, šćulac i trava svetog Petra.¹⁴ Staništa koja mu više odgovaraju su klifovi i kamenita tla uz more, ali ga se može pronaći i na pjeskovitim te šljunčanim tlima (slika 6). Raste na priobalnim područjima Mediterana, Crnog mora te Atlantskog oceana.¹⁸



Slika 6. Petrovac na pješčanoj plaži (lijevo) i na klifu (desno)^{19, 20}

Petrovac može dostići visinu rasta od 50 do 60 cm, a odlikuje ga čvrst korijen koji se može rastegnuti do pet metara i drvenasta, razgranata stabljika. Listovi su debeli i mesnati te se dijele na dva ili tri segmenta. Cvjetovi petrovca su blijedo žuti sa pet latica i čine štitaste cvatove (slika 7). Period cvjetanja biljke je od lipnja do rujna, a cvjetovi sadrže i plod kalavac žućkaste ili ljubičaste boje, veličine oko 6 mm. Proces zrenja ploda započinje u studenom, a završava u prosincu. Proces klijanja ne zahtjeva posebne uvjete te petrovac može biti uvelike plodonosan, ali salinitet preko 50 mM natrijevog klorida ipak može djelovati inhibitorno na klijanje.^{16, 21- 23}



Slika 7. Morfološke karakteristike petrovca²⁴

1.3.1. *Nutritivni sastav petrovca*

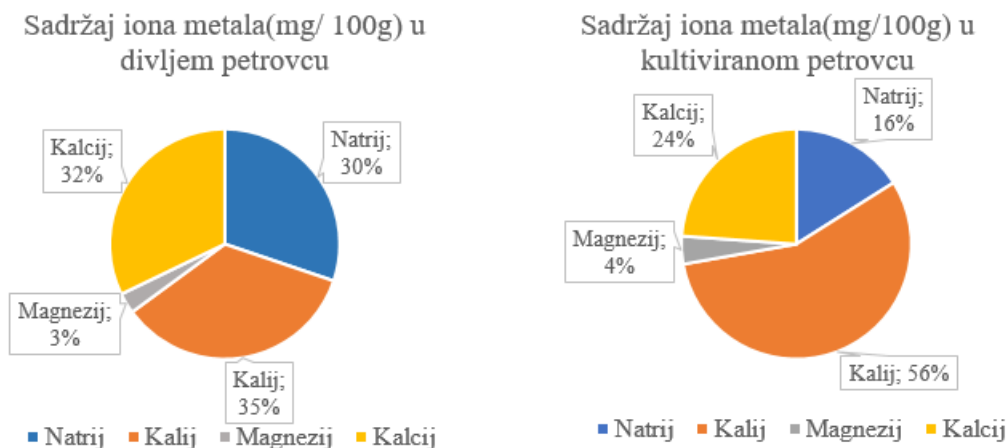
Bogatstvo obalnog petrovca hranjivim i bioaktivnim komponentama ovisi o vegetacijskom periodu, lokalitetu i uvjetima rasta biljke. Samim tim razlikuje se nutritivni sastav divljeg i kultiviranog petrovca (tablica 1).

Tablica 1. Nutritivni sastav divljeg petrovca;²⁵ (s.u.–suhi uzorak biljke; v.u.–vlažni uzorak biljke)

| | Divlji petrovac | Kultivirani petrovac |
|----------------------|------------------------|-----------------------------|
| Proteini | 3,8 - 6,2 g/100 g s.u. | 10,2 g/100 g s.u. |
| Lipidi | 4,9 - 7,5 mg/g v.u. | 9,6 mg/g v.u. |
| Ukupni fenoli | 30,2 - 48 mg/g s.u. | 6,1 mg/g s.u. |

Iz tablice 1 vidljivo je da je sadržaj proteina i lipida veći kod kultiviranog petrovca u optimalnim uvjetima rasta, dok je sadržaj fenolnih tvari značajno niži što se povezuje sa nižim abiotičkim stresom. Postoji znatna razlika u sadržaju iona metala kod divljeg i kultiviranog petrovca (slika 8). Uzrok tome su različiti uvjeti rasta kojima je izložen, primjerice divlji petrovac izložen je zapljuskivanju valova i soli prenošene vjetrom te stoga ima viši sadržaj natrija.

Viši udio natrija se objašnjava i kao odgovor biljke na nedovoljnu količinu kalija koji je važan za metaboličke procese biljke. Također, zastupljenost Ca^{2+} iona u biljkama je viša na obalnim, morskim staništima.²³



Slika 8. Grafički prikaz različitog sadržaja iona metala u divljem i kultiviranom petrovcu²³

1.3.2. Upotreba obalnog petrovca

Petrovac je još od davnina poznat po svojim ljekovitim svojstvima, a s vremenom se proširila paleta njegove primjene. U prošlosti su moreplovci često obolijevali od skorbuta, bolesti nastale zbog lošeg načina ishrane i nedovoljnog unosa askorbinske kiseline (vitamina C). Simptomi su bili umor, malaksalost, poremećaj rada živčanog sustava te u najgorem slučaju smrtni ishod. U prevenciji i liječenju je uvelike pomoglo konzumiranje petrovca budući da je dobar izvor vitamina C. Također, upotrebljavao se kao tonik, diuretik, digestiv, karminativ (sredstvo protiv nadutosti), vermifug (uklanja parazite crijeva) i depurativ.^{16, 23}

U mnogim zemljama petrovac se tradicionalno konzumira kao jestiva biljka zbog svojih specifičnih senzorskih svojstava. Ima blagi, slani okus koji podsjeća na okus celera, ali pikantan okus nakon gutanja (engl. *aftertaste*). Listovi i stabljike se najčešće konzumiraju u svježem stanju ili blanširani u salatama, juhama i raznim umacima. Mogu se čuvati i kao ukiseljeno povrće u octu, maslinovom ulju i slanoj vodi. Postoje i zapisi o njegovoj primjeni u spravljanju biljnih likera.²³

Budući da je petrovac aromatična biljka, osim upotrebe u svježem stanju može se upotrijebiti kao suhi začim. Prema istraživanjima koje su proveli Renna i Gonnella (2012)²⁶ petrovac se može izložiti različitim načinima sušenja kako bi se povećala njegova gastronomska iskoristivost. Prva metoda je podvrgavanje petrovca procesu sušenja vrućim zrakom (65 °C), a druga sušenje smržavanjem. U ovom istraživanju uočene su znatne razlike između dobivenih proizvoda. Naime, metoda sušenja smržavanjem rezultirala je proizvodom sa izraženijom bojom koja podsjeća na boju svježeg petrovca, dok je proizvod podvrgnut visokoj temperaturi imao tamniju zelenu boju, ali znatno izraženiju aromu.

Konzumiranje petrovca kao jestive biljke i upotreba u neprehrambene svrhe mogla bi biti još veća obzirom da predstavlja unosnu kulturu za inovacije u gastronomiji i proizvodnju nutraceutika, ali je i dalje u znanstveno-istraživačkom smislu prilično neistražen.

1.3.3. Biološke aktivnosti petrovca i njegovih pripravaka

Antioksidacijska aktivnost petrovca proporcionalna je udjelu fenolnih spojeva. Prema istraživanju Mekinić i sur. (2016)²⁷ upotrebom FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) metode dokazano je da eterično ulje i etanolni ekstrakt imaju dobra antioksidacijska svojstva. Politeo i sur. (2023)¹⁷ su odredili visok udio fenolnih spojeva u zaostaloj vodi nakon ekstrakcije eteričnog ulja što potvrđuje snažnu biološki potencijal nusproizvoda izolacije ulja petrovca. Maleš i sur. (2003)²¹ navode da je petrovac kao izvor bioaktivnih komponenti neupitan, ali da njegov potencijal izrazito ovisi o lokalitetu prikupljanja biljke i vegetacijskom periodu. Analizom antioksidacijske aktivnosti različitih dijelova biljke, Houta i sur. (2011)²⁸ su utvrdili da metanolni ekstrakt sjemenki ima najizraženiju inhibiciju DPPH radikala. Navedeni ekstrakt je imao i dobar antibakterijski učinak na Gram-pozitivnu bakteriju *Staphylococcus epidermidis*.

Meot-Duros i sur. (2008, 2010)^{29,30} su potvrdili antioksidacijsku moć biljnog ekstrakta te je u usporedbi sa još dva halofita, petrovac sadržavao najviši udio ukupnih fenola. Dvije godine kasnije identificirali su falkarindiol iz ekstrakta lista, za koji se tvrdi da ima citotoksično i protuupalno djelovanje. Falkarindiol, kao bioaktivni spoj, pripada

skupini poliacetilena te se smatra da je njegov utjecaj na lipidni metabolizam zaslužan za citotoksični efekt (slika 9).



Slika 9. Biološka aktivnost petrovca (autorska slika)

Biljni ekstrakt petrovca ima i snažan antibakterijski učinak na *Micrococcus luteus*, *Salmonella arizonae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. marginalis*, *Bacillus cereus* i *Candida albicans*.²⁹

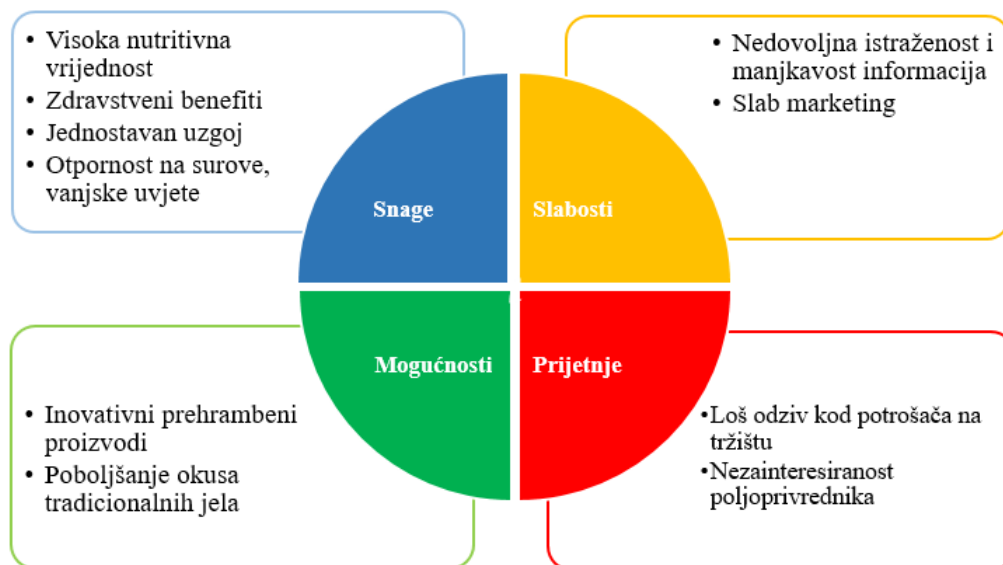
Prema Atia i sur. (2011)³¹ ekstrakt petrovca antifungalno djeluje na *C. albicans* te ima antibakterijski učinak na *Salmonella arizonae*, *Erwinia carotovora*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. marginalis*. Značajno antibakterijsko djelovanje pokazalo je i eterično ulje prema *Bacillus cereus* i *Micrococcus luteus*.

Prema Glamočliji i sur. (2009)³² eterično ulje petrovca, dobiveno hidrodestilacijom pokazalo je antifungalno djelovanje protiv patogena *Mycogone perniciosa*. Komponente koje su se koristile za testiranje antifungalne aktivnosti su α -pinen i limonen, ujedno su to i najzastupljenije komponente u ulju zastupljene s gotovo 58%. Djelovanje eteričnog ulja pokazalo se znatno učinkovitijim nego upotreba komercijalnog fungicida.

Insekticidno i repelentno djelovanje eteričnog ulja testirano je na mravima. Repelentna aktivnost očitovala se kroz niske vrijednosti koncentracije ulja motra, koje su natjerale mrave da zaobilaze „kontaminirano“ područje. Značajna je i insekticidna aktivnost budući da je smrtnost mrava kroz period od 3 dana bila 90%-tna.³³

1.3.4. Potencijal i iskoristivost petrovca

Za procjenu potencijala i iskoristivosti petrovca prigodna je SWOT analiza. SWOT (engl. *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) predstavlja analizu snaga i slabosti određenog proizvoda te potencijalne prilike i prijetnje (slika 10).



Slika 10. Prikaz SWOT analize obalnog petrovca (prilagođena shema)²³

1.4. Kemijski spojevi u petrovcu

Obalni petrovac je biljka sa visokim udjelom fitokemikalija i bioaktivnih komponenti od kojih se najviše ističu fenoli. Upravo zbog toga postaje važna karika mediteranske prehrane poznata po brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje.

Biljni metaboliti se dijele na primarne i sekundarne. Primarni su zaslužni za osnovno funkcioniranje biljke i upotrebu vode, ugljikovog dioksida i minerala iz okoline za nastanak komponenti nužnih za rast i razvoj (šećeri, aminokiseline, masne kiseline). Sekundarni metaboliti se nazivaju još i specijalni metaboliti zato što biljci pružaju odgovor na biotički i abiotički stres.³⁴

Sekundarnim metabolitima pripadaju fenolni spojevi, a kemijski su to spojevi koji na aromatskom prstenu imaju vezanu bar jednu hidroksilnu skupinu. Biljni fenoli su vrlo

raznovrsni spojevi od koji su neki topivi u vodi, neki isključivo u organskim otapalima, a neki su veliki netopivi polimerni spojevi. Vrlo su brojni i zasad ih je otkriveno preko 8000.³³ Rijetko se mogu naći u slobodnom obliku već su uglavnom u interakciji sa šećernim jedinicama i organskim kiselinama procesom konjugacije i esterifikacije. Poznati su po izrazitoj biološkoj aktivnosti i antioksidacijskim, antimikrobiološkim, antiupalnim i antikancerogenim svojstvima. Također, dragocjeni su u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom.³⁶

Analiza fenola može se izvršiti pomoću različitih metoda kao što su masena spektrometrija (MS), plinska kromatografija (GS), visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC), ultraljubičasta (UV) i ultraljubičasta/vidljiva spektrometrija (UV/VIS).³⁵ Pri izolaciji fenolnih spojeva važno je posvetiti pažnju i izboru metode ekstrakcije kako bi stabilnost spojeva i njihova učinkovitost bila maksimalna. Zelene metode, odnosno metode povoljnije za okoliš su: mikrovalna ekstrakcija (MAE), ultrazvučna ekstrakcija (UAE), ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE), ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (PEF) i ekstrakcija potpomognuta enzimima (EAE).^{36,38}

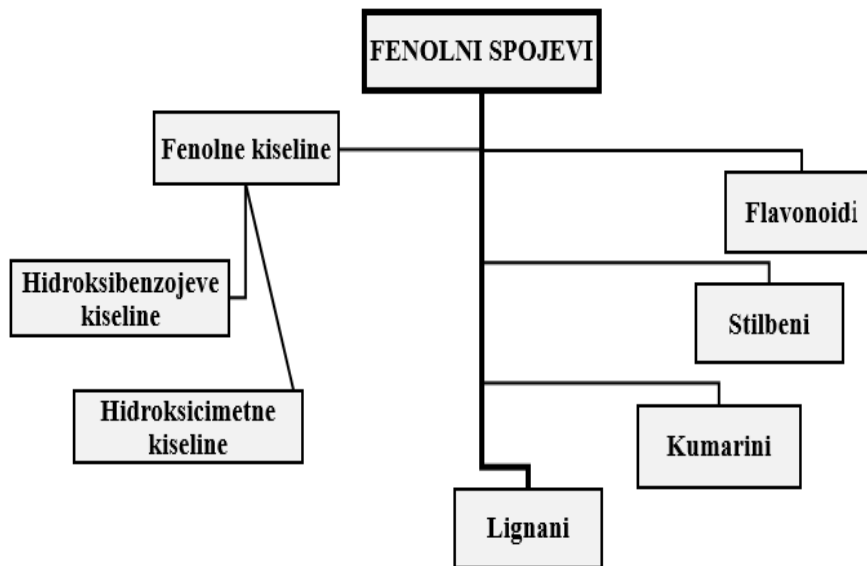
Fenolni spojevi su sadržani u raznom voću, povrću, orašastim plodovima, žitaricama i začинима. Utječu na boju, okus i kvalitetu hrane. Smatra se da ih čovjek dnevno u organizam unese oko 1 g, što varira ovisno o načinu prehrane te o dodacima prehrani kao što su kava, vino ili čaj. Prevencije raznih bolesti se povezuju upravo s antioksidacijskim djelovanjem fenola. Također fenoli kao što su epigalokatehin galat, resveratrol, katehin, kvercetin, procijanidini i antocijanini pomažu u borbi protiv pretilosti. Zbog svega navedenog, raste zanimanje za fenolima kao prirodnim terapijskim sredstvima.^{39,40}

1.4.1. Klasifikacija fenolnih spojeva

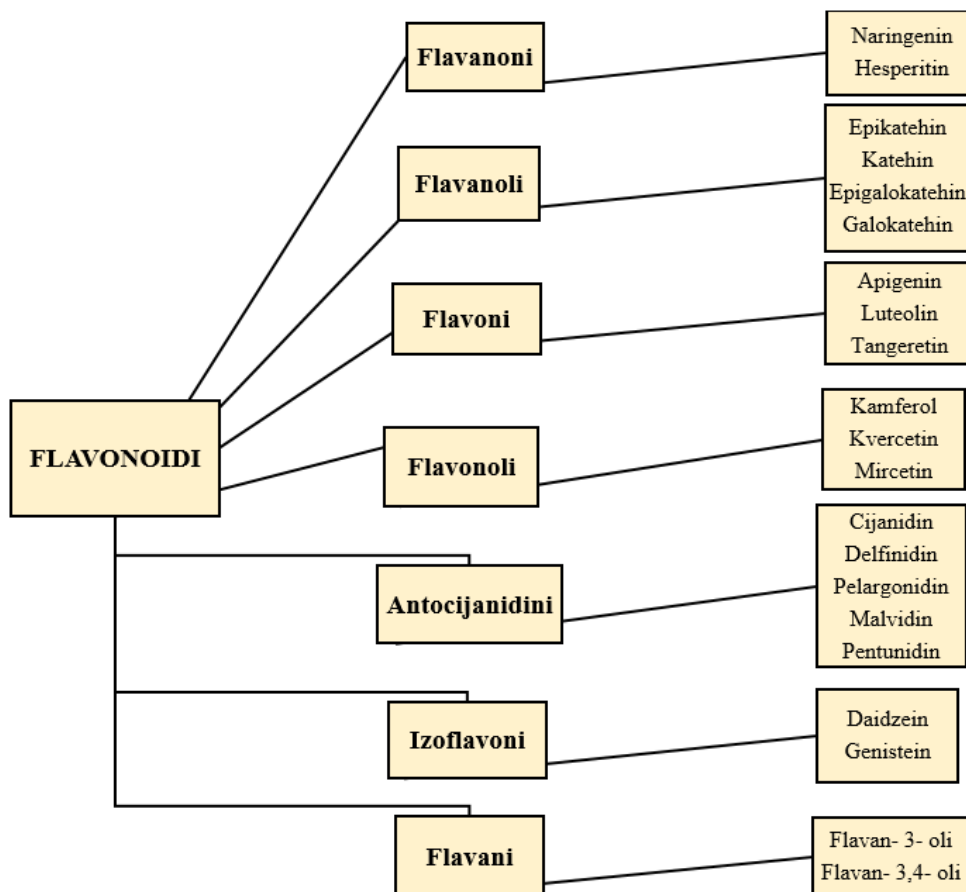
Prema kemijskoj strukturi fenoli se dijele na flavonoide i neflavonoide (slika 11). Neflavonoide čine fenolne kiseline, stilbeni, kumarini i lignani. Najistaknutiji stilben je resveratrol budući da se povezuje sa antikancerogenim učinkom. Kumarin se upotrebljava u prehrambenoj industriji kao aditiv ili dodatak prehrani zbog mirisa koji podsjeća na vaniliju, a lignani su fitoestrogeni čija je koncentracija najveća u

sjemenkama lana. Imaju antiestrogensko djelovanje što znači da može inhibirati rizik od raka dojke.³⁷

Flavonoidi su najbrojnija i najraznolikija skupina fenolnih spojeva te su zaslužni uglavnom za boju biljaka i interakciju s okolinom (slika 12).



Slika 11. Klasifikacija fenolnih spojeva⁴¹



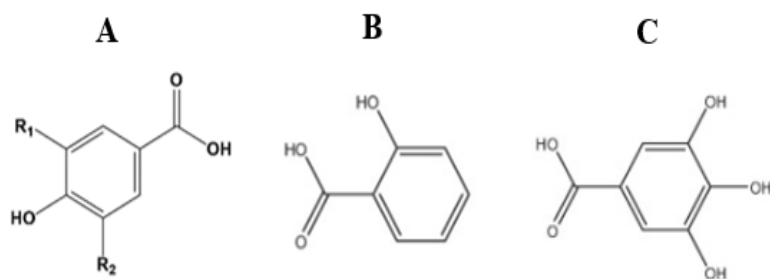
Slika 12. Klasifikacija flavonoida⁴²

1.4.2. Fenolne kiseline

Petrovac je poznat po visokom sadržaju fenolnih kiselina koje se dijele na dvije podgrupe: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Pripisuju im se brojne biološke funkcije zbog antioksidacijskog djelovanja.³⁶

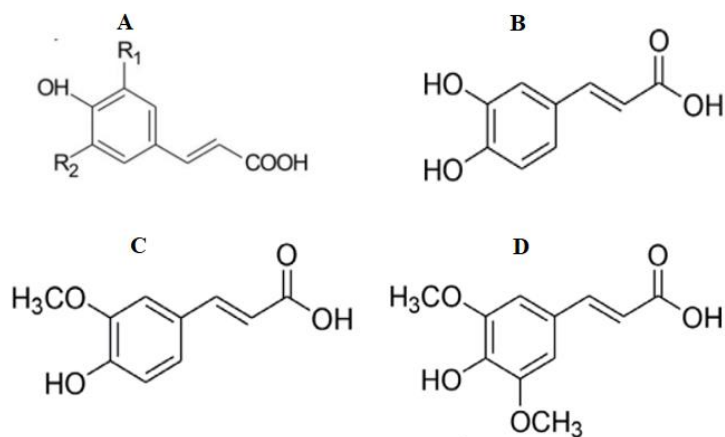
Hidroksibenzojeve kiseline su fenoli kod kojih je karboksilna skupina direktno vezana za fenolni prsten. Hidroksilna skupina u hidroksibenzojevim kiselinama može biti vezana na tri različita položaja: *ortho* (*o*), *meta* (*m*) i *para* (*p*). Najznačajniji predstavnici su salicilna (*o*- hidroksibenzojeva kiselina) i galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) koja se i najčešće koristi kao standard za određivanje ukupnih fenola (Slika 13).³⁷

Prehrambene namirnice koje obiluju hidroksibenzojevim kiselinama su kava, žitarice, crni ribiz, borovnica i kupina.



Slika 13. Opća kemijska struktura hidroksibenzojeve kiseline (A), salicilna (B) i galna kiseline (C)^{36,43}

Kod hidroksicimetnih kiselina karboksilna skupina je dvostrukom vezom (C=C) odvojena od fenolnog prstena. Najpoznatije su kafeinska, ferulinska, kumarinska i sinapska kiseline (slika 14). Kafeinska kiseline i klorogenska kiseline (ester kafeinske i kininske kiseline) su značajne po dobrim zdravstvenim učincima na ljudsko zdravlje jer imaju kardioprotektivna svojstva. Izvori hidroksicimetnih kiselina u hrani su kava, žitarice, višnje, šljive, breskve, bademi, rajčice, krumpir, špinat.^{36, 37}

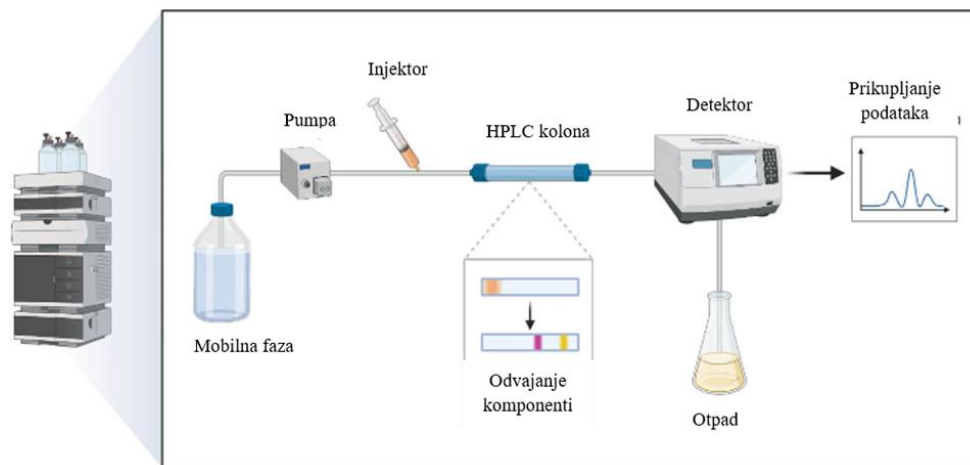


Slika 14. Opća kemijska struktura hidroksicimetne kiseline (A), kafeinska (B), ferulinska (C), sinapska kiseline (D)^{36,37}

1.5. Metode za određivanje fenola i antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola najčešće se koristi Folin-Ciocalteu metoda (FC) koja se po dodatku uzorka u reakcijsku smjesu očituje nastankom plavo obojenog kompleksa koji nastaje kao rezultat reakcije fenolnih spojeva i FC reagensa u alkalnim uvjetima. Što je uzorak bogatiji fenolima, to će plava boja biti izraženija te se njen intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm.⁴⁴

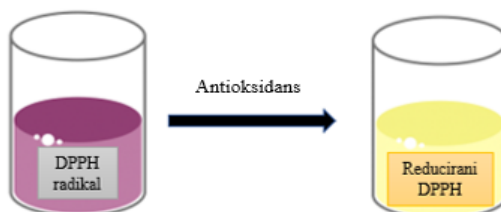
Jedna od najčešće korištenih metoda za određivanje individualnih fenolnih spojeva je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), analitička metoda za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju spojeva u tekućem mediju. Kromatograf se sastoji od spremnika mobilne faze koja se prenosi dalje pumpom, zatim se injektorom unosi uzorak koji u HPLC koloni prolazi kroz proces separacije. Nakon prolaska kroz kolonu, odvojene komponente se očitavaju na detektoru i na računalu se obrađuju podaci, dok ostatak ide u spremnik za otpad (slika 15).⁴⁵



Slika 15. Shematski prikaz principa rada HPLC uređaja⁴⁶

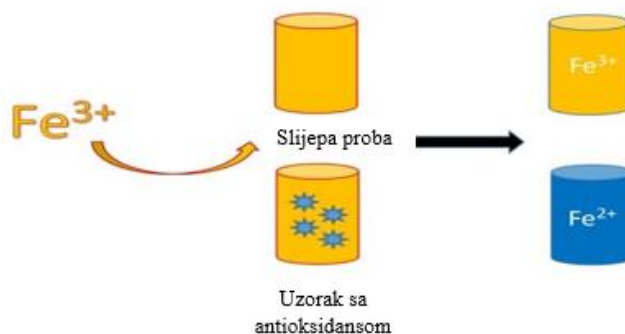
Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelje se na prijenosu vodika (engl. *Hydrogen atom transfere*, HAT) kao što je DPPH metoda i na prijenosu elektrona (engl. *Electron transfere*, ET) kao što je FRAP metoda.

Metoda DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka i zasniva se na redukciji DPPH slobodnog radikala, koji mijenja boju iz ljubičaste u svijetlo žutu reakcijom sa antioksidansima iz uzorka (slika 16). Kod ove metode intenzivnija promjena boje proporcionalna je boljoj antioksidacijskoj aktivnosti uzorka, a absorbancija reakcijske smjese očitava se spektrofotometrijski pri 517 nm.⁴⁷



Slika 16. Shematski prikaz DPPH metode⁴⁸

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP) je metoda koja se koristi za utvrđivanje redukcijske moći uzorka, točnije antioksidansa iz uzorka da reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} (slika 17). Reakcijska smjesa kod ove metode mijenja boju iz žute u plavu prilikom reakcije nastalih iona sa TPTZ reagensom (2,4,6-tripiridil-s-tirazin). Absorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 593 nm.⁴⁹



Slika 17. Shematski prikaz FRAP metode⁵⁰

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

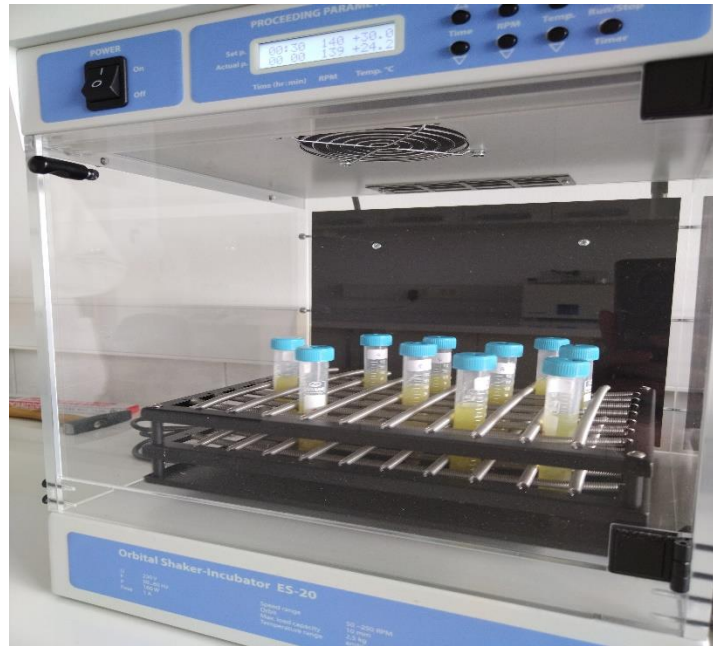
Za potrebe eksperimentalnog dijela ovog rada korišteni su uzorci petrovca prikupljeni u periodu cvjetanja 2023. godine sa područja Paga, Korčule, Cavtata, Neretve, Jadrija, Pelješca, Drašnica, Splita, Krka i Senja. Prikupljeni su i analizirani isključivo cvjetovi motra koji su nakon branja osušeni procesom liofilizacije i neposredno prije analize homogenizirani i usitnjeni pomoću ručnog mlinca (slika 18).



Slika 18. Usitnjeni uzorci cvijeta obalnog petrovca (autorska slika)

2.1.1. Postupak ekstrakcije

Za ekstrakciju je odvagano 200 mg uzorka svakog cvijeta u falcon epruvetu od 15 mL i dodano je 8 mL 80%-tnog metanola. Tako pripremljeni uzorci stavljeni su u ultrazvučnu kupelj tijekom 15 minuta, a potom u orbitalnu tresilicu-inkubator (slika 19) koja se koristi za postupke homogenizacije, ekstrakcije i inkubacije uzoraka s rasponom temperature od 25 °C do 42 °C te rasponom brzine trešnje od 50 do 250 okretanja po minuti. Parametri postavljeni za naše uzorke petrovca bili su temperatura od 25 °C i kružno vibracijsko kretanje/frekvencija osciliranja od 140 okr/min u trajanju od 3 sata. Ekstrakcija je nastavljena preko noći u hladnjaku pri 4 °C pri čemu su uzorci bili zaštićeni od svjetla.



Slika 19. Orbitalna tresilica-inkubator ES-20 (Biosan) (autorska slika)

2.2. Određivanje ukupnih fenola

Najpouzdanija metoda za određivanje sadržaja ukupnih fenola je Folin-Ciocalteu metoda (FC), koja je korištena i ovom istraživanju.

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens
- Otopina natrijevog karbonata, w (Na_2CO_3) = 20%.

Postupak određivanja:

U kivetu se otpipetira 25 μL prethodno filtriranog uzorka, 1,975 mL destilirane vode i 125 μL FC reagens. Smjesa se dobro promiješa te joj se nakon 5 min doda 375 μL zasićene otopine natrijevog karbonata. Ponovo se promiješa radi bolje ujednačenosti, nakon čega se ostavi u taman prostor na sobnoj temperaturi tijekom 2 h. Za svaki uzorak napravljeno je 5 ponavljanja te se apsorbancija očitava pri valnoj duljini od 765 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra (slika 20). Konačni rezultat o udjelu ukupnih fenola računa se prema jednadžbi baždarnog pravca galne kiseline ($y = 0,001x + 0,0107$) i izražava kao mg ekvivalenta galne kiseline po 1 L ekstrakta (mg GAE/L).



Slika 20. Uzorci ispitivanih cvjetova za određivanje ukupnih fenola i UV/Vis spektrofotometar UV-1900i (Shimadzu) (autorska slika)

2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

U ovom radu za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata motra upotrijebljene su metode DPPH i FRAP.

2.3.1. DPPH metoda

Reagensi:

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

Postupak određivanja:

U kivetu se doda 2 mL otopine DPPH i očita se absorbancija pri 517 nm ($A_{C(0)}$). Zatim se u kivetu doda 50 μ L čistog uzorka i tako pripremljena reakcijska smjesa mora odstajati 1 sat prije ponovnog mjerenja absorbancije ($A_{A(t)}$). Konačni rezultat računa se prema izrazu:

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

gdje je,

$A_{C(0)}$ – absorbancija otopine DPPH radikala kod vremena $t = 0$

$A_{A(t)}$ – absorbancija reakcijske smjese nakon vremena t .



Slika 21. Promjena boje uzoraka otopine DPPH u ovisnosti o antioksidacijskoj aktivnosti (autorska slika)

2.3.2. FRAP metoda

Reagensi:

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

Postupak određivanja:

Za određivanje reduksijske sposobnosti potrebna nam je razlika između konačne (A_4) i početne (A_0) vrijednosti absorbancije, to jest absorbancije očitane prije dodatka uzorka. U kivetu se otpipetira 3 mL FRAP reagensa te se absorbancija očitava pri valnoj duljini od 593 nm (A_0). Zatim se otpipetira 100 μL uzorka uz popratnu pojavu plavog obojenja, a absorbancija se očitava nakon 4 minute (A_4). Konačni rezultat računa se pomoću jednadžbe baždarnog pravca ($y=0,007x+0,0037$) otopine Troloxa, a izražava se u μM Trolox ekvivalenata ($\mu\text{M TE}$).



Slika 22. Uzorci ispitivanih cvjetova za određivanje antioksidacijske aktivnosti i spektrofotometar (SPECORD 200 PLUS) (autorska slika)

2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenske kiseline i njezinih derivata korišten je visokodjelotvorni tekućinski kromatograf (Shimadzu Nexera LC-40, Shimadzu, Kyoto, Japan) spojen sa UV/Vis detektorom (slika 23). Fenolne komponente su odvojene pomoću kolone obrnute faze C18 dimenzija 250 mm×4,6 mm×5 μm (Phenomenex, Torrance, AC, SAD) pri temperaturi od 35 °C i brzini protoka 1 mL/min. Za vodenu mobilnu fazu (A) korištena je 0,2% fosforna kiselina sa ultra-čistom vodom, a za organsku mobilnu fazu (B) metanol/acetoni-tril u omjeru 1:1, v/v. Elucija je započeta izokratno sa 4% B, a gradijent je postavljen na sljedeći način: 0-16 min (linearni gradijent do 15% B), 16-50 min (linearni gradijent do 35% B), 50-62 min (linearni gradijent do 4% B) i 62-65 min (4% B). Početni uvjeti su uspostavljeni u 2 minute i održavani 10 minuta radi uravnoteživanja kolone.³⁸

Standardne krivulje su konstruirane u šest točaka pomoću otopine metanol/voda (80:20, v/v). Injektirano je 20 μL uzorka u HPLC uređaj u duplikatu. Rezultati su se mjerili pri valnoj duljini od 220 i 320 nm te su izraženi u mg/L.



Slika 23. Primjer HPLC uređaja⁵¹

3. REZULTATI I RASPRAVA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je istražiti razliku u sadržaju ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti između ekstrakata cvijeta petrovca prikupljenih sa deset različitih lokacija na jadranskoj obali (tablica 2).

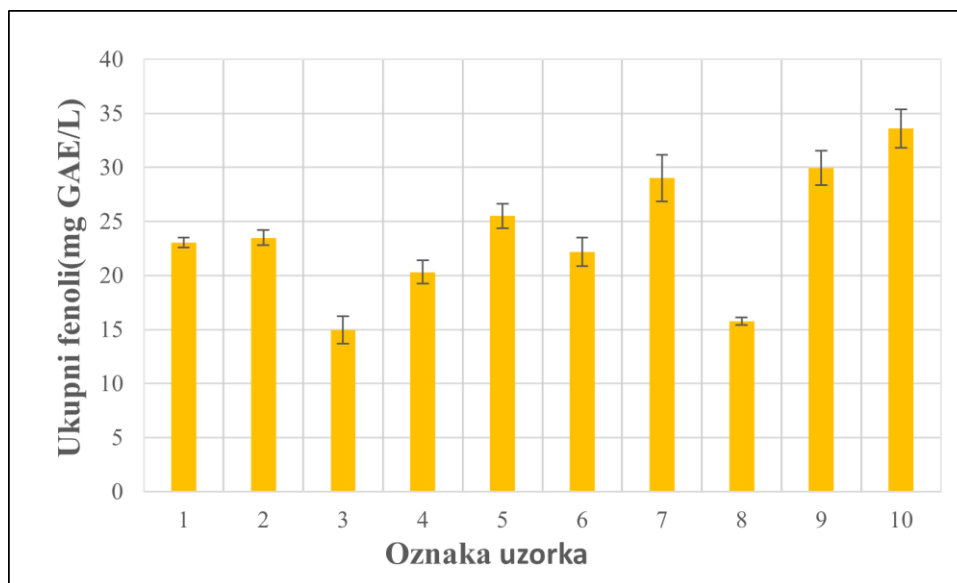
Također, pomoću HPLC-a je izvršena identifikacija i kvantifikacija individualnih fenolnih spojeva, odnosno dominantne klorogenske kiseline i njenih derivata.

Tablica 2. Popis sakupljenih i analiziranih uzoraka cvjetova petrovca sa različitih lokacija duž Jadranske obale

| Uzorak | Lokacija |
|--------|----------|
| 1 | Pag |
| 2 | Korčula |
| 3 | Cavtat |
| 4 | Neretva |
| 5 | Jadrija |
| 6 | Pelješac |
| 7 | Drašnice |
| 8 | Split |
| 9 | Krk |
| 10 | Senj |

3.1. Ukupni fenoli cvjetova petrovca

Primjenom Folin-Ciocalteu metode određen je udio ukupnih fenola (UF) u ekstraktima petrovca. Iz grafičkog prikaza (slika 24) vidljivo je da uzorci s područja Paga i Korčule, te s područja Drašnica i Krka imaju gotovo jednake udjele ukupnih fenola u testiranim ekstraktima. Najviši udio UF imao je uzorak sa područja Senja (33,58 mg GAE/L), dok je najniži, dva puta manji udio određen u uzorku sa područja Cavtata (14,96 mg GAE/L). Nisku koncentraciju fenola imao je i uzorak s područja Splita (15,78 mg GAE/L), dok je koncentracija UF u ostalim uzorcima bila u pravilu veća od 20 mg GAE/L (20,31-25,16 mg GAE/L).



* mg GAE/L – miligrami ekvivalenta galne kiseline po 1 L ekstrakta

Slika 24. Usporedni prikaz rezultata određivanja udjela ukupnih fenola u ekstraktima petrovca

Na osnovu provedenih studija može se pretpostaviti da i u ovom istraživanju utjecaj na sadržaj fenola najvjerojatnije imaju razni čimbenici poput abiotičkog stresa, vegetacijskog perioda, staništa, dijela biljke koji se analizira, pripreme i stupnja homogenizacije biljnog materijala, odabranog otapala i postupka ekstrakcije.

Istraživanja Nougerol i sur. (2022)²⁵ pokazala su da stanište uvelike utječe na udio fenolnih komponenti. Analizirani su listovi petrovca, a za otapalo odabran je 80%-tni metanol. U usporedbi uzoraka petrovca prikupljenog sa područja klifa, pješčane i kamenite plaže te kultiviranog petrovca, najveći udio fenola (48 mg GAE/L) sadržavao je petrovac sa klifa zbog snažnijeg utjecaja vjetra, soli i nedostatka hranjivih tvari. Kultivirani petrovac koji je rastao pod optimalnim uvjetima sadržavao je tek 7 mg GAE/L. Gil i suradnici (2019)⁵² su utvrdili različitost sadržaja UF između divljeg petrovca koji raste u unutrašnjosti i divljeg petrovca koji raste blizu obale. Upotrijebljen je supernatant vodene otopine listova petrovca te je sadržaj fenola veći kod petrovca uz obalu zbog izraženijeg utjecaja soli. Prema istraživanju Jallali i sur. (2014)⁵³ udio ukupnih fenola također je prilično varijabilan ovisno o lokalitetu uzorkovanja. Nadzemni dijelovi petrovca ekstrahirani u acetonu, sa subhumidnog područja sadržavali su 7,9 mg GAE/L, a sa semiaridnog 4,1 mg GAE/L.

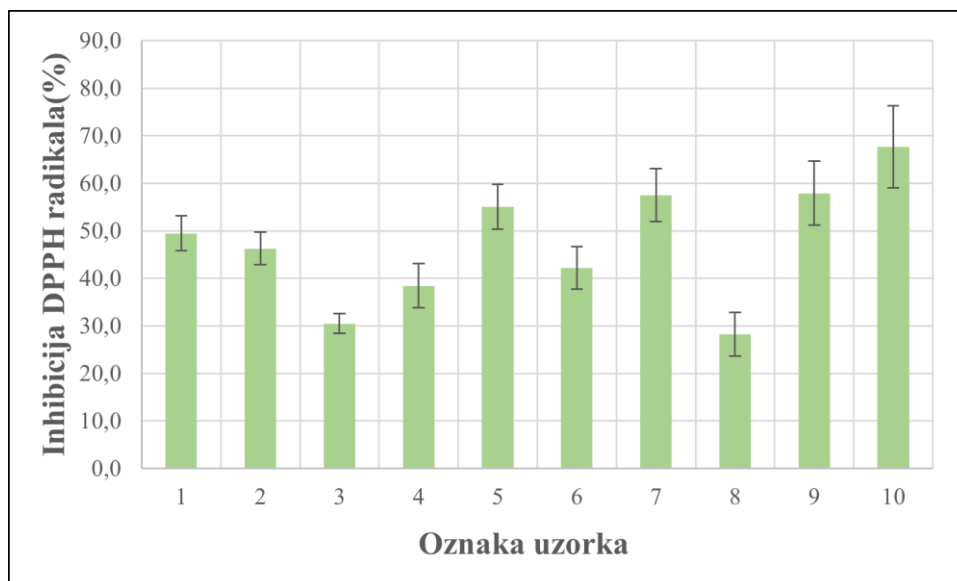
Souid i sur. (2021)⁵⁴ su zaključili da količina detektiranih fenola uvelike ovisi o otapalu te da je ekstrakcija bolja u vodeno etanolnom otapalu, nego u acetonu ili metanolu.

Listovi petrovca u vodeno etanolnom otapalu sadržavali su 32 mg GAE/L. Calvo i sur. (2023)⁵⁵ su iz listova i stabljike petrovca upotrebom vodeno etanolnog ekstrakta (1:1), ekstrahirali 24 mg GAE/L ukupnih fenola. Nabet i sur. (2017)⁵⁶ su prikupili nadzemne dijelove petrovca u periodu cvjetanja. Analizirali su ekstrakte pripravljene 80%-tnim metanolom te odredili vrijednost fenola od 47,1 mg GAE/L. Meot-Duros i sur. (2009)⁵⁷ su analizom listova petrovca, koristeći kao otapalo 50%-tni metanol, utvrdili porast fenolnih komponenti u periodu između proljeća i ljeta u rasponu od 23 do 33 mg GAE/g.

Generalić Mekinić i sur. (2016)²⁷ su uzorkovali nadzemne dijelove petrovca u periodu cvjetanja te iz 80%-tnog etanolnog ekstrakta odredili sadržaj UF u iznosu od 33 mg GAE/L iz cvijeta i 35 mg GAE/L iz listova. Houta i sur. (2011)²⁸ su također analizirali različite dijelove biljke iz čistog metanolnog ekstrakta. Iz cvjetova je ekstrahirano 9,4 mg GAE/L, iz sjemenki 17,1 mg GAE/L, a iz listova 11,5 mg GAE/L. Maleš i sur. (2003)²¹ su iz nadzemnih dijelova biljke određivali sadržaj UF u različitim fazama rasta: prije cvjetanja, početak cvjetanja, bujno cvjetanje i faza fruktifikacije. Ekstrakti su pripremljeni pomoću metanol-etil acetat-acetilne kiseline. Uzorak sa Korčule prikupljen 2001. godine sadržavao je najviše UF prije cvjetanja (6,4%), gotovo jednak udio na početku i u fazi bujnog cvjetanja (5,4% i 5,8%), a najmanje tijekom fruktifikacije (4,7%).

3.2. Antioksidacijska aktivnost cvjetova petrovca

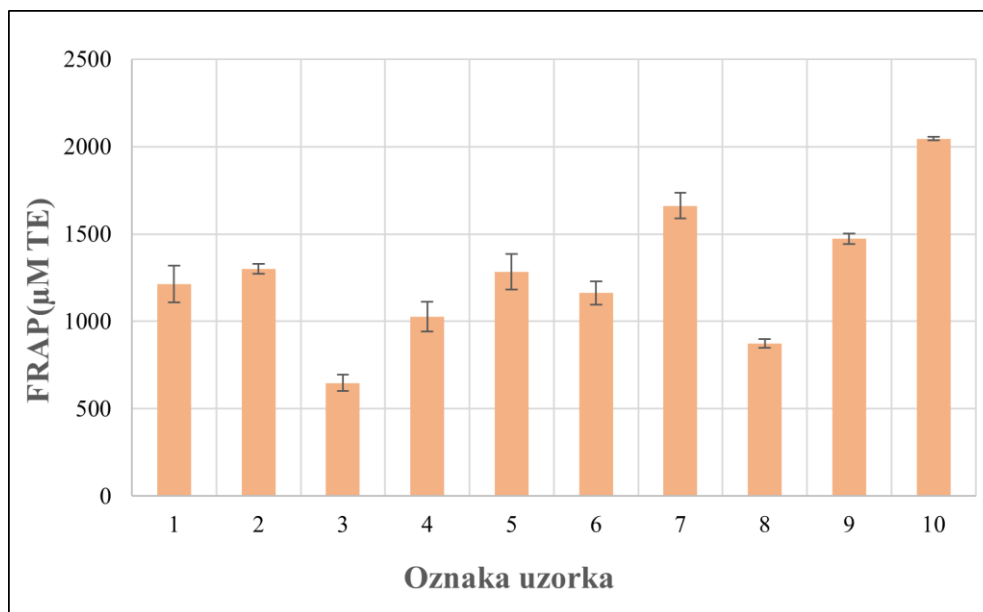
U svrhu određivanja antioksidacijske aktivnosti primijenjena je DPPH metoda, a rezultati su prikazani na slici 25. Uzorak sa područja Senja je pokazao najviši postotak inhibicije DPPH radikala u iznosu od 67,6%, a uzorak s područja Splita najniži (28,3%). Značajniji postotak inhibicije, odnosno preko 50%, imali su uzorci sa područja Jadrije, Drašnica i Krka, dok je kod ostalih uzoraka bio niži od 50%.



Slika 25. Usporedni rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata petrovca određeni korištenjem DPPH metode

Istraživanje Generalić Mekinić i sur. (2016)²⁷ pokazalo je inhibiciju DPPH radikala u iznosu od 61% u etanolnim ekstraktima cvijeta petrovca prikupljenog tijekom perioda cvjetanja na području Splita. Uspoređujući s uzorcima ovog rada, uzorak s područja Senja pokazao je višu antioksidacijsku aktivnost za 7%, a uzorci sa područja Cavtata i Splita nižu za čak 30%. Ostali uzorci su imali približno izraženu inhibiciju DPPH radikala (38,4-57,9%).

Rezultati FRAP metode prikazani su na slici 26 i vidljivo je da je uzorak sa područja Senja pokazao najvišu redukcijsku snagu (2045 $\mu\text{M TE}$), dok je najnižu vrijednost ima uzorak sa područja Cavtata (648 $\mu\text{M TE}$). Izraženiju antioksidacijsku aktivnost ima i uzorak s područja Drašnica (1661 $\mu\text{M TE}$), dok ostali uzorci imaju vrijednost nižu od 1500 $\mu\text{M TE}$.



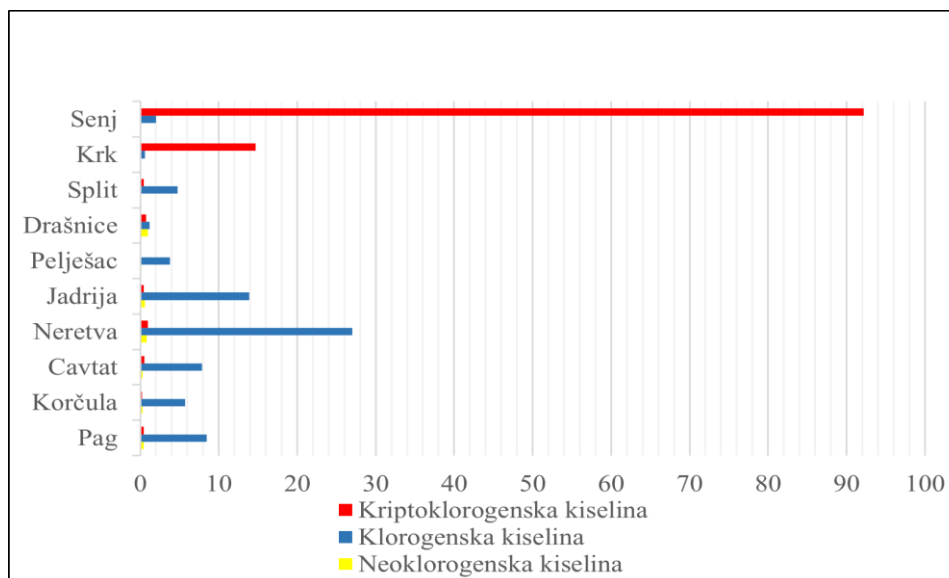
Slika 26. Usporedni rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata analiziranih cvjetova petrovca određenih korištenjem FRAP metode

Generalić Mekinić i sur. (2018)¹⁸ su u etanolnom ekstraktu nadzemnih dijelova petrovca prikupljenog u kolovozu, dokazali antioksidacijsku aktivnost od 20 mM TE, što je deset do dvadeset puta viša vrijednost od testiranih ekstrakata ovog rada.

3.3. Fenolne kiseline cvjetova petrovca

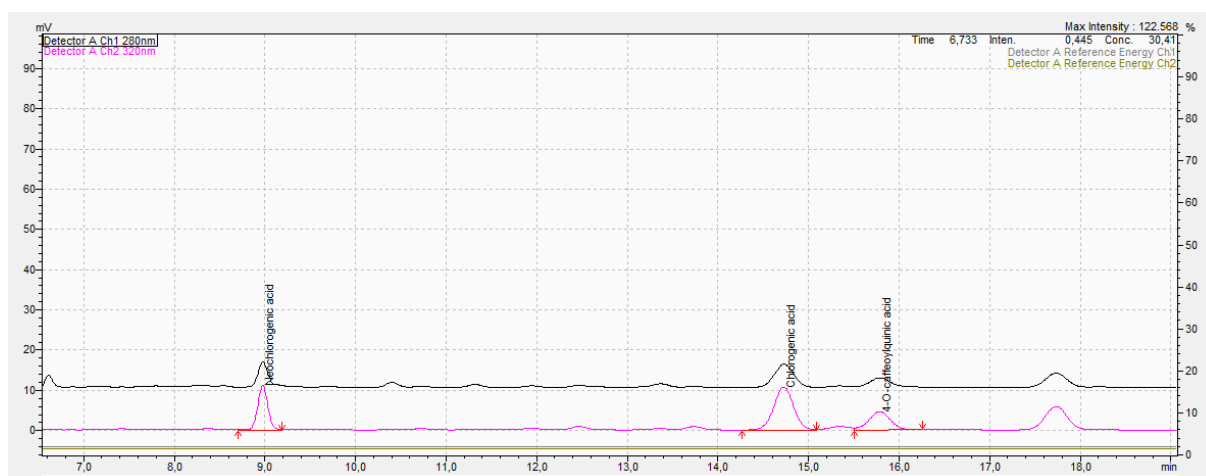
Metodom HPLC-a izvršena je identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina u ekstraktima cvijeta petrovca te su rezultati prikazani na slikama 27 i 28.

Kod većine uzoraka dominantna je klorogenska kiselina, osobito kod uzoraka s područja Neretve (27 mg/L). Značajan je i udio kriptoklorogenske osobito kod uzoraka sa sjevernog područja Jadranske obale, Krka i Senja (14,7 i 92,2 mg/L). Neoklorogenska se pokazala kao najmanje zastupljena kod svih uzoraka s udjelima manjim od 0,9 mg/L.



Slika 27. Koncentracija fenolnih kiselina (mg/L) u uzorcima cvijeta petrovca

Generalić Mekinić i sur. (2016)²⁷ su u istraživanju kvantificirali 7,7 mg/g klorogenske kiseline u ekstraktu cvijeta petrovca s područja Splita. Souid i sur. (2021)⁵⁴ su također potvrdili da je klorogenska kiselina najzastupljenija (7,3 mg/g), ali i da neoklorogenske ima više (2 mg/g) nego kriptoklorogenske (1,2 mg/g) u listu petrovca. Veršić Bratinčević i sur. (2023)³⁸ su analizom nadzemnih dijelova petrovca ekstrahiranih pomoću mikrovalne ekstrakcije odredili njenu koncentraciju u uzorcima od 10 mg/L. Zaključak je da stanište, dio biljke koji se analizira i izbor ekstrakcijske metode znatno utječu na fenolni sastav pripremljenih ekstrakata.



Slika 28. Uvećani kromatogram uzorka cvijeta petrovca dobiven HPLC analizom

4. ZAKLJUČAK

Na temelju prikazanih rezultata može se izvesti zaključak da stanište uvelike utječe na fenolni sastav obalnog petrovca. Ekstrakti uzoraka sa područja Senja, Krka i Drašnica pokazali su najviši udio ukupnih fenola te najizraženiju antioksidacijsku aktivnost, dok su rezultati dobiveni za uzorke sa područja Cavtata i Splita pokazali najniže vrijednosti za mjerene parametre. Pored klorogenske kiseline koja je bila najzastupljenija u ekstraktima uzorka iz Neretve, kriptoklorogenska kiselina kvantificirana je u visokom udjelu kod ekstrakata petrovca ubranih na području Senja i Krka. Sve navedeno potvrđuje veliki potencijal ove biljke, i to i njenih cvjetova koji do sada nisu toliko bili istraženi, kako zbog bogatog kemijskog sastava i dobre biološke aktivnosti, tako i zbog njene sposobnosti adaptacije na veće koncentracije soli i otpornosti na klimatske šokove.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

| | |
|--------|--|
| DPPH | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| EAE | ekstrakcija potpomognuta enzimima |
| FC | Folin-Ciocalteu metoda |
| FRAP | antioksidativna moć redukcije željeza |
| GS | plinska kromatografija |
| HPLC | tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti |
| LDL | lipoprotein niske gustoće |
| MAE | mikrovalna ekstrakcija |
| MS | masena spektrometrija |
| PEF | ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem |
| SFE | ekstrakcija superkritičnim fluidom |
| TPTZ | 2,4,6- tripiridil-s-triazin |
| UAE | ultrazvučna ekstrakcija |
| UF | ukupni fenoli |
| UV | ultraljubičasta spektrometrija |
| UV/VIS | spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području |

6. LITERATURA

1. V. Vukadinović, I. Jug, B. Đurđević, Ekofiziologija bilja. Sveučilišni udžbenik NSS, Osijek, 2014, str. 202-209.
2. A. Mishra, B. Tanna, Halophytes: Potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. *Front. Plant Sci.* **8** (2017), str. 1-5, doi: <https://doi.org/10.5897/JMPRX11.009>
3. URL: <https://www.indianarrative.com/science-news/in-a-first-indian-scientists-decode-genes-of-salt-tolerant-mangrove-species-21970.html> (12.7.2023.)
4. URL: https://issuu.com/seagrantpr/docs/mangrove_students_handbook/s/25394473 (12.7.2023.)
5. URL: https://www.researchgate.net/figure/The-structure-and-Na-secretion-pathway-of-a-salt-bladder-A-and-a-salt-gland-B-A_fig1_304669305 (12.7.2023.)
6. K. Dubravec, I. Regula, Fiziologija bilja. Školska knjiga, Zagreb, 1995, str. 221-223.
7. R. Aslam, N. Bostan i sur., A critical review on halophytes: Salt tolerant plants. **5** (2001), str. 7108-7118, doi: <https://doi.org/10.5897/JMPRX11.009>
8. Hrvatska enciklopedija, <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=42234> (21.7.2023.)
9. URL: Biljke primorja (quantumofjk.blogspot.com) (21.7.2023.)
10. R. Jurišić Grubešić, S. Vladimir-Knežević, Morfološko anatomska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago L.*, Zagreb, 2004, str. 191-203.
11. A. Terlević, Vegetacija stjenovitih morskih obala Hrvatske. Seminarski rad, Preddiplomski studij biologije, Zagreb (2015).
12. M. Arsenović, Morfološka analiza dijaspora porodice *Chenopodiaceae*, Diplomski rad, Zagreb (2001).
13. M. Zovko i sur., Botanička i fitokemijska karakterizacija korijena primorskog omana. *Farmaceutski glasnik* **63** (2007), str. 583-593.
14. Flora Croatica Database (URL: <https://hirc.botanic.hr/fcd/>)
15. URL: https://www.maltawildplants.com/AMAR/Arthrocnemum_macrostachyum.php (21.7.2023.)

16. *M. Kraouia i sur.*, Sea fennel (*Crithmum maritimum L.*) as an emerging crop for the manufacturing of innovative foods and nutraceuticals. *Molecules* **28** (2023), str. 1-12, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28124741>
17. *O. Politeo, M. Popović i sur.*, Chemical profiling of sea fennel (*Crithmum maritimum L.*, *Apiaceae*) essential oils and their isolation residual waste-waters. *Plants* **12** (2023), str. 1, doi: <https://doi.org/10.3390/plants12010214>
18. *I. Generalić Mekinić i sur.*, Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum L.* (*Apiaceae*), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities. *Industrial crops and products* **124** (2018), str. 947-953, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.080>
19. URL: https://www.dreamstime.com/search.php?srh_field=motar+plant (26.8.2023.)
20. URL: <http://www.makaques.com/gallery.php?sp=2416> (26.8.2023.)
21. *Ž. Maleš, I. Žuntar i sur.*, Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire- *Crithmum maritimum L.* *Acta Pharmaceutica* **53** (2003), str. 193-144., ISSN 0031-5362.
22. *K. Hamed*, Sea fennel (*Crithmum maritimum L.*) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regul* **53** (2007), str. 185-194., doi: [10.1007/s10725-007-9217-8](https://doi.org/10.1007/s10725-007-9217-8)
23. *M. Renna*, Reviewing the prospects of sea fennel (*Crithmum maritimum L.*) as emerging vegetable crop. *Plants* **7** (2018), str 1-14, doi: <https://doi.org/10.3390/plants7040092>.
24. URL: <https://www.eatweeds.co.uk/rock-samphire-crithmum-maritimum> (28.8.2023.)
25. *R. Martins Noguero*, Differences in nutrient composition of sea fennel (*Crithmum maritimum*) grown in different habitats and optimally controlled growing conditions. *Journal of Food Composition and Analysis* **106** (2022), 104266, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104266>
26. *M. Renna, M. Gonnella*, The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations. *International Journal of Gastronomy and Food Science* **1** (2012), str. 111-115, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2013.06.004>
27. *I. Generalić Mekinić i sur.*, Sea fennel (*Crithmum maritimum L.*): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *J Food Sci Technol* **53** (2016), str. 3104- 3112, doi: [10.1007/s13197-016-2283-z](https://doi.org/10.1007/s13197-016-2283-z)

28. *O. Houta i sur.*, Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial potentials of *Crithmum maritimum* cultivated in Tunisia arid zones. *JBAPN* **1** (2011), str. 138-143, doi: <https://doi.org/10.1080/22311866.2011.10719081>
29. *L. Meot- Duros i sur.*, Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology* **116** (2008), str. 258- 262, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.024>
30. *L. Meot- Duros i sur.*, New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology* **48** (2010), str. 553- 557, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.031>
31. *A. Abdallah, B. Zouhaier, M. Rabhi, C. Abdelly, A. Smaoui*, Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (*Apiaceae*), *J. Med. Plants Res.* **5** (2011) 3564-3571, doi: <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000569>
32. *J. Glamočlija i sur.*, Antifungal activity of *Crithmum maritimum* essential oil and its components against mushroom pathogen *Mycogone perniciosa*. *Chem Nat Compd* **45** (2009), str. 96- 97, doi: <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9242-0>
33. *M. Tsoukatou i sur.*, Chemical intra-Mediterranean variation and insecticidal activity of *Crithmum maritimum*. *Journal Zeitschrift Naturforschung* **56** (2001), str. 211–215, doi: <https://doi.org/10.1515/znc-2001-3-407>
34. *D. Kliebenstein i A. Osbourn*, Making new molecules-evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **15** (2012), str. 415- 423, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.005>
35. *B. Pevalek- Kozlina*, *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb, 2003, str. 566
36. *Y. Zhang i sur.*, A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis and biological activity. *Natural Product Communications* **17** (2022), str. 1- 14, doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>
37. *H. Al Mamari*, Phenolic compounds: classification, chemistry and updated techniques of analysis and synthesis. Phenolic compounds- chemistry, synthesis, diversity, non- conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications. *IntechOpen* (2002), str. 1-5, doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.98958>

38. *M. Veršić Bratinčević, i sur.*, Comparison of conventional and green extractions techniques for the isolation of phenolic antioxidants from sea fennel. *Processes* **11** (2023), 2172, doi: <https://doi.org/10.3390/pr11072172>
39. *D. Čović i sur.*, Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farmaceutski glasnik* **65** (2009), str. 693- 704.
40. *L. Galić*, Fenolni spojevi u biljkama, Diplomski rad, Osijek (2020).
41. URL:https://www.researchgate.net/publication/354749434_Polyphenols_A_Comprehensive_Review_of_their_Nutritional_Properties/figures?lo=1
(14.11.2023)
42. *P. Lisica*, Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina, Završni rad, Zagreb (2016).
43. URL:<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0963996920303239-gr1a.jpg> (27.11.2023.)
44. *S. Berend, Z. Grabarić*, Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **59** (2008), str. 205-212, doi: <https://doi.org/10.2478/10004-1254-59-2008-1868>
45. *A. Ali*, High-performance liquid chromatography(HPLC): A review. *Annals of advances in chemistry* **6** (2022), str. 10-20, doi: <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>
46. URL:<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
(9.1.2024.)
47. *A. Dawidowicz i sur.*, On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method. *Food Chemistry* **131** (2012), str. 1037-1043, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067>
48. URL:<https://libios.fr/en/analytical-solutions/oxydative-stress-antioxidant-capacity/oxydative-stress-antioxidant-capacity-assay-kits/dpph-antioxidant-capacity> (24.1.2024.)
49. *I. Benzie i J. Strain*, The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as a measure of „antioxidant power“ : the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **239** (1996), str. 70-76, doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
50. URL:https://www.gbiosciences.com/Bioassays/Cell_Health_Assay/Oxidative_Stress_Assays/FRAP_Assay (24.1.2024.)
51. URL:<https://resources.faru.edu.pl/infrastructure/993/hplc-dad-system-shimadzu-prominence-i-lc-2030c-plus> (24.1.2024)

52. L. Gill *i sur.*, Antioxidant defenses in wild growing halophyte *Crithmum maritimum* from inland and coastline populations. *Chemistry & Biodiversity* **16** (2019), doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800448>
53. I. Jallali *i sur.*, Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry* **145** (2014), str. 1031-1038, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.034>
54. A. Souid *i sur.*, Nutraceutical potential of leaf hydro-ethanolic extract of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L., *Molecules* **26** (2021), 5380, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26175380>
55. M. Calvo *i sur.*, Identification of Polyphenols in Sea Fennel (*Crithmum maritimum*) and Seaside Arrowgrass (*Triglochin maritima*) Extracts with Antioxidant, ACE-I, DPP-IV and PEP-Inhibitory Capacity. *Foods* **12** (2023), 3886, doi: <https://doi.org/10.3390/foods12213886>
56. N. Nabet *i sur.*, Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties* **20** (2017), str. 1843–1855, doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1222541>
57. L. Meot-Duros, C. Magne, Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **47** (2009), str. 37-41, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.006>