

Utjecaj ekstrakcijskog otapala na fenolni sastav i antioksidacijska svojstva ekstrakta motra

Divić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:167:614059>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**UTJECAJ EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA NA FENOLNI SASTAV I
ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA MOTRA**

DIPLOMSKI RAD

LUCIJA DIVIĆ

Matični broj: 38

Split, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

UTJECAJ EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA NA FENOLNI SASTAV I
ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA MOTRA

DIPLOMSKI RAD

LUCIJA DIVIĆ

Matični broj: 38

Split, rujan 2023.

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

**IMPACT OF EXTRACTION SOLVENT ON THE PHENOLIC COMPOSITION
AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SEA FENNEL EXTRACTS**

DIPLOMA THESIS

LUCIJA DIVIĆ

Parent number: 38

Split, September 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

UTJECAJ EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA NA FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA MOTRA

Lucija Divić, 38

Sažetak: Motar (*Crithmum maritimum* L.) je halofit koji je odavno poznat u mediteranskoj kuhinji, no zadnjih godina istraživanja sve više ukazuju na njegov ekonomski potencijal i širu primjenu u prehrambene i medicinske svrhe. Biljku odlikuje bogat izvor bioloških aktivnih komponenti uključujući vitamin C, minerale, fenolne spojeve, klorogensku kiselinu te snažna antioksidacijska moć. U ovom istraživanju proučavan je utjecaj različitih ekstrakcijskih otapala na izolaciju fenolnih spojeva iz motra te antioksidacijska aktivnost ekstrakata, korištenjem DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl-hidrate*) i FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda. Vodenim i etanolnim ekstraktima dobivenih primjenom ultrazvučne ekstrakcije (60 °C, 60 Hz, 30 min) ispitan je i utjecaj na inhibicijsku sposobnost oksidacije sezamovog ulja Rancimat metodom (120 °C, 20 L/h). Rezultati su pokazali da odabir ekstrakcijskog otapala ima utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih tanina te na antioksidacijska svojstva ekstrakata motra. Ekstrakt dobiven korištenjem 50%-tnog etanola ima najviši udio ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, dok ekstrakt pripremljen s 96%-tnim etanolom sadrži najviši udio ukupnih tanina. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da alkoholni ekstrakti motra pokazuju bolju antioksidacijsku aktivnost od vodenog ekstrakta, te da se s povećanjem udjela alkohola produljuje vrijeme indukcije ulja. S druge strane, vodeni ekstrakt ima negativan učinak na stabilnost ulja, odnosno pro oksidacijsko djelovanje.

Ključne riječi: motar, ekstrakcijsko otapalo, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, Rancimat

Rad sadrži: 46 stranica, 25 slika, 6 tablica, 61 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

- | | | |
|----|--|-------------|
| 1. | Doc. dr. sc. Mladenka Šarolić | predsjednik |
| 2. | Dr. sc. Sanja Radman | član |
| 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: PhD Ivana Generalić Mekinić, Assoc. Prof.

IMPACT OF EXTRACTION SOLVENT ON THE PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SEA FENNEL EXTRACTS

Lucija Divić, 38

Abstract:

Sea fennel (*Crithmum maritimum L.*) is a halophyte that has long been known in Mediterranean cuisine, but its economic potential and uses in food and medicine have recently become an increasing focus of research. The plant is characterized by a rich source of bioactive components, including vitamin C, minerals, phenolic compounds, chlorogenic acid, and potent antioxidant properties. In this study, the influence of different extraction solvents on the isolation of phenolic compounds from sea fennel and the antioxidant capacity of the extracts obtained were investigated using the DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate*) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) methods. The impact on the oxidative stability of sesame oil was also studied using water and ethanol extracts obtained by ultrasound-assisted extraction (60 °C, 60 Hz, 30 min) by the Rancimat method (120 °C, 20 L/h). The results showed that the choice of extraction solvent had an effect on the extraction of total phenols, total flavonoids, total tannins, and antioxidant properties of sea fennel. The extract with 50% ethanol had the highest content of total phenols and total flavonoids, while the extract with 96% ethanol had the highest content of total tannins. The results indicate that alcohol extracts of sea fennel have better antioxidant activity than water extract, and increasing the alcohol content in the extract prolongs the induction time of sesame oil. The water extracts, on the other hand, had negative effects on oil stability and prooxidant activity.

Keywords: sea fennel, extraction solvent, phenolic compounds, antioxidant activity, Rancimat

Thesis contains: 46 pages, 25 figures, 6 tables, 61 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|--|--------------|
| 1. PhD, Asst. Prof. Mladenka Šarolić | chair person |
| 2. PhD, Sanja Radman | member |
| 3. PhD, Assoc. Prof. Ivana Generalić Mekinić | 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 mentorstvo izv. prof. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić u razdoblju od veljače 2022. godine do rujna 2023. godine.

Ovaj rad je u potpunosti financiran sredstvima projekta SEAFENNEL4MED (PRIMA 2021, Section 2) (<https://seafennel4med.com/>).

Dio opreme korištene u ovom radu financiran je iz projekta EU „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“, KK. 01.1.1.02.0018.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na ukazanom povjerenju, stručnim savjetima i izdvojenom vremenu tijekom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem mag. ing. cheming. Petri Brzović na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada. Od srca se zahvaljujem svim prijateljima koje sam stekla tijekom studiranja i koji su taj dio mog života učinili nezaboravnim. Najveće hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i vjeri u mene i moj uspjeh.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

U ovom diplomskom radu zadatak je bio ispitati utjecaj različitih ekstrakcijskih otapala na sastav ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih tanina te promjene u antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata motra, testiranoj korištenjem metoda DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl-hidrate*) i FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*). Također ispitan je učinak ekstrakata motra na oksidacijsku stabilnost sezamovog ulja korištenjem Rancimat metode.

SAŽETAK

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je halofit koji je odavno poznat u mediteranskoj kuhinji, no zadnjih godina istraživanja sve više ukazuju na njegov ekonomski potencijal i širu primjenu u prehrambene i medicinske svrhe. Biljku odlikuje bogat izvor bioloških aktivnih komponenti uključujući vitamin C, minerale, fenolne spojeve, klorogensku kiselinu te snažna antioksidacijska moć. U ovom istraživanju proučavan je utjecaj različitih ekstrakcijskih otapala na izolaciju fenolnih spojeva iz motra te antioksidacijska aktivnost ekstrakata, korištenjem DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate*) i FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda. Vodenim i etanolnim ekstraktima dobivenih primjenom ultrazvučne ekstrakcije (60 °C, 60 Hz, 30 min) ispitan je i utjecaj na inhibicijsku sposobnost oksidacije sezamovog ulja Rancimat metodom (120 °C, 20 L/h). Rezultati su pokazali da odabir ekstrakcijskog otapala ima utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih tanina te na antioksidacijska svojstva ekstrakata motra. Ekstrakt dobiven korištenjem 50%-tnog etanola ima najviši udio ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, dok ekstrakt pripremljen s 96%-tnim etanolom sadrži najviši udio ukupnih tanina. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da alkoholni ekstrakti motra pokazuju bolju antioksidacijsku aktivnost od vodenog ekstrakta, te da se s povećanjem udjela alkohola produljuje vrijeme indukcije ulja. S druge strane, vodeni ekstrakt ima negativan učinak na stabilnost ulja, odnosno pro oksidacijsko djelovanje.

Ključne riječi: motar, ekstrakcijsko otapalo, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, Rancimat

ABSTRACT

Sea fennel (*Crithmum maritimum L.*) is a halophyte that has long been known in Mediterranean cuisine, but its economic potential and uses in food and medicine have recently become an increasing focus of research. The plant is characterized by a rich source of bioactive components, including vitamin C, minerals, phenolic compounds, chlorogenic acid, and potent antioxidant properties. In this study, the influence of different extraction solvents on the isolation of phenolic compounds from sea fennel and the antioxidant capacity of the extracts obtained were investigated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) methods. The impact on the oxidative stability of sesame oil was also studied using water and ethanol extracts obtained by ultrasound-assisted extraction (60 °C, 60 Hz, 30 min) by the Rancimat method (120 °C, 20 L/h). The results showed that the choice of extraction solvent had an effect on the extraction of total phenols, total flavonoids, total tannins, and antioxidant properties of sea fennel. The extract with 50% ethanol had the highest content of total phenols and total flavonoids, while the extract with 96% ethanol had the highest content of total tannins. The results indicate that alcohol extracts of sea fennel have better antioxidant activity than water extract, and increasing the alcohol content in the extract prolongs the induction time of sesame oil. The water extracts, on the other hand, had negative effects on the oil stability and prooxidant activity.

Keywords: sea fennel, extraction solvent, phenolic compounds, antioxidant activity, Rancimat

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1 Halofiti.....	2
1.1.1 Motar	4
1.1.2 Kemijski sastav motra	6
1.1.3 Znanstvena istraživanja motra	8
1.2 Fenolni spojevi.....	11
1.3 Ekstrakcija	17
1.3.1 Ultrazvučna ekstrakcija- UAE	18
1.4 Rancimat metoda	20
2. EKSPERIMENTALNI DIO	21
2.1. Materijali	21
2.2. Kemikalije i uređaji.....	21
2.3. Ultrazvučna ekstrakcija	22
2.4. Određivanje ukupnih fenola	22
2.5. Metoda određivanja ukupnih flavonoida.....	24
2.6. Metoda određivanja ukupnih tanina.....	25
2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	26
2.7.1. DPPH metoda	26
2.7.2. FRAP metoda.....	26
2.7.3. Rancimat metoda.....	28
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola	30
3.2. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida.....	32
3.3. Rezultati određivanja ukupnih tanina.....	33
3.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	34
3.4.1. DPPH metoda	34
3.4.2. FRAP metoda.....	35
3.4.3. Rancimat metoda.....	36
4. ZAKLJUČAK.....	38
5. POPIS KRATICA I SIMBOLA	39
6. LITERATURA.....	40

UVOD

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je divlji, grmoliki halofit koji raste na obalnim ekosustavima Sredozemnog i Crnog mora, te na atlanskoj obali. Zbog svog kemijskog sastava ima značajan ekonomski i medicinski potencijal. Motar odlikuje visok sadržaj bioaktivnih spojeva koji imaju nutritivna, ljekovita i brojna pozitivna biološka svojstva. Ova aromatična biljka od davnina je poznata po visokom udjelu vitamina C te se koristila u liječenju skorbuta kod mornara. Uz vitamin C, sadrži mnoštvo minerala, mnogobrojne fenolne spojeve, karotenoide, te ulje bogato ω -3 i ω -6 masnim kiselinama. Na kemijski sastav motra utječu razni čimbenici poput vrste, staništa, klime i uvjeta okoline, razdoblja vegetacije, perioda branja i ostalih. Na sastav i svojstva ekstrakata koji su predmet brojnih istraživanja utječe i način obrade biljnog materijala, te čimbenici primijenjene metode ekstrakcije kao što su korišteno ekstrakcijsko otapalo, vrijeme ekstrakcije, temperatura, primijenjene tehnike, itd. Ultrazvučna ekstrakcija, jedna je od nekonvencionalnih metoda ekstrakcije kojima se u posljednje vrijeme sve više pridodaje važnost zbog energetske i ekonomske isplativosti, ali i boljeg prinosa ciljanih spojeva.

1. OPĆI DIO

1.1 Halofiti

U slanjače ili halofite ubrajamo posebne biljne vrste koje su razvile mehanizme koji im omogućuju rast i razmnožavanje na staništima visoke koncentracije soli. Rastu na područjima gdje se evapotransporacijom oslobađa sol iz vode, što dovodi do povećanja koncentracije soli u tlu. Primjeri takvih staništa uključuju estuarije pod utjecajem plime i oseke, obalna područja uz kopnena jezera, slane močvare, poljoprivredna tla koja se prekomjerno navodnjavaju te pustinje s visokim sadržajem lako topivih soli.¹

Ovisno o uvjetima okoline biološka prilagodba halofita uveliko se razlikuje. Većini halofita, dvosupnica, pogoduje rast u uvjetima gdje se koncentracija soli kreće u rasponu 50-250 mM, dok ostale vrste jednosupnica pokazuju optimalan rast pri niskim koncentracijama od 50 mM i niže.²

Zbog visokog sadržaja natrija, kalija, magnezija, klora i sulfata, halofite odlikuje visok osmotski tlak staničnog soka te su stoga sposobni uzimati vodu iz slanih staništa. Temeljem navedenog, pepeo halofita bogat je mnoštvom minerala čiji sadržaj čini čak do 50% suhe tvari. No, suočavanjem s prekomjernim nakupljanjem soli halofiti su prisiljeni razviti posebne prilagodbe za život na staništima visokog saliniteta. Uklanjanje soli odvija se putem različitih mehanizama poput nakupljanja iste u metaboličkim neaktivnim dijelovima biljke, odnosno izdvajanjem u korijenu čime se izlučuje 99% soli. Također korijen halofitinih biljnih vrsta ima sposobnost inhibicije ulaska soli u biljku provođenjem ultrafiltracije na plazmatskim membranama. Ostali načini izdvajanja soli se postižu nakupljanjem veće količine vode u staničnom soku (sukulentnost), uočavanje i prevencija unosa Na^+ i Cl^- iona iz okolnog medija mehanizmom aktivnog transporta u staničnim membranama, izdvajanjem pomoću solnih žlijezda na listovima te odbacivanjem biljnih dijelova u kojim je sol akumulirana, najčešće u listovima.^{3,4}

Uz razvijene mehanizme redukcije soli kao posljedica rasta na slanim staništima kod halofita su uočene i morfološke promjene vegetativnih organa. Kada je riječ o dvodomnim biljkama, povećana koncentracija soli ima utjecaj na distribuciju spolova, što rezultira većim brojem muških jedinki. Također na slanijim staništima uočava se povećan broj razvijenih cvjetova (kod jednogodišnjih biljaka), smanjenje veličine listova te

povećanje njihove debljine. Istovremeno, dolazi do smanjenja međustaničnog prostora i broja puči. S druge strane, povećava se koncentracija saharoze, proteina, antocijana, karotenoida i raznih organskih kiselina u citoplazmi.⁵

Osim podjele na obligatne halofite (za opstanak moraju živjeti na slanim staništima) i fakultativne halofite (više im odgovaraju slatkovodna zemljišta te staništa niskog saliniteta), halofiti se prema tipu staništa dijele na kserohalofite i hidrohalofite. Hidrohalofitima je za život neophodna voda. Oni mogu preživjeti samo okruženi vodom ili ukoliko rastu na vlažnom tlu, dok kserohalofiti ne zahtijevaju vodu za život, već im je ključno samo slano tlo. Stoga su kserohalofiti često prisutni kao stanovnici kopnenih pustinja. U hrvatskoj flori može se pronaći nekoliko desetaka vrsta halofita među kojima su najpoznatiji motar, morska blitva, caklenjača, omaklina te primorski oman (slika 1.).³



a) Caklenjača



b) Morska blitva



c) Omaklina



d) Primorski oman

Slika 1. Hrvatske halofitne vrste ⁶⁻⁹

1.1.1 Motar

Motar, obalni petrovac ili šćulac (*Crithimum maritimum* L.) je višegodišnja biljka obalnih vapnenačkih grebena i stijena. Član je porodice štitarki (Apiaceae) koja samoniklo raste duž obala Sredozemnog mora, Crnog mora, Britanskih i Kanarskih otoka te duž zapadnih (atlantskih) europskih obala. Prisutan je i na područjima udaljenim od obale, gdje je tlo zaslanjeno uslijed nanošenja morske vode jakim vjetrovima.¹⁰

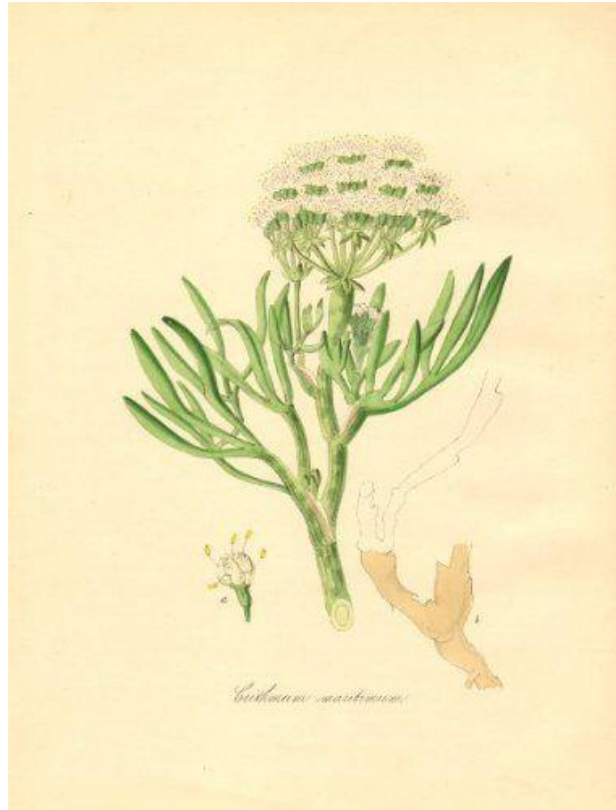


Slika 2. Motar (*Crithimum maritimum* L.)¹¹

Morfološka obilježja motra prikazana su na slici 3. Stabljika ove štitarke doseže visinu do 50 cm te je nerijetko odrvenjela. Izgledom je žućkasta, okrugla, glatke površine i razgranata u gornjem dijelu. Razgranati dio biljke prekrivaju modrozeleni, mesnati, sjajni i sočni listovi. Oni su 1-2 puta rasperani s cjelovitim linearno lancetastim listićima širine do 6 mm i dužine 2,5-5 cm. U kolovozu i rujnu pojavljuju se štitasti, zeleno-žuti cvjetovi. Na vjenčiću se nalazi 5 zeleno-žutih ili bijelo-zelenih okruglih latica.^{12,13}

Klijanje sjemena motra obično se događa od travnja do lipnja, dok sazrijevanje započinje od listopada i traje do prosinca. Sjeme je veličine 5 mm i široko 2 mm, a izgledom slični

ječmu što opravdava naziv roda *Crithmum*, koji dolazi od grčke riječi za ječam, *krithe*. Naziv vrste *maritimum* znači “od mora“, a ukazuje na područja na kojim biljka raste.¹⁰



Slika 3. Morfološka obilježja motra ¹⁴

Na klijanje sjemena i razvoj mladica utječu čimbenici poput svjetlosti, temperature, slanosti i vlažnosti tla. Međusobno djelovanje ovih čimbenika može poticati ili inhibirati proces klijanja. Visoke temperature imaju inhibirajući učinak na klijanje, te dovode do termodormancije. S druge strane, vrlo niske temperature uzrokuju smanjenu enzimsku aktivnost i usporavaju proces klijanja. Povećavanjem temperatura raste i salinitet, koji dostiže maksimum ljeti. Iako je sama biljka u vegetativnoj fazi tolerantna na povećanu koncentraciju soli, to nije slučaj u fazi klijanja sjemena. Visoka slanost inhibira klijanje zbog niskog vodenog potencijala povezanog sa stresom uzrokovanim solima, stoga u prirodi nema sadnica tijekom ljeta. Vlažnost tla ovisi o padalinama i infiltraciji morske vode tijekom oluja i morskih mijena.^{15,16}

1.1.2 Kemijski sastav motra

Motar je biljka bogata vrijednim bioaktivnim fitokemikalijama koje imaju pozitivne zdravstvene učinke, stoga ima visok potencijal za uporabu u farmaceutskim, medicinskim i prehrambenim proizvodima. Jedan od najznačajnijih i najzastupljenijih fenolnih spojeva je klorogenska kiselina, koja ima dobru antioksidacijsku sposobnost. Uz nju i njene derivate, prisutne su i cimetna kiselina, kafeinska kiselina i vanilinska kiselina, no u znatno nižim količinama. Između istraženih halofita, motar ima najvišu koncentraciju fenolnih spojeva, a njihov sadržaj varira o vegetacijskom razdoblju.¹⁷

Tablica 1. Prosječan sadržaj fenolnih kiselina u motru ¹⁷

Fenolna kiselina	mg/g
Klorogenska	5,65-16,28
Kafeinska	0,10-0,20
Vanilinska	0,11-0,17
Cimetna	0,01-0,02

Iako se cijela biljka može konzumirati, najčešće se jedu listovi. Oni su bogat izvor prirodnih antioksidansa, karotenoida, te ω -3 i ω -6 masnih kiselina (tablica 2).¹⁸ Hlapljiva ulja prisutna u sirovim listovima daju im karakterističan i blago slan okus. Njihov sadržaj varira od 0,15% do 0,3%, dok plodovi sadrže približno 0,8% ulja.^{10,19}

Tablica 2. Prosječan sadržaj lipida i karotenoida u listovima motra, izražen na 100 g suhe tvari ¹⁸

Ukupni lipidi	Neutralni lipidi	Glikolipidi	Fosfolipidi	Karotenoidi
g/100 g	g/100 g	g/100 g	g/100 g	mg/100 g
3,02	2,19	0,57	0,26	33,8

Na važnost nutritivnog značaja listova motra, ukazuje i činjenica da su ga mornari konzumirali u liječenju skorbuta. Naime, osim visokih koncentracija karotenoida i fenolnih spojeva, listovi biljke u velikim količinama sadrže i vitamin C. Osim navedenog, koristili su se u liječenju probavnih tegoba, nadutosti i tegoba urinarnog trakta.²⁰

Tablica 3. Prosječni sadržaj flavonoida, tanina, ukupnih fenola i vitamina C u svježem motru ²¹

Spoj	Količina (mg/100 g)
Flavonoidi	230
Tanini	680
Ukupni fenoli	230
Vitamin C	76,6

Listovi se jedu svježi, kuhani, u salatama, koriste se za aromatiziranje i bojanje umaka i jela, konzerviraju se u ulju ili kisele u octu, a također se upotrebljavaju kao začim. Nutritivna vrijednost motra prikazana je u tablici 4. ²⁰

Tablica 4. Nutritivna vrijednost 100 g motra ²⁰

Voda	88,87 g
Bjelančevine	0,31 g
Ugljikohidrati	2,48 g
Vlakna	5,70 g
Masti	0,39 g
Pepeo	2,25 g

Na kemijski sastav motra također utječe i stanište, odnosno čimbenici okoline. Naime biljke koje su izložene morskom prskanju sadrže veću količinu klorogenske kiseline od onih koje rastu na staništima bogatim hranjivim tvarima te su uz to i zaklonjena. Posljedica toga je povećani stres zbog nedostatka hranjivih tvari. Kao odgovor na stres biljka pojačava sintezu antioksidansa tj. klorogenske kiseline, ostalih fenola, peptida i organskih kiselina.²²

1.1.3 Znanstvena istraživanja motra

Iako je jedno vrijeme ova vrsta halofita bila u potpunosti zaboravljena, posljednjih nekoliko godina intenzivno se istražuje zbog svog specifičnog kemijskog sastava i prepoznatljivih svojstava. Obzirom da je danas sve veća potražnja za funkcionalnom hranom i hranom bogatom fitokemikalijama, prepoznat je i potencijal ove biljke u tom pogledu.

Aleman i sur.²³ istraživali su inkapsulaciju antioksidativnih etanolnih i vodenih ekstrakata motra u sojine liposome za dizajniranje funkcionalne hrane. Prirodni antioksidansi koriste se u funkcionalnoj hrani radi prevencije raznih bolesti i inhibicije oksidacije namirnica, no interakcijom s komponentama hrane njihovo djelovanje može biti ometano. Istraživanje je pokazalo da se liposomi tretirani ekstraktima motra mogu koristiti kao stabilizatori u cilju proizvodnje hrane poboljšane vrijednosti, zbog visokog učinka zadržavanja ekstrakata u samom liposomu.

Alves-Silva i sur.²⁴ proveli su istraživanje bioloških svojstava eteričnog ulja motra dobivenog hidrodestilacijom, kao i vode koja zaostaje nakon tog procesa. Korištenjem DPPH metode utvrđeno je dobro antioksidacijsko svojstvo izolata koje se prepisuje prisutnosti klorogenske kiseline i derivata kvercetina. Analizom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije s nizom diodnih detektora i spektrometrijom masa (HPLC-DAD-MS) utvrđeno je prisustvo visokih koncentracija hidrokisimne kiseline i flavonoidnih glikozida. Sastav eteričnog ulja istražen je vezanom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS), pri čemu su kao najzastupljeniji spojevi identificirani γ -terpinen, sabinen te metil-eter-timol. Također, dokazano je da eterično ulje motra inhibira virulenciju gljivice *Candida albicans* smanjujući formiranje biofilma i usporavajući stvaranje zametne cijevi za više od 50%.

U radu Atia i sur.¹⁶ istaknuta je važnost i ekonomski potencijal biljke motra. Biljka posjeduje visokovrijedne biomolekule s izraženim zdravstvenim potencijalom (antimikrobno, aromatsko, insekticidno i ljekovito djelovanje). Također, iznimno je tolerantna na salinitet, što pridonosi njenom ekonomskom potencijalu. Uspješno se uzgaja na slanim staništima te predstavlja veliki potencijal za razvoj bioslane poljoprivrede. U tradicionalnoj europskoj kuhinji koristi se zbog bogatstva minerala, dok se u narodnoj medicini upotrebljavao kao diuretik, sredstvo protiv crijevnih parazita, tonik, karminativ,

protiv upala mokraćnog sustava i prostate, te za ublažavanje grčeva i drugih tegoba. U narodnoj veterini, nadzemni dijelovi su se koristili kao dodatak hrane za zečeve, dok su listovi služili kao poticaj za proizvodnju mlijeka u životinja. Ulje listova sadrži visoki udio esencijalnih masnih kiselina i pokazuje blagotvorne učinke u prevenciji srčanih bolesti. Autori također ističu antioksidativna svojstva te antibakterijsko djelovanje eteričnog ulja kod Gram-pozitivnih bakterija *Bacillus cereus* i *Micrococcus luteus*. Napolarni ekstrakti motra pokazuju antimikrobno djelovanje prema *Salmonella arizonae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. marginalis* te gljivici *C. albicans*.

Istraživanje Generalić-Mekinić i sur.¹⁹ obuhvatilo je analizu eteričnih ulja cvjetova, listova i stabljike motra, kao i spojeva etanolnih ekstrakata. Glavni spoj koji se nalazio u uljima bio je limonen, s udjelom 57,5-74,2%, a u ekstraktima klorogenska kiselina s koncentracijom 0,7-8,1 mg/g suhe biljne tvari. Utvrđeno je da su ekstrakti cvijeta motra pokazali bolju antioksidacijsku i vazodilatacijsku aktivnost. S druge strane, eterična ulja su pokazala bolju učinkovitost u inhibiranju djelovanja kolinesteraze.

Houta i sur.²⁵ su ispitivali fenolni profil, antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje nadzemnih dijelova biljke motra s područja Tunisa. Najveću antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom, pokazao je ekstrakt sjemenki. Isti ekstrakt pokazao je najveću moć inhibicije za Gram-pozitivnu bakteriju *Staphylococcus epidermidis*. Ekstrakt stabljike imao je najveći promjer inhibicije (13 mm) na Gram-negativnu bakteriju *P. aeruginosa*. Svi dijelovi biljke pokazali su različitu zastupljenost fenolnih spojeva.

Chen i suradnici²⁶ su po prvi put identificirali osam flavonoida iz lista motra i to 5-hidroksi-7,4'-dimetoksiflavon, 5-hidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon, 5,3'-dihidroksi-7,4'-dimetoksiflavon, 5,4'-dihidroksi-7,3'-dimetoksiflavon, 5,4'-dihidroksi-7-metoksiflavon, 3,5-dihidroksi-7,3',4',5'-tetrametoksiflavon, 5,8-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavon i 5,8-dihidroksi-7,4'-dimetoksiflavon.

Kadoglidou i suradnici²⁷ istražili su kemijski sastav i antioksidacijsku aktivnost osamnaest genotipova motra s geografskim podrijetlom iz osam različitih regija Grčke. Rezultati su pokazali značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti, sadržaju vitamina C i fenolnom sadržaju među analiziranim genotipovima, dok je molekularna karakterizacija otkrila malu genetsku razliku među analiziranim populacijama.

Istraživanje koje su proveli Kulišić-Bilušić i sur.²⁸ usporedilo je kemijski sastav i biološka svojstva eteričnih ulja divljeg kapara i motra s područja Dalmacije. Pomoću GC-MS analize ulja dobivenih hidrodestilacijom utvrđeno je da je eterično ulje motra najviše zasićeno limonenom (58,37%), te sadrži sabinen, terpinen-4-ol te g-terpinen. Antioksidacijska svojstva uzoraka su mjerena pomoću testa reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (TBARS) i metode izbjeljivanja β -karotena, pri čemu su pokazala učinkovito djelovanje u inhibiciji oksidacije lipida. Također, po prvi put je testirano i djelovanje eteričnih ulja na inhibiciju oksidacije ljudskog lipoproteina niske gustoće (LDL), pri čemu se eterično ulje motra pokazalo djelotvornijim od ulja kapara.

Istraživanje koje su proveli Maleš i sur.²⁹ obuhvaćalo je kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i tanina u nadzemnim dijelovima motra. Uzorkovanje se vršilo na tri različite geografske lokacije duž hrvatske obale, u različitim fazama rasta biljke. Utvrđeno je da udio ukupnih fenola varira od 4,72 do 9,47%, dok sadržaj tanina iznosi između 0,10 i 2,65%. Rezultati su pokazali da navedeni spojevi dosežu najveću koncentraciju prije cvjetanja i na samom početku cvjetanja. Najviši sadržaj flavonoida zabilježen je prije samog cvjetanja, s vrijednostima od 0,08 do 0,42%.

Ozcan i suradnici³⁰ proveli su usporedbu fenolnog profila i antioksidacijske sposobnosti svježeg i fermentiranog motra, kao i njegovog eteričnog ulja. Rezultati su pokazali smanjenje antioksidacijske aktivnosti fermentiranog motra sa 90 na 63%. Vrijednost ukupnih fenola također se smanjila sa 259 na 78 mg/100 g, dok se vrijednost ukupnih flavonoida smanjila s 2115 na 391 mg/100 g. U fermentiranim listovima primijećen je porast udjela β -felandrena, (Z)- β -ocimena, γ -terpinena i terpinen-4-ola tijekom fermentacije, dok se s druge strane sadržaj sabinena, limonena i α -pinena smanjio. Na sadržaj eteričnog ulja fermentacija nije značajno utjecala, no ipak je eterično ulje fermentiranog motra imalo više identificiranih hlapljivih spojeva.

U istraživanju kojeg su proveli Rico i suradnici³¹, proučavan je utjecaj jestive folije na bazi hitozana formulirane s motrom i njegovim ekstraktom na produljenje roka trajanja ribljih burgera. Rezultati analize su pokazali da ekstrakt motra u jestivim folijama stabilizira pH vrijednost, usporava oksidaciju ribljih lipida te uslijed sadržaja fenola povećava antioksidacijsku aktivnost. Međutim, dodavanje motra i njegovog ekstrakta u folije nije imalo utjecaj na usporavanje mikrobiološkog kvarenja. Senzorska analiza je

pak pokazala da su riblji burger obloženi jestivom folijom od motra bolje ocjenjeni od onih s dodatkom ekstrakta, što se može prepisati boljoj aromi i boji.

1.2 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su spojevi u kojem je jedna ili više hidroksilnih skupina vezana na aromatski prsten. Spojevi koji imaju dvije ili više fenolnih skupina nazivaju se polifenolima, te su kao takvi najčešće zastupljeni u prirodi. Pojavljuju se u obliku polimera, konjugirani ili esterificirani, rijetko u slobodnom obliku.³²

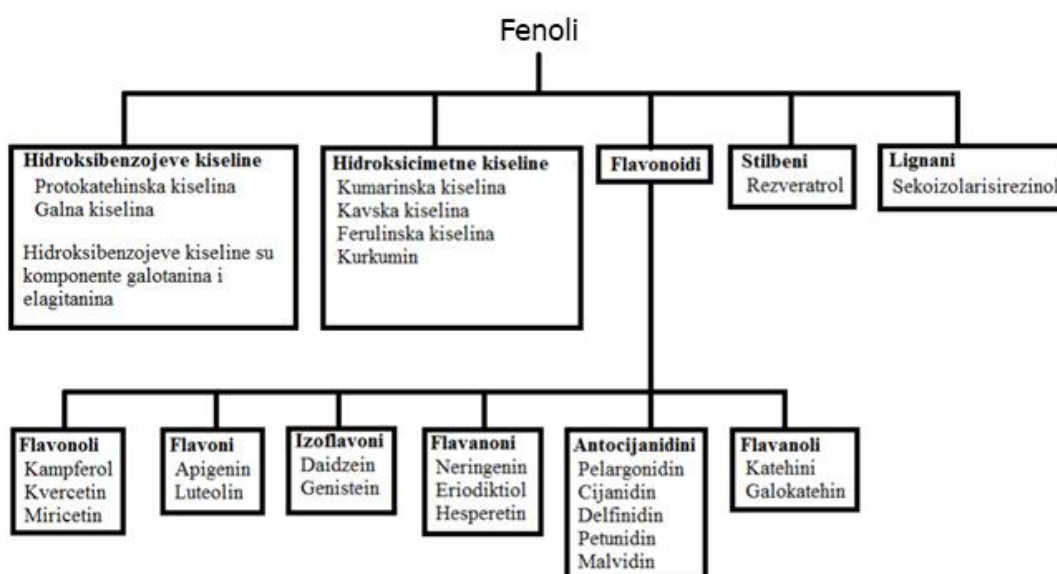
Fenolni spojevi, koji su ključni biljni sekundarni metaboliti, imaju širok raspon bioloških svojstava koja ovise o njihovoj kemijskoj strukturi. Mogu se pojaviti u obliku jednostavne strukture ili složenih polimera velike molekulske mase. Obavljaju važne uloge tijekom rasta i razmnožavanja biljaka, pružaju zaštitu od UV zračenja i patogena, djeluju kao antioksidansi te privlače oprašivače. Također, oni su odgovorni za karakterističnu aromu i boju voća i povrća, vina, čaja, kave i drugih proizvoda. Imaju široku industrijsku primjenu, gdje se koriste kao prirodni konzervansi i bojila, u proizvodnji kozmetike, boja, papira, itd.³³

Fenolni spojevi imaju različita fizikalno-kemijska svojstva. Većina je topljiva u polarnim organskim otapalima, dok njihova topljivost u vodi ovisi o broju i rasporedu hidroksilnih skupina u strukturi molekule. Biljni fenolni spojevi, zbog svojih antioksidacijskih svojstava, pokazuju izraženu sposobnost hvatanja slobodnih radikala, vezanja metalnih iona, doniranja elektrona ili vodikovih atoma. Imaju važnu ulogu u zaštiti biljnih stanica od oksidativnih oštećenja koja su uzrokovana slobodnim kisikovim radikalima. Stoga, kada biljka doživi stresne uvjete okoline poput slanosti, suše, prevelike izloženosti suncu i/ili nedostatka hranjivih tvari, povećava proizvodnju antioksidansa.²²

Jedno od karakterističnih obilježja ovih spojeva je njihova boja koja potječe od pigmenta žutih, crvenih, ljubičastih i plavih tonova. Povrh toga, svi imaju sposobnost apsorpcije svjetlosti u UV dijelu spektra, dok obojeni fenolni spojevi apsorbiraju i u vidljivom dijelu spektra. Različite skupine spojeva imaju i različite apsorpcijske maksimume, pa tako fenoli i fenolne kiseline apsorbiraju u području 250-290 nm, dok flavoni i flavonoli apsorbiraju u području od 250 do 350 nm. Neki fenolni spojevi imaju specifične mirise i

okuse. Na primjer vanilin ima prepoznatljiv sladak miris, dok eugenol daje karakterističan miris klinčića. Za većinu fenolnih spojeva se veže gorak i trpak okus.³⁴

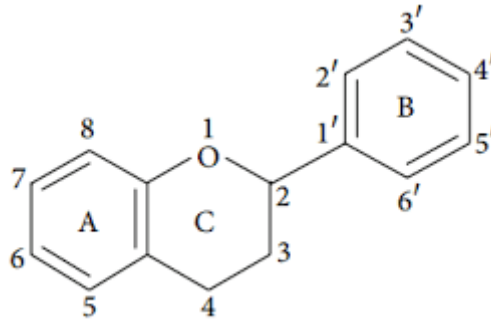
Glavna podjela fenola zasniva se prema broju aromatskih prstena i strukturnim elementima koji ih povezuju. Stoga u najvažnije skupine ubrajamo flavonoide, fenolne kiseline, stilbene, lignane i ostale. Na slici 4. je prikazana osnovna podjela fenolnih spojeva.³³



Slika 4. Podjela fenola³⁵

Flavonoidi

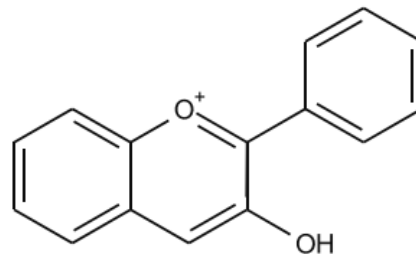
Flavonoidi su najzastupljeniji biljni fenoli. U ovu skupinu se ubrajaju flavoni, flavonoli, izoflavonoli i antocijani. Sadrže 15 C-atoma podijeljenih u dva aromatska prstena, A i B, koja su međusobno povezana s tri C-atoma, tvoreći heterociklički prsten C. Varijacije supstitucije u prstenu C upravo čine razliku među podskupinama flavonoida. Oni mogu sadržavati razne supstituente, a obično sadrži hidroksilne skupine i šećere tvoreći glikozide čija je topljivost u vodi bolja. Glavna uloga flavonoida u biljci je pigmentacija te obrana od UV zračenja i patogena.³⁶



Slika 5. Osnovna struktura flavonoida³⁷

Antocijani

U ovu skupinu glikozida spadaju cijanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin i petunidin. Oni se međusobno razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina. Antocijani su pigmentirani flavonoidi smješteni obično u laticama i plodovima. Njihova uloga je privući oprašivače svojom bojom. Antocijani s metalnim kompleksima tvore ko-pigmente kako bi što bolje privukli oprašivače. Aglikoni ove podskupine nazivaju se antocijanidini.³⁸

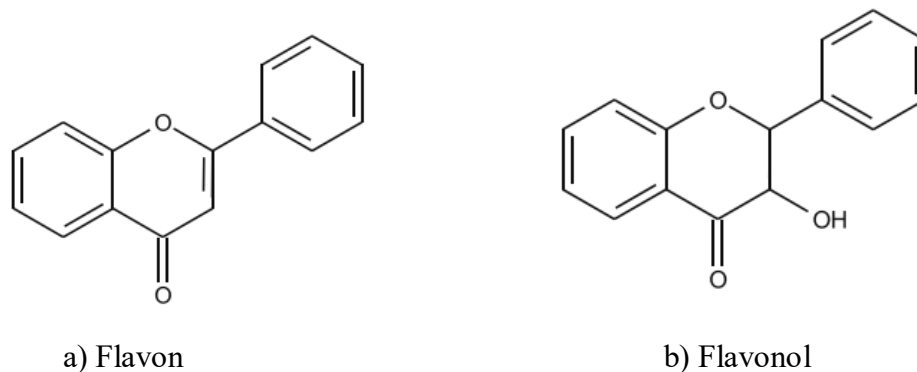


Slika 6. Antocijanidin³⁹

Flavoni i flavonoli

Ove dvije skupine biljnih flavonoida, flavoni i flavonoli, prisutni su u cvjetovima, listovima i stabljikama. Nevidljivi su ljudskom oko obzirom da apsorbiraju kraće valne duljine od antocijana. Njihova primarna uloga je zaštita biljke od UV-B zračenja i privlačenje oprašivača.

Flavonoli, zajedno sa antocijanima, tvore ko-pigmente. Javljaju se kao glikozidi s konjugacijama na 3', 4', 5' 5 i 7 C-atomu. Najzastupljeniji su kvercetin, kampferol, izorhamnetin i miricetin. S, druge strane flavoni se razlikuju od flavonola po tome što nemaju hidroksilnu skupinu na trećem C-atomu. Oni mogu biti supstituirani alkilnim, hidroksilnim, metilnim i glikozidnim skupinama. Iako nisu uvelike rasprostranjeni u biljakama, daju im boju i okus. Najpoznatiji flavoni su apigenin, baikalein i luteolin.⁴⁰

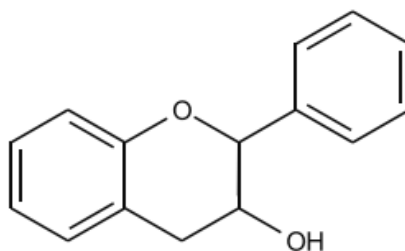


Slika 7. Strukture flavona i flavonola³⁹

Flavanoli

Flavan-3-oli su najsloženija skupina flavonoida. S jednostavnim monomerima tvore oligomere te polimerne proantocijanidine, koji su poznati i kao kondenzirani tanini. Jedno od specifičnih obilježja flavanola je da se u prirodi ne pojavljuju kao glikozidi, za razliku od drugih flavonoida.

Obzirom da sadrže dva kiralna centra, na C2 i C3 atomima, to rezultira tvorbom dvaju izomera (+)-katehina i dvaju (–)-izomera epikatehina. Osim toga, prisutan je i treći kiralni centar, C4, koji se javlja u oligomernim i polimernim proantocijanidinama. Ti spojevi mogu biti izgrađeni od čak 50 jedinica, a najzastupljeniji među njima je procijanidin, koji se sastoji od jedinica (epi)katehina. U prehrani ljudi visoke koncentracije flavan-3-ola mogu se pronaći u zelenom čaju, dok je njihov sadržaj u crnom čaju nešto niži. U proizvodnji crnog čaja tijekom fermentacije listova, polifenol oksidaza djeluje na smanjenje udjela flavan-3-ola. Pored spomenutih čajeva, čokolada i marelice su također bogat izvor flavanola.^{34,40}

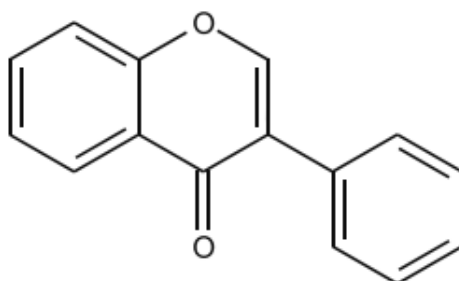


Slika 8. Struktura flavan-3-ola ³⁹

Izoflavonoidi

Izoflavonoidi, za razliku od flavonoida, imaju prsten B na položaju C3. Nazivaju se i fitoestrogeni zbog svoje strukturne sličnosti sa estrogenima. U hrani su prisutni uglavnom u leguminozama, posebno u soji.³⁴

Izoflavonoidi u biljkama imaju mnoštvo uloga. Imaju snažna insekticidna svojstva (rotenoidi), antiestrogeni učinak (uzrokuje neplodnost sisavaca) te djeluju kao fitoaleskini. Fitoaleskini su antimikrobni spojevi čija je uloga inhibiranje djelovanja štetočina, a biljka ih proizvodi kao odgovor na razne bakterijske i gljivične infekcije.³⁸



Slika 9. Struktura izoflavonoida ³⁹

Tanini

Tanini su fenolni polimeri molekulske mase od 600 do 3 000 Da. U prirodi se pojavljuju kao kondenzirani i hidrozabilni tanini. Prema strukturnim svojstvima hidrolizabilni tanini se dijele na galotanine i elagitanine. Njihova uloga u biljaka je zaštita od mikroba, topline i vode, dok se obrambeni učinak zasniva na njihovoj mogućnosti vezanja proteina. Mogu tvoriti komplekse s polisaharidima, proteinima i alkaloidima. Kondenzirani tanini

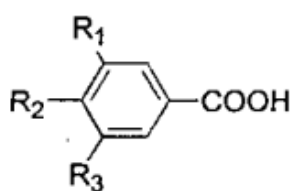
sastavni su dio drvenastih biljaka. Tanini koji se mogu hidrolizirati su polimeri izgrađeni od fenolnih kiselina, najčešće galne, i jednostavnih šećera te se hidroliziraju u razrijeđenim kiselinama. S druge strane, kondenzirani tanini, koji ujedno imaju i veću molekulsku masu, se mogu hidrolizirati upotrebom jakih kiselina do antocijanidina. Kod ljudi stvaraju trpak i oštar okus, stežući usta jer vežu proteine sline.^{38,41}

Fenolne kiseline

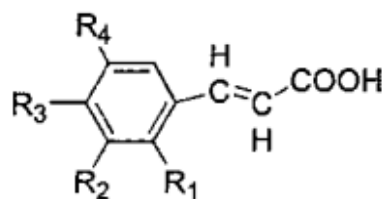
Molekulu fenolne kiseline čini benzenski prsten, karboksilne skupine, hidroksilne i/ili metoksilne skupine. Fenolne kiseline nalaze se u slobodnom, esterificiranom ili glikoziliranom obliku. Dijele se u dvije skupine: hidroksicimetne kiseline (C6-C3) i hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1). U hidroksibenzojeve kiseline se ubrajaju galna, vanilna, siriginska, *p*-hidroksibenzojeva i protokatehinska kiselina. U hidroksicimetne kiseline ubrajamo kaveinsku, sinapinsku, ferulinsku i *p*-kumarinsku kiselinu.^{42,43}

Kaveinska kiselina u obliku estera s kininskom kiselinom tvori klorogensku kiselinu. Spomenute kiseline imaju izražena antioksidacijska svojstva.⁴¹

Uz lignine, hidroksicimetne kiseline izgrađuju stanične stijenke biljaka, pri čemu štite biljku od ozljeda i infekcija te UV zračenja. Ti spojevi se povezuju sa staničnim komponentama i tvore netopive komplekse.⁴³



a) Hidroksibenzojeva kiselina



b) Hidroksicimetna kiselina

Slika 10. Kemijske strukture fenolnih kiselina ⁴⁴

1.3 Ekstrakcija

Tehnološka operacija djelomičnog ili potpunog razdvajanja smjese tvari različite topljivosti korištenjem otapala naziva se ekstrakcija. Razlikujemo ekstrakcije tekuće-tekuće ili kruto-tekuće pri čemu se odvija prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo. Kod ekstrakcije čvrstih uzoraka, isti je potrebno što više homogenizirati kako bi se povećala dodirna površina te omogućio bolji prijenos tvari u korišteno otapalo. Na trajanje ekstrakcije utječu parametri kao što su vrsta otapala (organsko ili anorgansko), temperatura, omjer otapalo-uzorak, protok i veličina čestica. Preporučeno je provoditi ekstrakcije pri višim temperaturama jer se na taj način povećava topljivost uzorka i ubrzava vrijeme ekstrakcije. No, ipak treba voditi računa da temperatura ne prelazi 100 °C kako bi se spriječila degradacija termolabilnih sastojaka.⁴⁵

Kod izbora organskih otapala važni su sljedeći čimbenici: polarnost otapala, vrelište i latentna toplina isparavanja, viskoznost, reaktivnost, stabilnost na kisik i svjetlost, sigurnost za upotrebu, dostupnost, pristupačnost cijene te mogućnost ponovne upotrebe. Poželjno je da vrelište otapala bude što niže kako bi se nakon ekstrakcije lako uklonilo iz uzorka, a također je jako važno da kemijski ne reagira s ekstraktom. Viskoznost mora biti niska kako bi otapalo prošlo kroz sloj krutih čestica. Prednost imaju i nezapaljiva otapala koja nisu toksična te opasna za okoliš i ljude.⁴⁶

Tehnike ekstrakcije dijele se na konvencionalne i nekonvencionalne.

Konvencionalne tehnike ekstrakcije ⁴⁷:

1. Soxhlet ekstrakcija
2. Maceracija
3. Hidrodestilacija

Nekonvencionalne tehnike ekstrakcije ⁴⁷:

1. Ultrazvučna ekstrakcija
2. Ekstrakcija mikrovalovima
3. Ekstrakcija električnim poljem
4. Ekstrakcija pomoću enzima
5. Ekstrakcija visokim tlakom
6. Ekstrakcija superkričnim fluidom

Dugo vrijeme ekstrakcije i mala selektivnost, potreba za skupim i velikim količinama otapala, isparavanje štetnih otapala, degradacija spojeva djelovanjem visokih temperatura, svjetlosti i enzima samo su neki od nedostataka konvencionalnih metoda ekstrakcije. Upravo zbog toga javlja se potreba za učinkovitijim i zelenijim tehnikama ekstrakcije. Nekonvencionalne metode ekstrakcije energetski su učinkovitije, koriste obnovljive sirovine, manje opasne kemikalije i sigurnija otapala, manje količine organskih otapala, skraćeno je vrijeme ekstrakcije i smanjena razgradnja komponenti.⁴⁷

1.3.1 Ultrazvučna ekstrakcija- UAE

Frekvencija ultrazvučnog zračenja veća od 20 kHz pospješuje ekstrakciju krutog uzorka u tekućem otapalu. Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka potpomognuta ultrazvukom temelji se na kavitaciji, odnosno njezinom mehaničkom i toplinskom djelovanju. Kavitacijski mjehurići svojim raspršivanjem oštećuju stanične stijenke biljnog uzorka, te se ovim mehaničkim djelovanjem ultrazvuka postiže bolje prodiranje otapala u matricu uzorka te povećava kontaktna površina između krute i tekuće faze. Djelovanje sonifikacije se odvija pri kontroliranoj temperaturi i vremenu pri čemu frekvencija i raspodjela valova utječu na ekstrakciju. UAE se može izvoditi u kupelji ili pomoću sonde. Njena primjena rezultira kraćim vremenom ekstrakcije, uštedom energije i smanjenom potrošnjom vode (nema refluksa) i porastom prinosa ekstrakcije.^{36,48}

UAE je u prehrambenoj industriji od velike važnosti, obzirom da se njenom primjenom povećava ekstrakcija funkcionalnih spojeva u pred-tretmanima obrade namirnica. Odlična je zamjena za tradicionalne metode ekstrakcije jer se jednostavno može povezati s procesima u industriji, organska otapala je moguće zamijeniti sa sigurnijim otapalima te je sama izvedba brža i u konačnici ekonomičnija. Njome se povećava bioraznolikost nutrijenata biljnog i životinjskog porijekla pri čemu ne dolazi do degradacije komponenti i ne stvaraju se vodikovi i hidroksilni radikali.⁴⁵

Na randman fenolnih spojeva velik utjecaj ima i izbor otapala. U tablici 5. prikazana su neka organska otapala koja se učestalo koriste u ekstrakciji fenolnih spojeva. Najčešće se koriste zakiseljeni etanol i metanol, pri čemu je metanol efikasniji, no, zbog njegovog toksičnog djelovanja vrlo često se koristi ipak etanol.³³

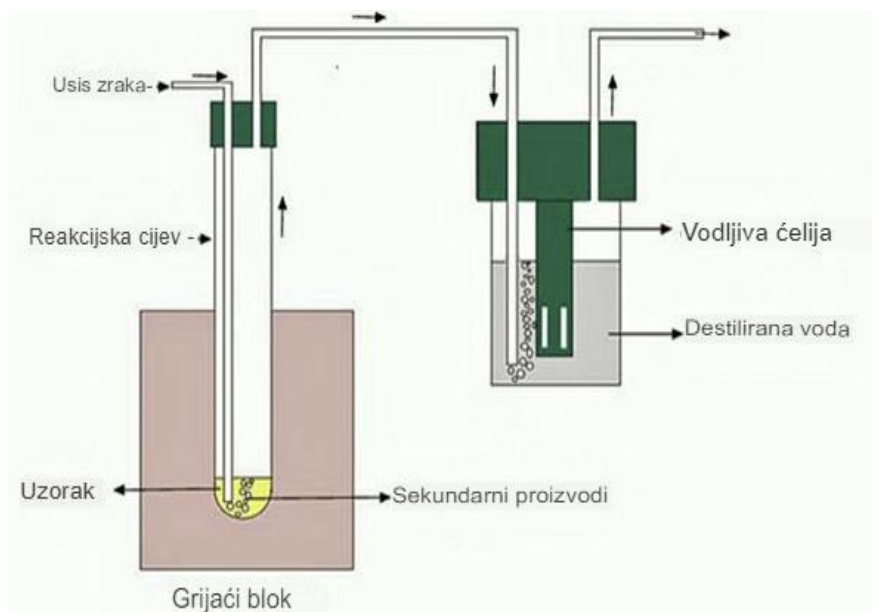
Tablica 5. Korištena organska otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva ³³

Fenolni spojevi	Otapalo
Fenolne kiseline, flavonoli, antocijanini	Etil-acetat
Antocijanini, fenolne kiseline, katehini, flavanoni, flavoni, flavonoli, procijanidini, rutin, klorogenska kiselina, elaginska kiselina	Metanol i razni vodeni oblici (50-90%, v/v)
Antocijanini, slobodne fenolne kiseline, flavonoli	Etanol i razni vodeni oblici (10-90%, v/v)
Flavonoli, slobodne fenolne kiseline	Kloroform
Flavonoli, fenolne kiseline	Dietil-eter
Proantocijanidini, fenolne kiseline	Vruća voda (80-100°C)
Tanini, vezane fenolne kiseline	NaOH (2 M-10 M)
Fenolne komponente, fenolne kiseline	Petrol-eter
Flavonoli, fenolne kiseline, hidroksicimetna kiselina, kumarin, flavonolni ksantoni	Aceton/voda (10-90%, v/v)
Flavonoli, fenolne kiseline, jednostavni fenoli, antocijanini	<i>n</i> -heksan, etil-acetat, izooktan
Polifenoli iz lista masline, oleuropein i rutin	Aceton, etanol i njihove vodene smjese (10-90%, v/v)
Flavonoli, kvercetin 3,4'-diglukozid, kvercetin 4'-monoglukozid	Metanol/voda (70% v/v)

Različita otapala i njihove mješavine ostvaruju i različite prinose fenolnih spojeva. Pa tako vodena ekstrakcija lista sirka ostvaruje visok prinos, dok je s druge strane za ostvarivanje većeg prinosa kod ekstrakcije pšenične mekinje upotrijebljen 80% vodeni etanol. U provedenom istraživanju biljke petoprstnice 50% vodeni etanol se pokazao učinkovitiji pri ekstrakciji njezinih nadzemnih dijelova od čistog etanol te 50% acetona i metanola. Istraživanja na slatkom krumpiru su pokazala da su acidificirana organska otapala pridonijela većoj ekstrakciji antocijana od nezakiseljenih otapala (etanola i metanola).³⁶

1.4. Rancimat metoda

Rancimat metodom automatski se određuje oksidacijska stabilnost masti i ulja pod definiranim uvjetima. Ona se temelji na ubrzanoj oksidaciji lipida pri čemu se uzorak u epruveti propuhuje i zagrijava strujom vrućeg zraka, obično na temperaturama od 110 °C do 130 °C. Nastale sekundarne produkte oksidacije, koje najčešće čine hlapljive organske kiseline, odnosi zadani protok zraka u posude ispunjene destiliranom vodom.⁴⁹ To uzrokuje promjenu električne vodljivosti destilirane vode, koju uređaj mjeri konduktometrijski te na temelju podataka izrađuje Rancimat krivulju. Vrijeme indukcije (IP) može se očitati na krivulji i ono predstavlja mjeru oksidacijske stabilnosti uzorka, tj vrijeme proteklo od početka mjerenja do početka oksidacije uzorka. Maksimum druge derivacije navedene krivulje predstavlja indukcijsko vrijeme.⁵⁰



Slika 11. Shematski prikaz Rancimat aparature ⁵¹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijali

Za izradu eksperimentalnog dijela rada uzorak biljke motra ubran je na području grada Omiša u svibnju 2021. godine. Nakon branja slijedilo je probiranje i pranje uzorka, potom liofilizacija (FD-1D-50; Shanghai Bilon Instrument Co. Ltd, Shanghai, PRC) te usitnjavanje svih dijelova biljke što je prikazano na slici 12.



Slika 12. Liofiliziran i usitnjen uzorak motra

2.2. Kemikalije i uređaji

U svrhu provedbe eksperimentalnog dijela rada, korištene su otopine i reagensi koji su proizvedeni od strane dviju tvrtki: Sigma-Aldrich GmbH (St. Louis, Missouri, SAD) i tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska). Sve korištene otopine i reagensi, bili su analitičke čistoće.

Spektrofotometrijska određivanja provodila su se na spektrofotometru SPECORD 200 Plus, Edition 2010 (Analytik Jena AG, Jena, Njemačka), dok je oksidacijska stabilnost određivana na Rancimat 743 (Metrohm, Herisau, Švicarska) uređaju.



Slika 13. Spektrofotometar SPECORD 200 Plus

2.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Usitnjeni uzorak motra ekstrahiran je sa pet različitih otapala u omjeru 1:10 (w/v).

Korištena otapala su:

1. Destilirana voda
2. 96%-tni etanol
3. 75%-tni etanol
4. 50%-tni etanol
5. 25%-tni etanol

U svaku epruvetu stavljeno je 1 g usitnjenog motra i 10 mL otapala, potom su epruvete stavljene u ultrazvučnu kupelj. Uzorci su podvrgnuti temperaturi od 60 °C, frekvenciji 60 Hz u vremenskom periodu od 30 minuta. Po završetku ultrazvučne ekstrakcije (Ultrasonic cleaner JP-010S, Nuolux) izvršena je filtracija ekstrakta, te su isti skladišteni na temperaturi + 4 °C.

2.4. Određivanje ukupnih fenola

Folin-Ciocalteu analiza jedna je od najkorištenijih metoda za određivanje ukupnog sadržaja fenola u biljnim ekstraktima. Folin-Ciocalteu reagens čini smjesa volframofosfatnih i molibdofosfatnih aniona, te se njegovim dodatkom postiže oksidacija fenolnih grupa do kinona, koja je u lužnatom mediju popraćena plavim obojenjem. Nastalo obojenje proporcionalno je koncentraciji fenolnih spojeva u uzorku te se

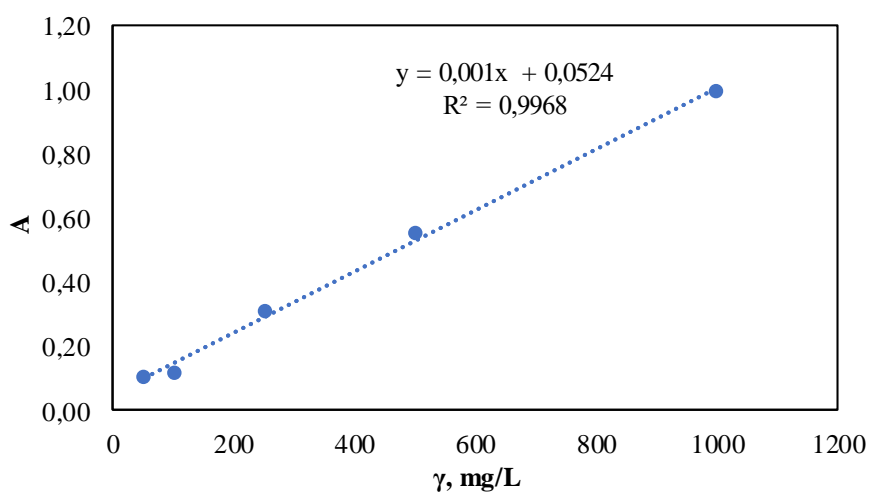
spektrofotometrijski mjeri pri valnoj duljini 765 nm. Kao standard kod Folin-Ciocalteu analize najčešće se upotrebljava galna kiselina.⁵²

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens
2. Zasićena otopina natrijevog karbonata; w (Na₂CO₃) = 20% (w/v)

Postupak određivanja:

U kiveti se pomiješa 25 μL uzorka, 1,975 mL destilirane vode i 125 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 1 minute doda se 375 μL otopine natrijevog karbonata i nastala otopina ostavi se 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega joj se očita absorbancija pri 765 nm. Prema opisanom postupku izrađuje se baždarni pravac za otopine različitih koncentracija galne kiseline. Uz pomoć jednadžbe dobivenog baždarnog pravca izračuna se količina ukupnih fenola izražena u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po 1 L ekstrakta.



Slika 14. Baždarni pravac galne kiseline za određivanje ukupnih fenola

2.5. Metoda određivanja ukupnih flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida koristi se kolorimetrijska metoda u kojoj nastaje produkt žutog obojenja pri dodatku reagensa, aluminijevog klorida i natrijevog nitrita. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se pri valnoj duljini 510 nm.⁵³

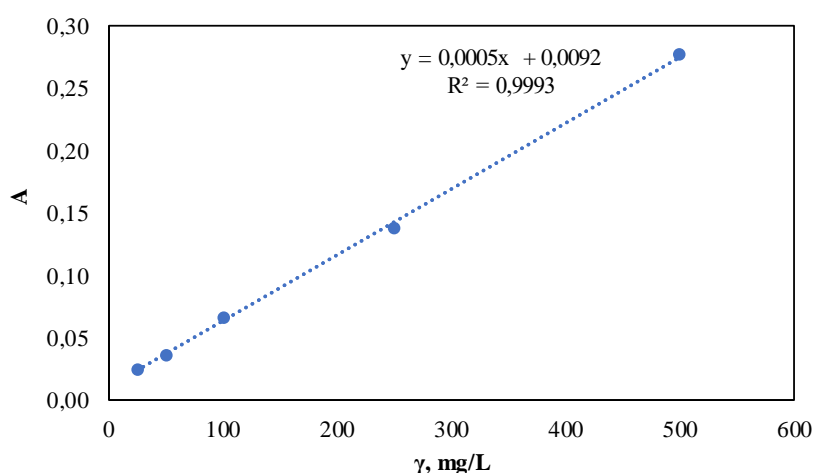
Reagensi:

1. Otopina natrijeva nitrita, w (NaNO_2) = 5% (w/v)
2. Otopina aluminijeva klorida, w (AlCl_3) = 10% (w/v)
3. Otopina natrijevog hidroksida, c (NaOH) = 1 M

Postupak određivanja:

U kivetu se otpipetira 250 μL uzorka, 1,525 mL destilirane vode i 75 μL otopine natrijeva nitrita. Nakon 6 minuta pripremljenoj otopini se doda 150 μL otopine aluminijeva klorida te se ponovo ostavi 5 minuta da odstoji. Potom se doda 500 μL otopine natrijevog hidroksida i 775 μL destilirane vode te se odmah po dodatku vode mjeri absorbancija uzorka.

Pomoću jednadžbe baždarnog pravca dobivenog za otopine rutina izračuna se sadržaj ukupnih flavonoida izražen u mg kvercetina po 1 L ekstrakta (mg QE/L).



Slika 15. Baždarni pravac rutina za određivanje ukupnih flavonoida

2.6. Metoda određivanja ukupnih tanina

Određivanje ukupnih tanina vrši se metodom s vanilinom. Obojenje nastaje reakcijom vanilina s floroglucinolnim skupinama flavonoida, a mjerenja se rade pri valnoj duljini od 500 nm.⁵⁴

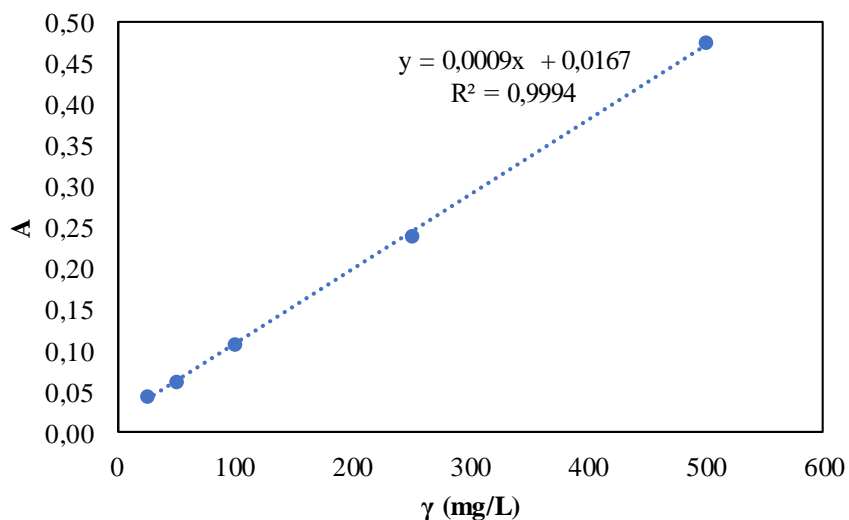
Reagensi:

1. Otopina vanilina, w (vanilin) = 4% (w/v)

Postupak određivanja:

U kivetu se otpipetira 50 μL uzorka, 1,5 mL otopine vanilina i 750 μL koncentrirane klorovodične kiseline. Prije mjerenja absorbancije nastala otopina ostavi se u tami 20 minuta.

Pri izradi baždarnog pravca testiraju se otopine katehina različitih koncentracija po opisanom postupku, a rezultati se iskazuju u miligramima ekvivalenta katehina po 1 L ekstrakta (mg KE/L).



Slika 16. Baždarni pravac katehina korišten za određivanje ukupnih tanina

2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

2.7.1. DPPH metoda

DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate*) metoda je među najraširenijim metodama određivanja antioksidacijske aktivnosti uzorka kod koje antioksidans u reakcijskoj smjesi donira elektron stabilnom i slobodnom radikalu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilu pri čemu dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu što se očituje u snižavanju absorbancije otopine te je razmjerno aktivnosti proučavanog antioksidansa.⁵⁵

Reagensi:

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

Postupak određivanja:

2 mL alkoholne otopine DPPH radikala otpipetira se u kivetu i izmjeri se absorbancija otopine pri 517 nm ($A_{C(0)}$). Potom se otpipetira 50 μ L uzorka, a absorbancija reakcijske smjese ($A_{A(t)}$) izmjeri se 1 sat nakon dodatka pri istoj valnoj duljini. Postotak inhibicije DPPH radikala određuje 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 .

2.7.2. FRAP metoda

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda je metoda kojom se određuje antioksidativna moć uzorka (antioksidansa) da reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} što se prati pri 593 nm. Glavna reakcija zasniva se na redukciji žuto obojenog reagensa željezo-2,4,6-tripiridil-s-tirazinom (TPTZ) u plavo obojeni kompleks u kiselom mediju.⁵⁶

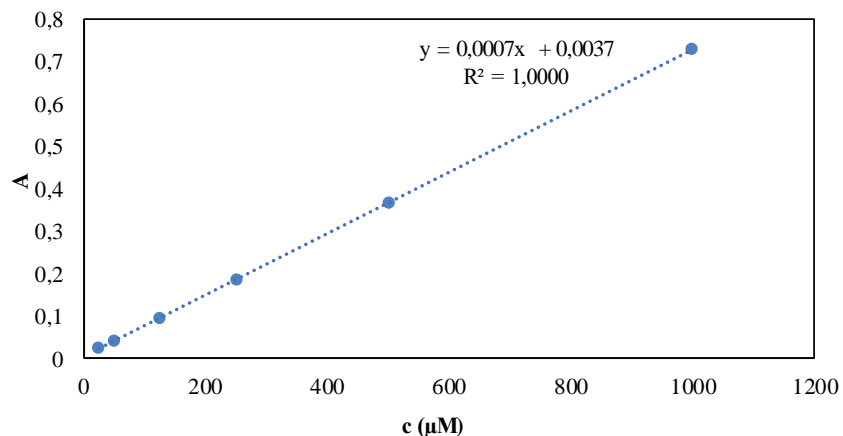
Reagensi:

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

FRAP reagens: 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine FeCl_3 i 2,5 mL otopine TPTZ-a

Postupak određivanja:

3 mL FRAP reagensa otpipetira se kivetu i izmjeri se absorbancija pri 593 nm. Naknadno se doda 100 μL uzorka i se ostavi u tami četiri minute te se potom očita absorbancija nastalog plavog obojenja. Dobivena razlika absorbancije koristi se za računanje FRAP vrijednost ekstrakta korištenjem jednadžbe baždarnog pravca izrađene testiranjem otopina Fe(II) iona. Konačne FRAP vrijednosti izražene su u μM ekvivalenata Fe(II) .



Slika 17. Baždarni pravac otopine Fe(II) iona

2.7.3. Rancimat metoda

Utjecaj ekstrakata motra na oksidacijsku stabilnost sezamovog ulja ispitan je Rancimat metodom. Ovom metodom uzorci ulja podvrgnuti su visokim temperaturama i struji vrućeg zraka koji odnosi hlapljive produkte oksidacije u posudu s destiliranom vodom. Uređaj mjeri promjenu, odnosno porast vodljivosti destilirane vode, a krajnji rezultat izražen je u satima kao induksijsko vrijeme.^{49,50}



Slika 18. Rancimat uređaj

Postupak određivanja:

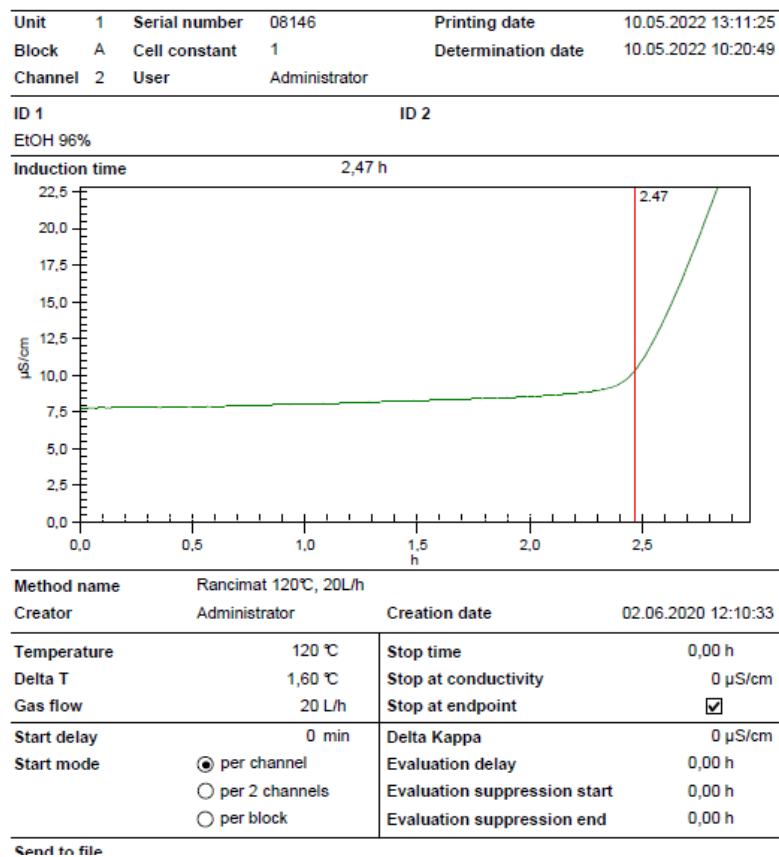
U svaku od 6 epruveta se doda 3 g sezamovog ulja. Dvije epruvete sadrže samo uzorak ulja te služe kao slijepa proba, a u preostale epruvete je dodano 100 μ L ekstrakta motra te je sve zajedno homogenizirano staklenim štapićem. Uzorci su podvrgnuti temperaturi od 120 °C i protoku zraka 20 L/h. Za svaki uzorak rađena su po tri mjerenja.

Izrada Rancimat krivulje

Uređaj automatski mjeri promjenu brzine oksidacije ulja pomoću podataka koji se kontinuirano mjere u posudi napunjenom destiliranom vodom te ih prikazuje u obliku krivulje. Krivulja oksidacije izrađuje se za svaki uzorak, a točka infleksije koja se javlja na krivulji označava induksijsko vrijeme. Praćenje induksijskog vremena rađeno je u cilju određivanja koliko se oksidacijska stabilnosti ulja produljila ili skratila po dodatku ekstrakta u odnosu na vrijeme stabilnosti čistog ulja (slijepa probe).

Uz indukcijsko vrijeme određen je i oksidacijski indeks stabilnosti (OSI) prema izrazu:

$$\text{OSI} = \text{vrijeme indukcije ulja s uzorkom} / \text{vrijeme indukcije čistog ulja}$$



Slika 19. Rancimat krivulja sezamovog ulja sa dodatkom alkoholnog ekstrakta motra

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određen je fenolni profil vodenih i alkoholnih ekstrakata motra te njihova antioksidacijska sposobnost pomoću DPPH i FRAP metoda, te Rancimat metodom. Analizirani uzorci označeni su sljedećim oznakama:

A - vodeni ekstrakt motra

B - alkoholni ekstrakt motra, (25%-tni EtOH)

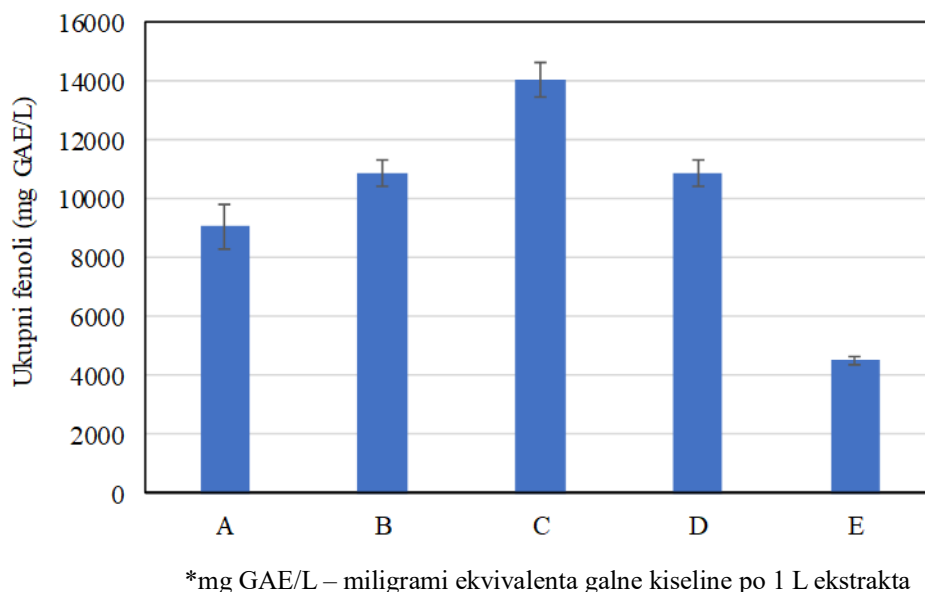
C - alkoholni ekstrakt motra, (50%-tni EtOH)

D - alkoholni ekstrakt motra, (75%-tni EtOH)

E - alkoholni ekstrakt motra, (96%-tni EtOH)

3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima motra određena je primjenom Folin-Ciocalteu metode, a konačni rezultati izračunati preko jednadžbe baždarnog pravca otopine galne kiseline (u mg GAE/g). Na slici 20. prikazani su rezultati iz kojih se može vidjeti gotovo jednak sadržaj ukupnih fenola u alkoholnim ekstraktima B i D, dok je u uzorku A koncentracija ukupnih fenola nešto niža i iznosi 90,65 mg GAE/g suhe tvari. Najveći sadržaj ukupnih fenola detektiran je u uzorku C (140,47 mg GAE/g), a najniži u uzorku E (45,29 mg GAE/g).



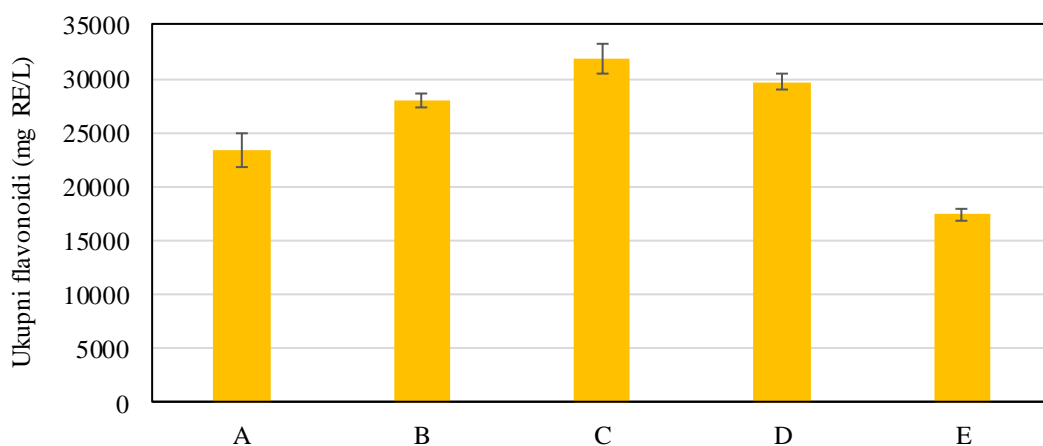
Slika 20. Usporedni prikaz rezultata određivanja udjela ukupnih fenola u ekstraktima motra

Sari i sur. ⁵⁷ su u svom istraživanju također zaključili da različite koncentracije otapala igraju važnu ulogu kod učinkovitosti ekstrakcije ukupnih fenola. Kod ekstrakcije biljke *Centella asiatica* otapalo koje je sadržavalo najveći udio ukupnih fenola je 70%-tni etanol, dok je 96%-tni etanol sadržavao manji udio. Autori pretpostavljaju da polarna otapala rezultiraju boljom topljivošću fenolnih spojeva. Generalić Mekinić i sur. ¹⁹ su u 80%-tnom vodenom etanolu ekstrahirali 35,1 mg GAE/g ukupnih fenola iz lista motra, dok su Meot-Duros i sur. ²² kao otapalo koristili metanol i vodu pomiješane u omjeru 1:1 te su iz motra ekstrahirali najviše 33 mg GAE/g ukupnih fenola. Houta i sur. ²⁵ su čistim metanolom iz listova motra ekstrahirali 11,52 mg GAE/g ukupnih fenola. Razlog različitih udjela ukupnih fenola može biti posljedica korištenja različitih metoda ekstrakcije ili pak upotrebe različitih otapala, međutim i ostali čimbenici kao što su faza rasta biljke, period branja, dio biljke koji se analizira, stanište, predobrada biljnog materijala, trajanje ekstrakcije, odnos biljnog materijala i otapala, itd., također značajno utječu na dobivene rezultate. U istraživanju Souid i sur. ⁵⁸ su zaključili da iste vrste motra u različitim vegetativnim stadijima i s različitim klimatskih regija sadrže različite fenolne spojeve i njihove udjele, te da ekstrakcijsko otapalo ima važnu ulogu u tome. Dokazali su da listovi motra ekstrahirani u vodenom etanolu sadrže 31,7 mg GAE/g suhe tvari ukupnih fenola, znatno veću koncentraciju od iste biljke uzorkovane na istom mjestu, ali ekstrahirane s acetonom i metanolom.

Veršić Bratinčević i sur. ⁵⁹ su dokazali da je kod sadržaja ukupnih fenola motra najzastupljeniji spoj klorogenska kiselina te njeni derivati kriptoklorogenska (cCGA) i neoklorogenska kiselina (nCGA). U listovima motra ekstrahiranim s 80% tnm etanolom detektirano je 8,1 mg/g klorogenske kiseline, 0,22 mg/g cCGA, 0,15 mg/g sinapinske kiseline te 0,09 mg/g nCGA. Isto su dokazali i Souid i sur. ⁵⁸ u svom istraživanju, gdje udio najzastupljenije klorogenske kiseline u 80% etanolnom ekstraktu iznosio 7,25 mg/g. Osim njezinih derivata cCGA (1,17 mg/g) i nCGA (2,03 mg/g), u većim količinama identificirane su *trans*-ferulinska kiselina (1,41 mg/g), te *p*-kumarinska kiselina (1,02 mg/g). U skladu sa spomenutim istraživanjima Piatti i sur. ⁶⁰ su također dokazali da je u 70% etanolnom ekstraktu motra najzastupljenija klorogenska kiselina (5,99-15,82 mg/g) i njeni derivati cCGA i nCGA.

3.2. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida

Rezultati određivanja koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktima motra izraženih u mg rutina po litri ekstrakta prikazani su na slici 21.



*mg RE/L – miligrami ekvivalenta rutina po 1 L ekstrakta

Slika 21. Usporedni prikaz rezultata određivanja udjela ukupnih flavonoida u ekstraktima motra

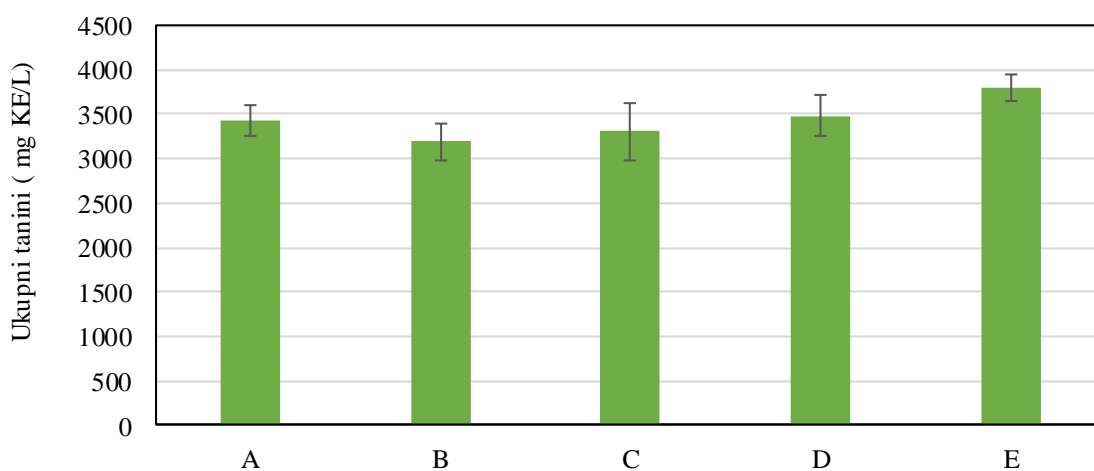
Iz rezultata je vidljivo da se koncentracije ukupnih flavonoida u 25%-tnom alkoholnom ekstraktu, B, neznatno razlikuju od 75%-tnom alkoholnom ekstraktu, D. Vodeni uzorak ekstrakta A pokazuje blago niži sadržaj ukupnih flavonoida. Najveća koncentracija se nalazi u 50%-tnom alkoholnom ekstraktu C i iznosi 318,48 mg RE/g, što je približno dva puta viša koncentracija u odnosu na 96%-tni alkoholni ekstrakt E, koji ima najnižu koncentraciju ukupnih flavonoida. U istraživanju Houte i sur.²⁵ su utvrdili da metanolni ekstrakti listova motra sadrže 3,93 mg CE/g, dok je studija Kadoglidou i sur.²⁷ kod 18 grčkih genotipova motra izvijestila da se sadržaj ukupnih flavonoida u metanol/voda (70:30, v/v) ekstraktima kreće 2,25-15,08 mg CE/g. Najveći udio ukupnih flavonoida ekstrahiran je u hidroetanolnom ekstraktu u istraživanju Souidi i sur.⁵⁸ u iznosu od 25,6 mg CE/g.

Veršić Bratinčević i sur.⁵⁹ dokazali su da je rutin (0,32 mg/g) najzastupljeniji flavonoid motra, dok su Souid i sur.⁵⁸ dokazali da je uz rutin (1,75 mg/g) najzastupljeniji cirsiliol (1,31 mg/g) u 80% etanolnom ekstraktu motra. Osim spomenuta dva flavonoida Souid i

sur. ⁵⁸ su potvrdili visoke koncentracije hiperozida (1,12 mg/g) i kempferola (0,72 mg/g). Visok udio rutina (1,60-4,33 mg/g) te kempferol-3-O-ramnozida (0,07-0,33 mg/g), potvrđuju i Piatti i sur. ⁶⁰ u analiziranom 70% etanolnom ekstraktu motra.

3.3. Rezultati određivanja ukupnih tanina

Na slici 22. prikazani su rezultati određivanja ukupnih tanina vanilin metodom iskazanih u mg ekvivalenta katehina po litri ekstrakta.



*mg KE/L – miligrami ekvivalenta katehina po 1 L ekstrakta

Slika 22. Usporedni prikaz rezultata određivanja udjela ukupnih tanina u ekstraktima motra

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da sadržaj ukupnih tanina raste s povećanjem udjela etanola u ekstraktima, no svih pet ekstrakcijskih otapala pokazuju slične koncentracije izolirane skupine spojeva. Naime, ekstrakti A, C i D sadrže gotovo jednaku masenu koncentraciju tanina ekstrahiranog iz motra koja se kretala između 31,93 i 34,33 mg KE/g. Blagi porast sadržaja ukupnih tanina vidljiv je u ekstraktu E (38,09 mg KE/g), dok se u ekstraktu B (31,93 mg KE/g) bilježi niža koncentracija.

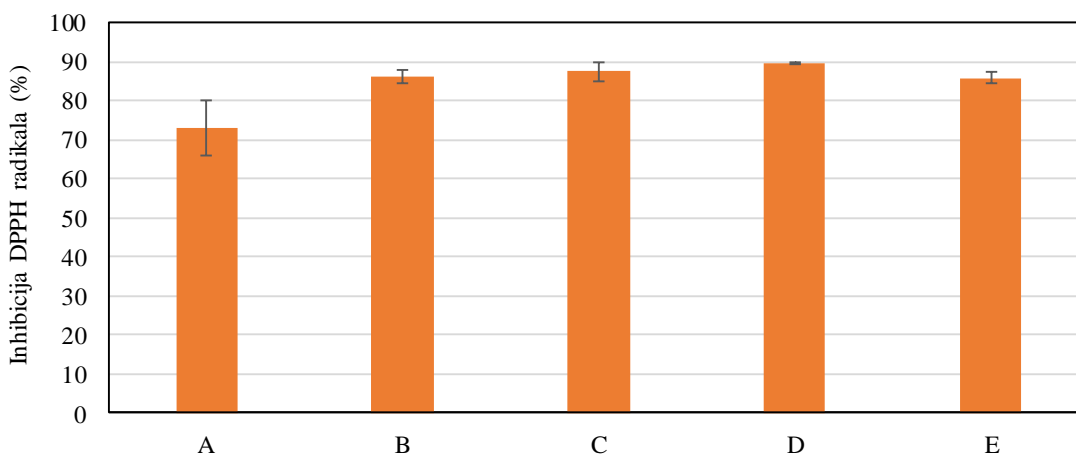
Visoku koncentraciju ukupnih tanina vodenog i etanolnih ekstrakata motra dokazali su Veršić Bratinčević i sur. ⁵⁹, gdje su vodeni i 100% etanolni ekstrakti dali najveći prinos

ukupnih tanina. Suprotno visokom sadržaju ukupnih tanina vodenog ekstrakta motra, rezultati istraživanja Mimice ²¹ pokazuju odsutnost tanina u vodenim ekstraktima motra.

3.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

3.4.1. DPPH metoda

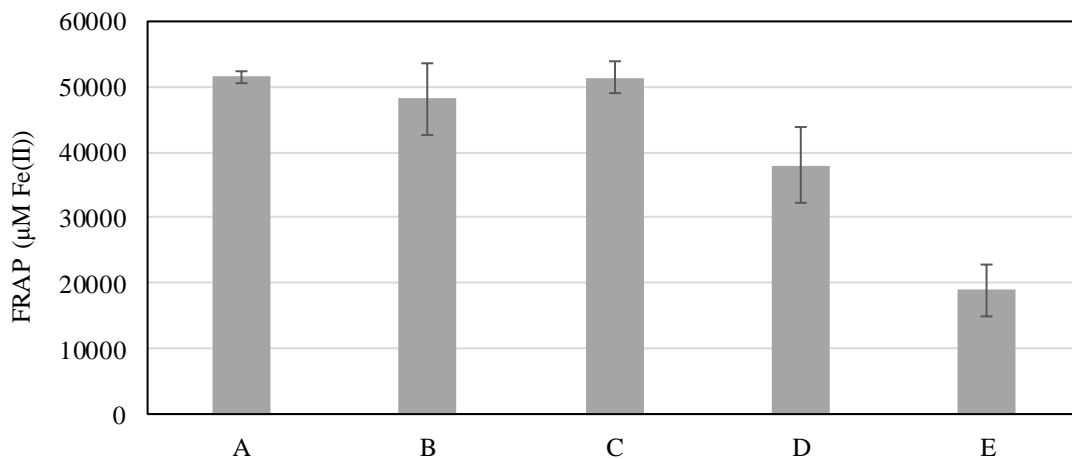
Konačni rezultati antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka određeni metodom DPPH prikazani su na slici 23. Iz rezultata je vidljivo da svi ekstrakti imaju visok postotak inhibicije DPPH radikala. Ekstrakt D pokazuje najveći postotak inhibicije DPPH radikala u iznosu od 90%, dok najniži postotak pokazuje vodeni ekstrakt A. Iako ima najslabiju antioksidacijsku aktivnost, ekstrakt A i dalje pokazuje dobar oksidacijski kapacitet. Uzorci B, C i E imaju jednaku antioksidacijsku aktivnost, s postotkom inhibicije DPPH radikala od 87%. U istraživanju Generalić Mekinić i sur. ¹⁷ 80% vodeni etanolni ekstrakt motra pokazao je 50,1% inhibicije DPPH radikala, dok je drugo istraživanje Generalić Mekinić i sur. ¹⁹ pokazalo da je isto otapalo iz listova motra postiglo 61,8% inhibicije DPPH radikala što je opet niže od aktivnosti ekstrakta motra ispitanih u ovom radu. Istraživanje Guerreiro Pereria i sur. ⁶¹ pokazalo je da vodeni ekstrakti listova motra rezultiraju s 86,5% inhibicije DPPH radikala.



Slika 23. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata motra određeni korištenjem DPPH metodom

3.4.2. FRAP metoda

Rezultati FRAP metode izraženi kao μM ekvivalenata Fe(II) prikazani su na slici 24.

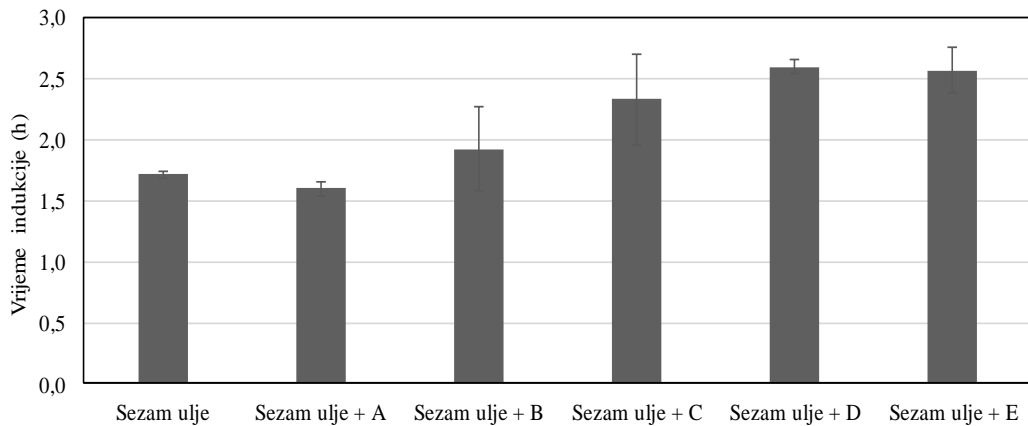


Slika 24. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata motra određenih korištenjem FRAP metode

Na temelju rezultata prikazanih na slici 25, može se primijetiti da ekstrakti A ($51\,493\ \mu\text{M Fe(II)}$) i C ($51\,409\ \mu\text{M Fe(II)}$) pokazuju najvišu antioksidacijsku aktivnost, dok se ekstrakt B ističe s nešto nižom FRAP vrijednošću. Uočeno je da kod ekstrakcije uz pomoć otapala 75% i 96% etanola porast postotka alkohola dovodi do smanjenje antioksidacijska aktivnost ekstrakata. Ovo je vidljivo kod uzorka D i E, koji pokazuju najniže FRAP vrijednosti, redom u iznosu od $38\,050\ \mu\text{M Fe(II)}$ te $18\,888\ \mu\text{M Fe(II)}$. Čisti etanolni ekstrakt motra pokazao je sličnu FRAP vrijednost kao i 80% vodeni etanolni ekstrakt listova motra iz istraživanja Generalić Mekinić i sur.¹⁹. S druge strane u radu Mimice²¹ vodeni ekstrakti motra su pokazali niže FRAP vrijednosti, čak 3 puta niže od vodenog ekstrakta korištenog u ovom radu.

3.4.3. Rancimat metoda

Na slici 25. prikazani su rezultati utjecaja ekstrakata motra na vrijeme indukcije, točnije na produljenje/skraćenje oksidacijske stabilnosti sezamovog ulja, izraženog u satima.



Slika 25. Rezultati određivanja inhibicijske sposobnosti ekstrakata motra na oksidaciju sezamovog ulja

U tablici 6. prikazani su rezultati utjecaja vodenog i alkoholnih ekstrakata motra na oksidacijski indeks stabilnosti (OSI) sezamovog ulja.

Tablica 6. Utjecaj ekstrakata motra na oksidacijski indeks stabilnosti sezamovog ulja

Uzorak	OSI
Ulje sezama	1
Ulje sezama + A	0,93
Ulje sezama + B	1,12
Ulje sezama + C	1,36
Ulje sezama + D	1,51
Ulje sezama + E	1,50

Kao slijepa proba korišteno je sezamovo ulje koje ima induksijsko vrijeme 1,72 h. Iz rezultata je vidljivo, da je kao ekstrakcijsko otapalo za izolaciju spojeva iz motra koji pozitivno utječu produljenje oksidacijske stabilnosti ulja pogodniji etanol od vode. Proporcionalno s povećavanjem postotka alkohola u ekstraktima motra produljuje se i vrijeme indukcije, odnosno vrijeme oksidacijske stabilnosti sezamovog ulja. Najdulje induksijsko vrijeme postignuto je dodatkom ekstrakta D, i ono iznosi 2,6 h. Potom slijedi ekstrakt E (2,57 h) sa vrlo sličnim vremenom produljenja oksidacijske stabilnosti ulja. Od alkoholnih ekstrakata motra najkraće vrijeme inhibicije ulja postignuto je dodatkom ekstrakta B. Međutim ulje u koje je dodan vodeni ekstrakt biljke, A, ima induksijsko vrijeme 1,6 h što je kraće od vremena indukcije samog ulja, odnosno slijepe probe.

4. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i rasprave provedenog istraživanja može se zaključiti da izbor ekstrakcijskog otapala uvelike utječe na fenolni sastav i antioksidacijska svojstva ekstrakata motra. Najveći sadržaj ukupnih fenola zabilježen je u ekstraktu motra pripremljenom korištenjem 50% etanola, dok je najniži sadržaj dobiven u ekstraktu pripremljenom korištenjem čistog etanola. Sadržaj flavonoida prati trend rasta, točnije pada sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima, dok sadržaj ukupnih tanina pokazuje suprotne vrijednosti, te je najveći udio ukupnih tanina zabilježen kod čistog etanolnog ekstrakta, a najniži u 25%-tnom etanolnom ekstraktu. Ispitivanja antioksidacijske aktivnosti pokazuju velik antioksidacijski potencijal kod svih ekstrakata motra. Rezultati dobiveni ispitivanjem DPPH i Rancimat metodom pokazuju rast antioksidacijske aktivnosti s porastom udjela etanola u ekstraktima, dok rezultati određeni metodom redukcije željeza pokazuju najveću antioksidacijsku sposobnost u vodenom ekstraktu. Zahvaljujući iznimnom kemijskom sastavu i biološkim svojstvima, motar sve više privlači pažnju prehrambenih i farmaceutskih industrija te dobiva na važnosti, čemu u prilogu idu i rezultati ovog istraživanja.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

CGA	klorogenska kiselina
cCGA	kriptoklorogenska kiselina
nCGA	neoklorogenska kiselina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	antioksidativna moć redukcije željeza
GC-MS	plinska kromatografija - spektrometrija masa
HPLC-DAD-MS	visoko djelotvorna tekućinska kromatografija-detektor s nizom dioda- spektrometrija masa
LDL	lipoprotein niske gustoće
TBARS	test reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline
TPTZ	2,4,6- tripiridil-s-triazin
UAE	ultrazvučna ekstrakcija otapalom
UV-VIS	spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području

6. LITERATURA

1. *J. Aronson, J. Blondel*, Biology and wildlife of the Mediterranean region. Oxford University Press, New York, 1999, str. 126-127.
2. *T. J. Flowers, T. D. Colmer*, Salinity tolerance in halophytes, *New Phytol.* **179** (2008) 901-1201, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>
3. *K. D. Dubravec, I. Regula*, Fiziologija bilja. Školska knjiga, Zagreb, 1995, str. 221-223.
4. *J. K. Cronk, M. S. Fennessy*, Wetland plants biology and ecology. Lewis Publishers, SAD, 2001, str. 110-113.
5. *T. Nikolić*, Morfologija biljaka, Razvoj, građa i uloga biljnih tkiva, organa i organskih sustava. 1. izdanje, Alfa, Zagreb, 2017, str. 171-172.
6. URL: <https://priodahrvatske.com/2020/12/18/grmolika-caklenjaca-ljubitelj-slane-vode/> (6. 6. 2023.)
7. URL: <https://www.healthbenefitstimes.com/9/uploads/2019/02/Health-benefits-of-Sea-Beet.png> (6. 6. 2023.)
8. URL: <https://www.mauk-gartenwelt.de/Content/files/22007/Halimione-portulacoides-684x500-proportionalexact.webp> (6. 6. 2023.)
9. URL: <https://gohvarblog.com/2016/10/23/guide-to-hvars-wildflowers-in-the-late-summer/inula-crithmoides-golden-samphire/> (6. 6. 2023.)
10. *W. Franke*, Vitamin C in sea fennel (*Crithmum maritimum* L.), an edible wild plant, *Econ. Bot.* **36** (1982) 163-165, doi: <https://doi.org/10.1007/BF02858711>
11. URL: <https://punkufer.dnevnik.hr/clanak/hrana-i-pice/biljka-motar-ili-petrovac--769969.html> (14. 6. 2023.)
12. *J. Rogošić*, Bilinar, Cvjetnjača hrvatske flore s ključem za određivanje bilja. Sv. 1. Sveučilište u Zadru, Zadar, 2011, str. 272.
13. *Lj. Grlić*, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. August Cesarec, Zagreb, 1990. str. 231-232.

14. URL: <https://www.luminescents.net/shop/oils/essential-oils/sea-fennel-essential-oil-crithmum-maritimum/> (6. 6. 2023.)
15. *A. Marchioni-Ortu, E. Bocchieri*, A study of the germination responses of a Sardinian population of sea fennel (*Crithmum maritimum*), *Can. J. Botany.* **62** (2011) 1832-1835, doi: <https://doi.org/10.1139/b84-248>
16. *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>
17. *I. Generalić Mekinić, V. Šimat, I. Ljubenković, F. Burčul, M. Grga, M. Mihajlovski, R. Lončar, V. Katalinić, D. Skroza*, Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L. (*Apiaceae*), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities, *Ind. Crops Prod.* **124** (2018) 947-953, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.080>
18. *J. L. Guil-Guerrero, I. Rodríguez-García*, Lipids classes, fatty acids and carotenes of the leaves of six edible wild plants, *Eur. Food Res. Technol.* **209** (1999) 313-316, doi: <https://doi.org/10.1007/s002170050501>
19. *I. Generalić Mekinić, I. Blažević, I. Mudnić, F. Burčul, M. Grga, D. Skroza, I. Jerčić, I. Ljubenković, M. Boban, M. Miloš, V. Katalinić*, Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): Phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity, *J. Food. Sci. Tech.* **53** (2016) 3104-3112, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2283-z>
20. *V. V. Bianco, M. Renna, P. Santamaria*, Ortaggi liberati- Dieci prodotti straordinari della biodiversità pugliese. Università degli Studi di Bari, Italy, 2018, str.140-152.
21. *N. Mimica*, Utjecaj staništa na kemijski sastav i biološka svojstva motra, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2021)
22. *L. Meot-Duros, C. Magne*, Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves, *Plant Physiol. Biochem.* **47** (2009) 37-41, doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.006>

23. *A. Aleman, D. Marin, D. Taladrid, P. Montero, M. C. Gomez Guillen*, Encapsulation of antioxidant sea fennel (*Crithmum maritimum*) aqueous and ethanolic extracts in freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes, *Food Res. Int.* **119** (2019) 665-674, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.044>
24. *J. M. Alves-Silva, I. Guerra, M. J. Goncalves, C. Cavalerio, M. T. Cruz, A. Figueirinha, L. Salgueiro*, Chemical composition of *Crithmum maritimum* L. essential oil and hydrodistillation residual water by GC-MS and HPLC-DAD-MS/MS, and their biological activities, *Ind. Crop. Prod.* **149** (2020) 112329, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112329>
25. *O. Houta, A. Akrouf, M. Neffati, H. Amri*, Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial potentials of *Crithmum maritimum* cultivated in Tunisia arid zones, *JBAPN* **1** (2011) 138-143, doi: <https://doi.org/10.1080/22311866.2011.10719081>
26. *C. Y. Chen, C. M. Liu, H. C. Yeh, H. M. Wu, W. J. Li, H. T. Li*, Flavonoids of *Crithmum maritimum*, *Chem. Nat. Compd.* **57** (2021) 917-920, doi: <https://doi.org/10.1007/s10600-021-03512-w>
27. *K. Kadoglidou, M. Irakli, A. Boutsika, I. Mellidou, N. Maninis, E. Sarrou, V. Georgiadou, N. Tourvas, N. Krigas, T. Moysiadis, K. Grigoriadou, E. Maloupa, A. Xanthopoulou, I. Ganopoulos*, Metabolomic fingerprinting and molecular characterization of the rock samphire germplasm collection from the balkan botanic garden of Kroussia, Northern Greece, *Plants* **11** (2022) 573, doi: <https://doi.org/10.3390/plants11040573>
28. *T. Kulišić-Bilušić, I. Blažević, B. Dejanović, M. Miloš, G. Pifat*, Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from caper (*Capparis spinosa*) and sea fennel (*Crithmum maritimum*) by different methods, *J. Food Biochem.* **34** (2010) 286-302, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00330.x>
29. *Ž. Maleš, I. Žuntar, B. Nigović, M. Plazibat, V. Bilušić-Vundać*, Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire – *Crithmum maritimum* L., *Acta Pharm.* **53** (2003) 139-144.
30. *M. Musa Özcan, N. Uslu, G. Figueredo, F. Al Juhaimi, K. Ghaffoor, E. E. Babiker, O. N. Alsawmahi, M. Mete Özcan, A. Isam, M. Ahmed*, The effect of fermentation

process on bioactive properties, essential oil composition and phenolic constituents of raw fresh and fermented sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) leaves, *Indian J. Tradit. Know.* **18** (2019) 800-804.

31. *D. Rico, I. Albertos, O. Martinez-Alvarez, M. E. Lopez-Caballero, A. Belen Martin-Diana*, Use of sea fennel as a natural ingredient of edible films for extending the shelf life of fresh fish burgers, *Molecules* **25** (2020) 5260, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25225260>
32. *D. Čović, M. Bojić, M. Medić-Šarić*, Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina, *Farmaceutski glasnik* **65** (2009) 693-704.
33. *I. Ignat, I. Volf, I. V. Popa*, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chem.* **126** (2011) 1821-1835, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
34. *A. Belščak-Cvitanović, H Durgo, A. Huđek, V. Bačun-Družina, D. Komes*, Overview of polyphenols and their properties. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 1. Ed. Woodh. Publ. (2018) 3-34, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
35. URL:https://enrp.org/ViewImage.php?Type=F&aid=540650&id=F1&afn=161_NRP_8_3_233&fn=nrp-8-233-g001_0161NRP (23. 7. 2023.)
36. *A. Khoddami., M. A. Wilkes, T. H. Roberts*, Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules* **18** (2013) 2328-2375, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
37. *S. Kumar, A. K. Pandey*, Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *Sci. World J.* **2013** (2013) 162750, doi: <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
38. *B. Pevalek-Kozlina*, *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb, 2003, str. 566.
39. *J. Viskupičova, M. Ondrejovič, E. Šturdik*, Bioavailability and metabolism of flavonoids, *J. Food Nutr. Res.* **47** (2008) 151-162.
40. *D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. Spencer, M. Tongnolini, G. Borges, A. Crozier*, Dietary (poly)phenolic in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, *Antioxid. Redox Signal.* **14** (2013) 1818-92, doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>

41. *H. Xiuzhen, S. Tao, L. Hongxiang*, Dietary polyphenols and their biological significance, *Int. J. Mol. Sci.* **8** (2007) 950-988, doi: 10.3390/I8090950
42. *L. Bravo*, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56** (1998) 317-333, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
43. *R. Vanholme, B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, W. Boerjan*, Lignin biosynthesis and structure, *Plant. Physiol.* **153** (2010) 895-905, doi: <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
44. *K. Robards, P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover*, Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruit, *Food Chem.* **66** (1999) 401-436, doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00093-X)
45. *H. Drmić, A. Režek Jambrak*, Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2** (2010) 22-33.
46. *S. Alba, E. Joyce, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, T. J. Mason*, Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry, *Ultrason. Sonochem.* **11** (2004) 261-265, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.015>
47. *J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghaffoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar*, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* **117** (2013) 426-436, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
48. *R. E. Ghitescu, I. Volf, C. Carausu, A.M. Bühlmann, I. Andrei Gilca, V. I. Popa*, Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark, *Ultrason. Sonochem.* **22** (2015) 535-541, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.07.013>
49. *F. Bar, M. Knorr, O. Schroder, H. Hopf, T. Garbe, J. Krahl*, Rancimat vs. rapid small scale oxidation test (RSSOT) correlation analysis, based on a comprehensive study of literature, *Fuel* **291** (2021) 120160, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120160>
50. *W. W. Focke, I. van der Westhuizen, X. Oosthuysen*, Biodiesel oxidative stability from Rancimat data, *Thermochim. acta* **633** (2016) 16-121, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2016.03.023>

51. URL: https://www.researchgate.net/figure/Line-diagram-of-Rancimat-apparatus_fig2_323506802 (20. 6. 2023.)
52. *Amerine MA, Ough CS.*, Methods for analysis of musts and wines. John Wiley & Sons, New Yourk, (1980) str. 181-200.
53. *A. Pekal, K. Pyrzyńska*, Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay, *Food Anal. Method.* **7** (2014) 1776-1782, doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
54. *R. Julkunen-Titto*, Phenolic constituents in the leaves of northern willow. Methods for the analysis of certain phenolics, *J. Agric. Food Chem.* **33** (1985) 213-217, doi: <https://doi.org/10.1021/jf00062a013>
55. *S. B. Kedare, R. P. Singh*, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J. Food Sci. Technol.* **48** (2011) 412-422, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
56. *I. F. Benzie, J. J. Strain*, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70-76, doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
57. *K. Rahayu Purnomo Sari, Z. Ikawati, R. Danarti, T. Hertiani*, Micro-titer plate assay for measurement of total phenolic and total flavonoid contents in medicinal plant extracts, *Arab. J. Chem.* **16** (2023) 105003, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105003>
58. *A. Souid, C. M. Della Croce, S. Frassinetti, M. Gabriele, L. Pozzo, M. Ciardi, C. Abdelly, K. Ben Hamed, C. Magné, V. Longo*, 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>
59. *M. Veršić Bratinčević, R. Kovačić, M. Popović, S. Radman, I. Generalić Mekinić*, Comparison of conventional and green extraction techniques for the isolation of phenolic antioxidants from sea fennel, *Processes* **11** (2023) 2172, doi: <https://doi.org/10.3390/pr11072172>
60. *D. Piatti, S. Angeloni, G. Caprioli, F. Maggi, M. Ricciutelli, L. Arnoldi, G. Sagratini*, Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): A promising biosaline crop.

extraction, purification and chemical characterization of polar extracts, Biol. Life Sci. Forum **11** (2022) 61, doi: <https://doi.org/10.3390/IECPS2021-12033>

61. C. Guerreiro Pereira, L. Afonso Barreira, N. da Rosa Neng, J. Nogueira, C. F. Marques, T. F. Santos, J. C. Varela, L. Custódio, Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: In vitro antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L., Food Chem. Toxicol. **107** (2017) 581-589, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.018>