

Kemijski sastav i biološki potencijal lista i cvijeta motra

Prga, Ivana

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:167:795564>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI POTENCIJAL LISTA I CVIJETA
MOTRA

DIPLOMSKI RAD

IVANA PRGA

Matični broj: 60

Split, listopad 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI POTENCIJAL LISTA I CVIJETA
MOTRA

DIPLOMSKI RAD

IVANA PRGA

Matični broj: 60

Split, listopad 2023.

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

**CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF
SEA FENNEL LEAVES AND FLOWERS**

DIPLOMA THESIS

IVANA PRGA

Parent number: 60

Split, October 2023.

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. Danijela Skroza
Komentor: dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI POTENCIJAL LISTA I CVIJETA MOTRA

Ivana Prga, 60

Sažetak: Motar (*Crithmum maritimum* L.) je višegodišnja halofitna biljka koja u Hrvatskoj raste duž cijele Jadranske obale. Biljka je poznata od davnina, te se listovi konzumiraju kao hrana i začim, dok se u narodnoj medicini koristi kao lijek. Zbog brojnih biološki aktivnih tvari zastupljenih u cijeloj biljci provedena su razna istraživanja u svrhu stjecanja novih znanja i boljeg iskorištenja same biljke. Tako je cilj ovog rada bio ispitati kemijski sastav i antioksidacijsku aktivnost motra te usporediti razlike između ekstrakta cvijeta i ekstrakta lista. Uzorci su prikupljeni na tri različite lokacije: otoku Pagu, otoku Korčuli, te u Cavtatu. Biljnim ekstraktima određen je udio ukupnih fenola i flavonoida, dok je koncentracija klorogenske kiseline određena korištenjem visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene su tri metode: određivanje antioksidacijske snage redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP), metoda redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (engl. *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH) i ispitivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako ekstrakti lista i cvijeta motra imaju visok sadržaj ukupnih fenola, flavonoida te klorogenske kiseline. Osim visokog udjela fenolnih komponenta ekstrakti su pokazali i jako dobru antioksidacijsku aktivnost određenu svim metodama. U radu je uočen i utjecaj lokacije branja motra, pa tako uzorci s lokacije Korčula imaju najviši udio fenolnih komponenta i najbolju antioksidacijsku aktivnost, dok su najlošiji rezultati zabilježeni za uzorke s lokacije Pag. Osim toga, ekstrakti cvijeta motra pokazali su bolje rezultate od ekstrakta lista, što ukazuje na izuzetan potencijal ove biljke koji je još uvijek nedovoljno istražen i neiskorišten.

Ključne riječi: motar, kemijski sastav, antioksidacijska aktivnost, klorogenska kiselina, fenolni spojevi

Rad sadrži: 31 stranicu, 19 slika, 2 tablice, 34 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu i ocjenu diplomskog rada:

- | | |
|---|---------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić | predsjednik |
| 2. Dr. sc. Maja Veršić Bratinčević | član/komentor |
| 3. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza | 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. Danijela Skroza – Associate Professor
Co-supervisor: Ph. D. Maja Veršić Bratinčević

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF SEA FENNEL LEAVES AND FLOWERS

Ivana Prga, 60

Abstract: Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is a perennial halophytic plant that grows along the entire Adriatic coast in Croatia. The plant has been known since ancient times and the leaves are consumed as food and spice, while in folk medicine it is used as a medicine. Due to the numerous biologically active substances present throughout the plant, various researches have been carried out in order to gain new knowledge and make better use of the plant itself. The aim of this work was therefore to investigate the chemical composition and antioxidant activity in order to compare the differences between the flower and leaf extracts. Samples were collected from three different locations: on the island of Pag, on the island of Korčula and in Cavtat. The plant extracts were used to determine the content of total phenols and flavonoids, while the concentration of chlorogenic acid was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Three methods are used to determine antioxidant activity: ferric reducing antioxidant power (FRAP), the method of reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC). From the obtained results, it can be concluded that the extracts of sea fennel leaves and flowers have a high content of total phenols, flavonoids and chlorogenic acid. Besides the high content of phenolic components, the extracts also showed very good antioxidant activity, which was determined by all methods. In the study, the influence of the location of harvesting of the sea fennel was also observed, so that the samples from Korčula showed the highest content of phenolic components and the best antioxidant activity, while the samples from Pag showed the lowest results. In addition, the extracts from the flowers of sea fennel showed better results than the leaf extracts, indicating the extraordinary potential of this plant, which has not yet been sufficiently researched and exploited.

Keywords: sea fennel, chemical composition, antioxidant activity, chlorogenic acid, phenolic compounds

Thesis contains: 31 page, 19 figures, 2 tables, 34 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić – Associate Professor chair person
2. Ph. D. Maja Veršić Bratinčević co-supervisor
3. Ph. D. Danijela Skroza – Associate Professor 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 i na Zavodu za primijenjene znanosti Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Skroza i komentorstvom dr. sc. Maje Veršić Bratinčević u razdoblju od veljače 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

Želim se zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Skroza na pruženoj pomoći pri pisanju diplomskog rada, ali reći i jedno posebno hvala na svakom lijepom savjetu, razumijevanju i smijehu tijekom studiranja.

Hvala izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić i dr. sc. Maji Veršić Bratinčević na izdvojenom vremenu i trudu.

Od srca hvala mojim roditeljima i sestrama što su uvijek vjerovali u mene i pružali mi ogromnu podršku, ljubav i strpljenje. Bez vas ovo ne bi bilo moguće!

Hvala mojim prijateljima bez kojih ovo studiranje ne bi bilo ni upola lijepo, sretna sam što sam vas upoznala i što ste postali obitelj.

Na kraju, želim reći hvala dragom Bogu što me stvorio i pružio mi potrebnu snagu i vjeru.

*Jer nije sretan 'ko puno ima
sretan je onaj tko malo treba...*

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- 1) Odrediti udio ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima lišća i cvijeta motra (*Crithmum matitimum* L.) sa tri različite lokacije duž Jadranske obale koristeći UV/Vis spektrofotometriju
- 2) Odrediti koncentraciju klorogenske kiseline i njenih derivata u ekstraktima lišća i cvijeta motra koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti
- 3) Odrediti antioksidacijski potencijal ekstrakta lišća i cvijeta motra korištenjem različitih metoda.

SAŽETAK

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je višegodišnja halofitna biljka koja u Hrvatskoj raste duž cijele Jadranske obale. Biljka je poznata od davnina, te se listovi konzumiraju kao hrana i začim, dok se u narodnoj medicini koristi kao lijek. Zbog brojnih biološki aktivnih tvari zastupljenih u cijeloj biljci provedena su razna istraživanja u svrhu stjecanja novih znanja i boljeg iskorištenja same biljke. Tako je cilj ovog rada bio ispitati kemijski sastav i antioksidacijsku aktivnost motra te usporediti razlike između ekstrakta cvijeta i ekstrakta lista. Uzorci su prikupljeni na tri različite lokacije: otoku Pagu, otoku Korčuli, te u Cavtatu. Biljnim ekstraktima određen je udio ukupnih fenola i flavonoida, dok je koncentracija klorogenske kiseline određena korištenjem visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene su tri metode: određivanje antioksidacijske snage redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP), metoda redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (engl. *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH) i ispitivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako ekstrakti lista i cvijeta motra imaju visok sadržaj ukupnih fenola, flavonoida te klorogenske kiseline. Osim visokog udjela fenolnih komponenta ekstrakti su pokazali i jako dobru antioksidacijsku aktivnost određenu svim metodama. U radu je uočen i utjecaj lokacije branja motra, pa tako uzorci s lokacije Korčula imaju najviši udio fenolnih komponenta i najbolju antioksidacijsku aktivnost, dok su najlošiji rezultati zabilježeni za uzorke s lokacije Pag. Osim toga, ekstrakti cvijeta motra pokazali su bolje rezultate od ekstrakta lista, što ukazuje na izuzetan potencijal ove biljke koji je još uvijek nedovoljno istražen i neiskorišten.

Ključne riječi: motar, kemijski sastav, antioksidacijska aktivnost, klorogenska kiselina, fenolni spojevi

ABSTRACT

Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) is a perennial halophytic plant that grows along the entire Adriatic coast in Croatia. The plant has been known since ancient times and the leaves are consumed as food and spice, while in folk medicine it is used as a medicine. Due to the numerous biologically active substances present throughout the plant, various researches have been carried out in order to gain new knowledge and make better use of the plant itself. The aim of this work was therefore to investigate the chemical composition and antioxidant activity in order to compare the differences between the flower and leaf extracts. Samples were collected from three different locations: on the island of Pag, on the island of Korčula and in Cavtat. The plant extracts were used to determine the content of total phenols and flavonoids, while the concentration of chlorogenic acid was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Three methods are used to determine antioxidant activity: ferric reducing antioxidant power (FRAP), the method of reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC). From the obtained results, it can be concluded that the extracts of sea fennel leaves and flowers have a high content of total phenols, flavonoids and chlorogenic acid. Besides the high content of phenolic components, the extracts also showed very good antioxidant activity, which was determined by all methods. In the study, the influence of the location of harvesting of the sea fennel was also observed, so that the samples from Korčula showed the highest content of phenolic components and the best antioxidant activity, while the samples from Pag showed the lowest results. In addition, the extracts from the flowers of sea fennel showed better results than the leaf extracts, indicating the extraordinary potential of this plant, which has not yet been sufficiently researched and exploited.

Keywords: sea fennel, chemical composition, antioxidant activity, chlorogenic acid, phenolic compounds

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. Motar.....	2
1.2. Kemijski sastav motra.....	4
1.3. Određivanje fenolnog sastava.....	6
1.3.1. Spektrofotometrijske (UV/Vis) metode.....	6
1.4. Biološki potencijal.....	9
1.4.1. Testovi antioksidacijske aktivnosti.....	11
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
2.1. Priprema ekstrakata.....	12
2.2. Određivanje fenolnog sastava spektrofotometrijskim (UV/Vis) metodama....	13
2.2.1. Određivanje udjela ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	13
2.2.3. Određivanje klorogenske kiseline i njenih derivata HPLC metodom.....	15
2.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	17
2.3.1. FRAP metoda.....	17
2.3.2. DPPH metoda.....	17
2.3.3. ORAC metoda.....	18
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola.....	20
3.2. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida.....	21
3.3. Rezultati HPLC metode.....	23
3.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	24
3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	26
3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom.....	27
4. ZAKLJUČAK.....	28
5. LITERATURA.....	29

UVOD

Motar je jestiva samonikla halofitna biljka prilagođena slanim staništima poput obala mora, morskih stijena i pješčanih plaža. Ova polugrmovita biljka iz porodice štitarki široko je rasprostranjena po cijelom obalnom području Europe. Poznata je upotreba motra u narodnoj medicini, kulinarstvu, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Posljednjih godina povećava se interes za iskorištavanjem motra, obzirom da brojna istraživanja ukazuju na njegovu važnu gospodarsku ulogu smatrajući ga perspektivnom biljkom za poljoprivredu na slanim staništima. Cvijet kao i list ima velik potencijal za dobivanje esencijalnih i eteričnih ulja važnih za farmaceutsku i kozmetičku industriju, dok se ekstrakti ove biljke smatraju značajni za prehrambenu industriju.

Navedenim pozitivnim svojstvima ovog halofita doprinosi njegov bogat i raznolik kemijski sastav, kao i velik biološki potencijal. Unatoč navedenim prednostima, još uvijek je nedovoljno istražen obzirom da svojstva i sastav motra ovise o staništu, vegetacijskom razdoblju, okolišnim faktorima, metodama ekstrakcije i brojnim drugim čimbenicima.

Iako se u kulinarstvu i brojnim znanstvenim studijama uglavnom spominje samo list, ne treba zanemariti i cvijet koji je također bogat izvor bioaktivnih spojeva. Upravo iz tog razloga cilj ovog rada je bio ispitati potencijal cijele biljke u svrhu dobivanja novih saznanja o prednostima ove biljke i mogućnosti njenog iskorištenja u prehrambenoj ili nekoj drugoj industriji.

1. OPĆI DIO

1.1. Motar

Halofiti su biljke koje prirodno rastu na slanim staništima poput obalnih močvara, obalnih dina, zemlje uništene lošom poljoprivrednom praksom te plaža. Obzirom da na njihov rast najveći utjecaj ima salinitet, halofiti razvijaju posebne strategije za preživljavanje u uvjetima visoke slanosti. Premda pojedini halofiti čak rastu bolje u prisutnosti soli, potrebno je znati kako tolerancija halofita na sol ovisi i o stadiju rasta same biljke te se smatra kako je zrela biljka manje osjetljiva na sol. Dodatna prednost je mogućnost njihovog uzgoja na područjima s ograničenom dostupnosti slatke vode.¹

U posljednje vrijeme javlja se sve veći interes za halofitnom vrstom *Crithmum maritimum* L., poznatom kao motar, obalni petrovac ili morski komorač.



Slika 1. Motar u prirodnom okruženju²

Motar je višegodišnja biljka, jedina vrsta roda *Crithmum* iz porodice *Apiaceae* (slika 1). Ime *Crithmum* dolazi od grčke riječi „*krithe*“ što u prijevodu znači ječam, zbog sličnosti između ploda ove biljke i zrna ječma, dok *maritimum* potječe od *maritime* što se povezuje s staništem ove biljke u blizini mora.³

Rasprostranjen je diljem obale, te raste na morskim stijinama, molovima i pješčanim plažama, a posebno je zastupljen na obalama mediteranskih zemalja, pa tako u Hrvatskoj raste duž cijele jadranske obale.⁴

Motar je zeljasta biljka visine 30-60 cm. Ima snažan, debeo korijen koji se može raširiti i do 5 m, te razgranatu stabljiku koja je pri dnu uglavnom drvenasta. Perasto oblikovani i mesnati listovi dugi su 2-5 cm, a široki 0,6 cm. Počinju s kratkom peteljkom, podijeljeni su na 2 ili 3 listića te imaju šiljast vrh. Šire se radijalno od podanka tvoreći rozetu. Cvjetovi su žućkasto-bijele ili zelenkasto-bijele boje. Cvjetanje traje od srpnja do rujna, a daje jajolike duguljaste plodove koji počinju sazrijevati u studenom i prosincu.^{5,6}

Upotreba motra je raznolika pa se primjenjuje u kulinarstvu, narodnoj medicini i kozmetici. Iako se mogu koristiti svi biljni organi, ipak se najčešće koriste listovi motra. U mediteranskoj kuhinji često se koristi u salatama, kiselim krastavcima te kao začim raznim jelima. Ima jedinstven i pomalo slan okus, što ga čini popularnim dodatkom jelima od morskih plodova. Budući da je iznimno aromatičan može se koristiti i kao sušena biljka, te se u kulinarstvu ističe njegova upotreba kao začina i bojila. Primjerice, u zelenoj tjestenini (*tagliatelle*) može se koristiti kao glavni sastojak kod bojanja. Zbog svojih bioaktivnih spojeva u narodnoj medicini se upotrebljava u razne svrhe. Primjerice, u Španjolskoj se ukiseljeno lišće jede kao digestiv zbog antiskorbutskih i diuretičkih svojstava. U južnoj Italiji koristi se kao lijek protiv kašlja i prehlade, dok je u središnjoj Italiji poznat u liječenju karminativnih, stomačnih i probavnih problema.^{3,7} Cvjetni vrhovi i stabljika mogu se koristiti za pripremu biljnih čajeva.⁸ Primjenu u kozmetici motar je pronašao zahvaljujući eteričnim uljima koja sadrže velik broj hlapljivih spojeva. Udio u plodovima iznosi oko 0,8%, dok se u listovima kreće 0,13-0,3%. Uz to sve, često se koristi i kao ukrasna biljka u kamenjarima uz more.⁴

Motar je fakultativni halofit, što znači da pokazuje fleksibilnost za rast na slanim i slatkovodnim staništima. Za optimalni rast preferira i pogodnije mu je područje bez soli ili s niskom koncentracijom soli, iako pokazuje određeni stupanj tolerancije na sol kada je izložen stresu od soli. Utvrđeno je da salinitet veći od 50 mM NaCl inhibira njegovo klijanje.

Uslijed klimatskih promjena uzgoj povrća, ali i drugih kultura postaje sve teži. Javlja se problemi poput povišenja temperature, slabe dostupnosti visokokvalitetne vode, ali i zaslanjivanja tla. Upravo zbog toga jako je važno imati mogućnost alternativnih usjeva kao što su halofitne vrste. Osim što se bolje prilagođavaju raznim klimatskim uvjetima poznato je da mogu rasti na slanom tlu ili ih se može zalijevati slanom vodom. Unatoč svemu navedenom, motar se još uvijek nedovoljno koristi, ali se smatra vrlo perspektivnom biljnom vrstom za uzgoj.⁴

1.2. Kemijski sastav motra

Motar sadrži makro- i mikronutrijente koji imaju brojne zdravstvene učinke i pomažu u prevenciji bolesti. Od makronutrijenata najzastupljeniji su ugljikohidrati, zatim bjelančevine i lipidi. Ne smiju se zanemariti ni mikronutrijenti odnosno vitamini i minerali. Primjerice, vitamin C je zaslužan za prevenciju obolijevanja od skorbuta zbog čega je motar konzumiran od strane mornara kada su bili na dugim putovanjima. U tablici 1. prikazana je energetska i nutritivna vrijednost motra.

Tablica 1. Energetska (kcal/100 g svježeg proizvoda) i nutritivna vrijednost (g/100 g svježeg proizvoda) motra⁹

Energija	27,2
Voda	87,6
Lipidi	0,73
Bjelančevine	1,57
Ukupni ugljikohidrati	7,33
- od čega vlakna	3,74
- od čega šećeri	0,65
Pepeo	2,78

1.2.1. Fenolni spojevi u motru

Dostupna literatura i provedena istraživanja o kemijskom sastavu motra ističu njegova ljekovita svojstva i hranjivu vrijednost. Smatra se vrijednim izvorom bioaktivnih spojeva, među kojima se osobito ističu fenoli poput flavonoida i klorogenske kiseline. Istraživanja također navode važnost korištenog dijela biljke prilikom ispitivanja, kao i vrijeme uzorkovanja, klimatske uvjete u kojima je biljka rasla, metode ekstrakcije te korištena otapala pri pripremi ekstrakata.

Prema rezultatima predstavljenim u istraživanju Souid i sur. (2021) listovi motra sadržavaju visok udio polifenola (31,7 mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po g suhe tvari), odnosno flavonoida (25,6 mg katehin ekvivalenata (CE) po g suhe tvari) i flavonola (17,3 mg ekvivalenata kvercetina (QE) po g suhe tvari), dok je kondenziranih tanina bilo najmanje (0,97 mg CE/g suhe tvari). Bitno je naglasiti kako je ekstrakcija provedena korištenjem više različitih otapala (etanol, acetonom, metanolom), a najbolje rezultate pokazali su etanolni ekstrakti (80%-tni etanol). Najzastupljeniji spojevi iz skupine flavonoida, odnosno flavonola, su bili rutin i cirsiliol, odnosno kvercetin i hiperozid. U ekstraktima su također potvrđene velike količine fenolnih kiselina, a najzastupljenije su bile klorogenska (7,25 mg/g suhe tvari), neoklorogenska (2,03 mg/g suhe tvari), *trans*-ferulinska (1,41 mg/g suhe tvari) i kriptoklorogenska kiselina (1,17 mg/g suhe tvari).¹⁰

Generalić Mekinić i sur. (2018) proveli su istraživanje na motru uzorkovanom kroz različita vegetacijska razdoblja i uzorci su pripremljeni korištenjem 80%-tnog etanola. Rezultati ukazuju na najviši udio fenola u ekstraktima lista motra koji je uzorkovan u travnju, odnosno prije cvatnje. Tako je u travnju vrijednost neflavonoida iznosila 20,92 mg GAE/g te flavonoida 1,23 mg GAE/g. Koncentracija klorogenske kiseline je također bila najviša u travnju (16,28 mg/g). Najlošiji rezultati za ukupne fenole, neflavonoide i klorogensku kiselinu bili su određeni za mjesec kolovoz. Usporedbom s drugim istraživanjima ovi autori navode veći sadržaj ukupnih polifenola i tanina u uzorcima prije i na početku cvjetanja u odnosu na druge periode vegetacije.¹¹

Houta i sur. (2011) su kvantitativno odredili kemijski sastav različitih dijelova motra. Ekstrakti svih organa biljke, stabljike, listova, cvjetova i sjemenki pripremljeni su

korištenjem čistog metanola. Objavljeni rezultati pokazuju visok udio ukupnih polifenola (13-17 mg GAE/g), flavonoida (4-7 mg CE/g) i tanina (1-5 mg CE/g) u sjemenkama i stabljici u odnosu na druge dijelove biljke. Relativno slične vrijednosti fenolnih spojeva sadržavali su listovi i cvjetovi, no ipak cvjetovi su bili slabiji u odnosu na list i druge dijelove biljke. Udio ukupnih polifenola u listu iznosio je 11,52 mg GAE/g, flavonoida 3,93 mg CE/g i tanina 1,38 mg CE/g. Udio ukupnih polifenola u cvijetu iznosio je 9,43 mg GAE/g, flavonoida 3,71 mg CE/g i tanina 0,43 mg CE/g. Usporedbom s prethodno spomenutim istraživanjima autori također zaključuju kako svi dijelovi motra predstavljaju značajan izvor fenolnih spojeva, pri čemu se posebno ističu listovi.¹³

Kao što je na početku ovog poglavlja istaknuto, kod određivanja kemijskog sastava ekstrakata jako važnu ulogu imaju tehnike i uvjeti ekstrakcije. Costa i sur. (2018) uspoređivali su ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (engl. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE) i ekstrakciju superkričnom tekućinom (engl. *Supercritical fluid extraction*, SFE). Uvjeti pod kojima se obavljala UAE bili su: temperatura 50 °C, vrijeme ekstrakcije 20 minuta, omjer čvrste tvari i otapala 1:30 te koncentracija etanola 40% (v/v), dok su uvjeti za SFE bili temperatura od 50 °C, tlak od 300 bara i koncentracija etanola 40% (v/v).¹⁴ Kao zaključak, izdvojila se metoda UAE koja je rezultirala oko 10 puta višom vrijednosti ekstrahiranih antioksidansa u usporedbi s SFE.

1.3. Određivanje fenolnog sastava

1.3.1. Spektrofotometrijske (UV/Vis) metode

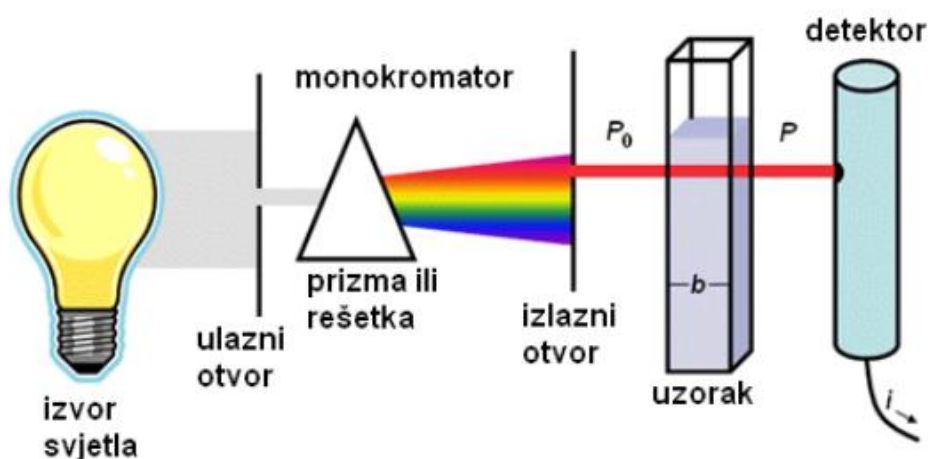
Ultraljubičasta-vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija je česta tehnika koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu zbog svoje jednostavnosti, brzine i točnosti. Uređaj za mjerenje naziva se spektrofotometar, a osnovni dijelovi samog uređaja su izvor svjetlosti, monokromator (rasipa zračenje) i detektor (mjeri intenzitet propuštene svjetlosti). Princip rada zasniva se na prolasku zrake svjetlosti kroz uzorak gdje jedan dio zraka apsorbiraju molekule u uzorku, a ostatak prolazi. Monokromator propušta svjetlost jedne valne duljine, a optička rešetka ili optička prizma razdvajaju tu svjetlost na vrpce. Raspon valnih duljina je većinom 190-1100 nm. Detektor kvantificira

propuštenu svjetlost stvarajući električni signal koji se pretvara u apsorbanciju. Kod ove metode uzorak je smješten između monokromatora i detektora u kivetu.¹⁵

Spektrofotometri se najčešće dijele na jednozračne i dvozračne. Dvozračni se preferira zbog mogućnosti mjerenja apsorbancije i referentnog i ispitivanog uzorka u isto vrijeme, što nije moguće kod jednozračnog gdje se može mjeriti apsorbancija samo jednog uzorka. To ujedno znači da se kod dvozračnog spektrofotometra apsorbancije automatski oduzimaju jedna od druge tako da nije potrebna naknadna obrada podataka. U ovom istraživanju dvozračni spektrofotometar je korišten za određivanje ukupnih fenola i za određivanje ukupnih flavonoida.¹⁵ Shematski prikaz elemenata spektrofotometra prikazan je na slici 2.

Za određivanje ukupnih fenola korištena je Folin-Ciocalteu metoda, koja se češće koristi od drugih metoda jer ne zahtijeva puno sredstava ni opreme pa je zbog toga jednostavna i jeftina. Zasniva se na reakciji fenolnih spojeva iz uzorka u lužnatom mediju i Folin-Ciocalteu reagensa pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks čiji intenzitet ovisi o količini fenolnih spojeva. Apsorbancija dobivene otopine mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm.¹⁶

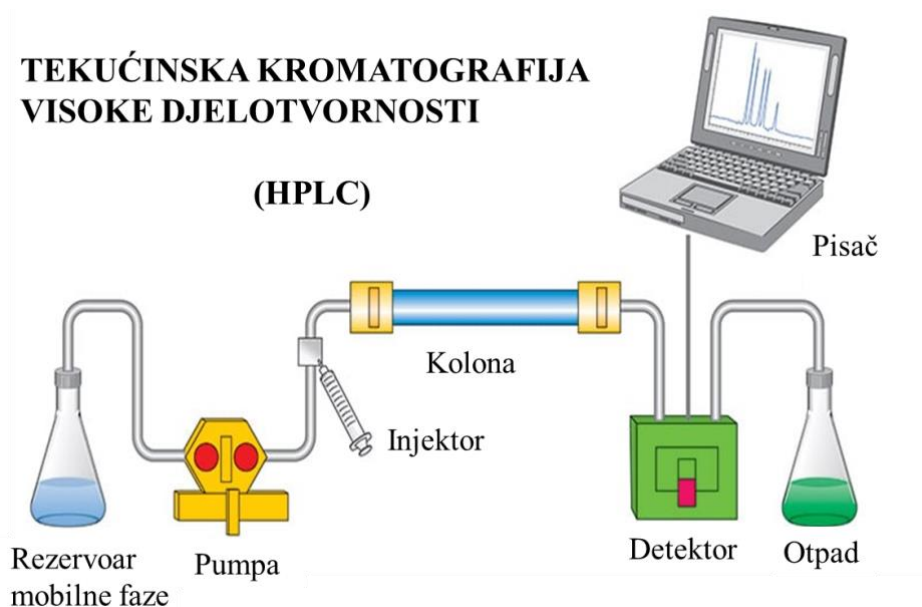
Sadržaj ukupnih flavonoida uglavnom se određuje kolorimetrijskom analizom aluminijskoga klorida sa ili bez natrijskoga nitrita. Kada se koristi i natrijev nitrit nastaje žuto obojenje čija se apsorbancija mjeri pri 510 nm.¹⁷



Slika 2. Shematski prikaz elemenata spektrometra¹⁸

1.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) oblik je kolonske kromatografije, koja se često koristi u analitičkoj kemiji. Princip rada podrazumijeva razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih i fizičkih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Koristi se za njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. Vrijeme eluiranja tvari iz uzorka ovisi o prirodi same tvari, sastavu mobilne faze i stacionarnoj fazi, a naziva se retencijsko vrijeme i ono je karakteristično za određenu tvar. Vrste tekućinske kromatografije su kromatografija na normalnim i obrnutim fazama, a komponente samog uređaja su rezervoar mobilne faze, pumpa, injektor, kolona, detektor i pisar. Injektorom se uzorak u malom volumenu uvodi u instrument (0,1-100 μL), te nošen mobilnom fazom uz pomoć pumpi prolazi kroz kolonu, koje predstavljaju stacionarnu fazu, do detektora. Osjetljivost detektora predstavlja odnos visine odziva i visine bazne linije, a odabir ovisi o njegovoj osjetljivosti i selektivnosti, linearnom radnom području i slično. Vrste detektora u tekućinskoj kromatografiji su UV/Vis, fluorescentni (FI), elektrokemijski (EC), detektor refrakcijskog indeksa (RI), te maseni spektrometar (MS).¹⁹



Slika 3. Shematski prikaz visoko djelotvorne tekućinske kromatografije²⁰

1.4. Biološki potencijal

Biljni izvori hrane su jako važni te je njihov funkcionalni potencijal dosta istražen. Hrana biljnog podrijetla koja je obogaćena esencijalnim i bioaktivnim spojevima s protuupalnim, antioksidacijskim, antibakterijskim, antivirusnim i drugim svojstvima može se koristiti za brojne zdravstvene dobiti. Sve ovo predstavlja biološki potencijal biljke te je sve češće predmet istraživanja prehrambene industrije.

Motar zbog sadržaja raznih bioaktivnih spojeva ima dokazan cijeli niz pozitivnih bioloških aktivnosti. Kao posljedica toga nije iznenađujuće da je prepoznat kao potencijalno funkcionalna hrana koja nudi brojne zdravstvene dobiti. U cilju promicanja zdravlja i smanjenja rizika od nastanka bolesti rađena su brojna istraživanja u kojima su dokazana antioksidacijska, antimikrobna, antifungalna, protuupalna, antikancerogena i druga svojstva motra.

Houta i sur. (2011) u svom su istraživanju određivali antioksidacijsku aktivnost različitih dijelova motra, te su dokazali da najveću sposobnost hvatanja radikala DPPH ima metanolni ekstrakt sjemenki s vrijednosti IC₅₀ od 406 µg/mL, zatim listovi (IC₅₀ od 500 µg/mL), cvjetovi (IC₅₀ od 706 µg/mL), dok je najslabiju aktivnost pokazala je stabljika (IC₅₀ od 726 µg/mL). Kako je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i tanina bio najviši upravo u sjemenkama, može se pretpostaviti da je antioksidacijsko djelovanje barem djelomično povezano sa sadržajem fenolnih spojeva.¹³

I drugi autori su došli do sličnih zaključaka, uspoređujući motar s različitim staništa, odnosno motar ubran na liticama i motar s pješčanih brda. Tijekom ljeta, motar s obje lokacije je imao izrazito niske vrijednosti IC₅₀ od 0,25 mg/mL. Osim ljeti, jaku antiradikalnu aktivnost imao je i motar s pješčanih brda za vrijeme jeseni s vrijednosti IC₅₀ od 0,146 mg/mL. Uzorci s obje lokacije su imali najjače antiradikalno djelovanje ljeti kada je koncentracija fenolnih spojeva u biljci bila najviša.²¹

Meot-Duros i sur. (2008) dokazali su dobra antimikrobna svojstva motra, osobito u apolarnoj frakciji. Ekstrakti su većinom imali minimalnu inhibicijsku koncentraciju (MIC) od 100 mg/mL, ali su zabilježeni i podaci s aktivnošću od 1 µg/mL. Upravo s tom vrijednosti, od 1 µg/mL, obje frakcije motra djelovale su protiv

Salmonella arizonae. Također su potvrdili inhibiciju rasta i drugih bakterija poput *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* i drugih.²²

Antimikrobnu aktivnost testirali su Houta i sur. (2011) metodom disk difuzije i promjeri zone inhibicije su iznosili za cvjetove 10-11 mm, za stabljiku 10-13 mm, za listove 9-12 mm te za sjemenke 6-12 mm. Najznačajnija aktivnost zabilježena je prema Gram negativnoj bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, gdje je ekstrakt stabljike pokazao promjer zone inhibicije od $13\pm 0,1$ mm. Nasuprot tome, ekstrakt sjemenki je imao najmanji zabilježen promjer zone inhibicije od $6\pm 0,1$ mm prema *Staphylococcus epidermidis*. Osim bakterija, ekstrakti motra su pokazali aktivnost i prema kvascu *Candida albicans* (10 mm). Kao zaključak autori navode dobra antibakterijska i antifungalna djelovanja motra, uz napomenu da ono također ovisi o dijelu same biljke kao i o mikroorganizmu prema kojem se testira.¹³

Generalić Mekinić i sur. (2016) u svom su istraživanju dokazali da motar posjeduje inhibicijsku aktivnost kolinesteraze i vazodilacijsku aktivnost. Liječenje Alzheimerove bolesti temelji se na inhibiciji enzima acetilkolinesteraze (AChE) koji je detektiran u esencijalnom ulju motra i njegovim ekstraktima. Esencijalno ulje stabljike ima inhibicijsku aktivnost AChE od čak 65,2%, dok za ekstrakte najjaču aktivnost ima ekstrakt lista (27,2%). Vazodilacijsko djelovanje ispitivano je na krvnim žilama štakora i ono je pokazalo obre učinke pri čemu je etanolni ekstrakt cvijeta pokazao bolju aktivnost (44,7%) od eteričnog ulja cvijeta (23%). To se može pripisati fenolnim spojevima, posebno klorogenskoj kiselini koja je jedan od glavnih spojeva u korištenom ekstraktu.⁷

Kako je već navedeno, fenolnim spojevima pripisuje se antioksidacijsko, antimikrobno i protuupalno djelovanje, no to nisu jedina djelovanja. Flavonoidi izolirani iz motra potvrdili su antiproliferativni učinak na stanice melanoma A375 koji su odgovorni za nastanak raka kože.³ Uz to, postoje i druga pozitivna svojstva motra poput insekticidnog djelovanja. Esencijalna ulja iz sjemenki i nadzemnih organa motra pokazuju letalni učinak na ličinke *Spodoptera littoralis* i *Culex quinquefasciatus*, čineći ih potencijalnim izvorom botaničkih insekticida. Osim u poljoprivredi, motar se koristi i u veterini. Nadzemni organi biljke služe za poticanje proizvodnje mlijeka i integraciju prehrane kod zečeva.²³ Kao jedan od glavnih fenolnih spojeva izdvaja se klorogenska kiselina, koja djeluje na hipertenziju, a također ublažava štetne posljedice nastale

hiperglikemijskim stanjima, bilo prije ili poslije tretmana, na stanicama humanih hepatocita. Klorogenska kiselina pokazuje protuupalno i imunološko djelovanje i kao takva može se koristiti u liječenju autoimunih ili upalnih bolesti poput reumatoidnog artritisa i dijabetesa melitusa.²⁵

1.4.1. Testovi antioksidacijske aktivnosti

Testovi antioksidacijske aktivnosti mogu se podijeliti u dvije kategorije, one zasnovane na prijenosu vodika (HAT), i testovi temeljeni na prijenosu jednog elektrona (ET). Kombinirani HAT i ET mogu se odvijati u isto vrijeme, pri čemu dominantan mehanizam ovisi o strukturi i svojstvima antioksidansa, topljivosti, njegovom koeficijentu razdjeljenja, kao i o sustavu otapala.²⁵ Korištene metode u ovom radu se temelje na različitim mehanizmima djelovanja i to su FRAP, DPPH i ORAC.

FRAP metoda služi za određivanje antioksidacijske snage redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP). Temelji se na prijenosu elektrona te mjeri redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} uz pomoć antioksidansa. Reakcija se odvija u kiselom mediju a nastaje kompleks intenzivno plave boje. Antioksidacijska snaga se odražava kao povećanje apsorbancije pri 592 nm.²⁶

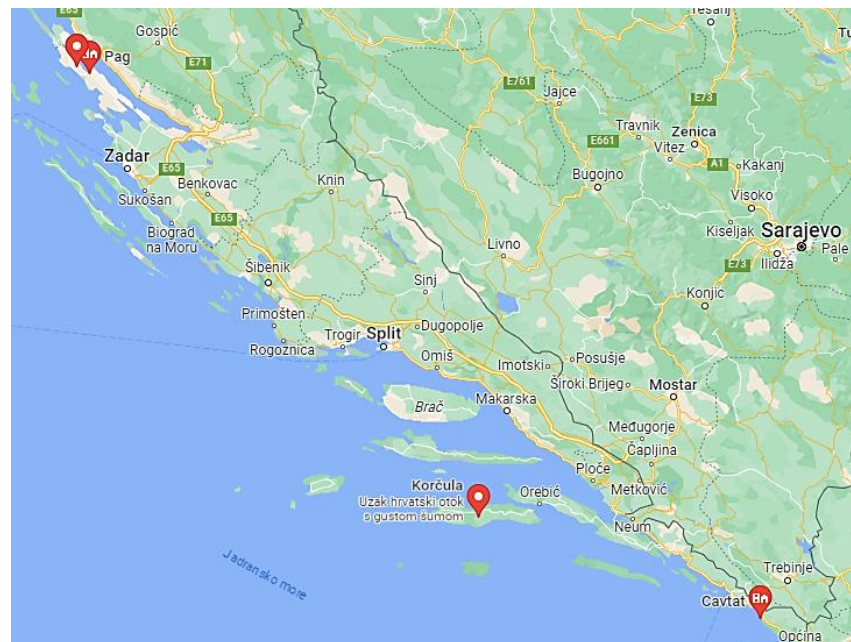
Metoda redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala jedna je od važnijih metoda za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Zasniva se na reakciji antioksidansa i DPPH radikala odnosno njegovoj redukciji. Budući da je u stabilnom obliku ljubičast dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu. Mjerenje se provodi pri valnoj duljini od 517 nm.²⁶

Ispitivanje kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) metoda je koja mjeri sposobnost antioksidansa za inhibiciju slobodnog peroksil radikala. Često korišteni generatori peroksilnih radikala su azo spojevi poput hidrofilnog 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidroklorid (AAPH). Raspadom ovog spoja nastaje peroksilni radikal koji reagira sa fluoresceinom pri čemu dolazi do slabljenja intenziteta fluorescencije što je temelj mjerenja.²⁶

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Priprema ekstrakata

Uzorci biljnog materijala, cvjetovi i listovi motra (*Crithmum maritimum* L.), prikupljeni su s tri različite lokacije: otocima Pagu i Korčulu te u Cavtatu. Uzorkovanje je provedeno u kolovozu 2022. godine, u fazi cvatnje biljke. Svi su uzorci ubrani u blizini mora manjoj od 10 m. Tlo je na svakom području uzorkovanja bio litički leptosol te nije bilo prisutnosti druge vegetacije. Uzorci s Paga i iz Cavtata su bili izloženi sjevernoj orijentaciji dok je uzorak s Korčule bio izložen sjeveroistoku. Za otok Pag zbog položaja ispod Velebita karakteristična je česta pojava sjeveroistočnog vjetra. S vrha planine puše hladna i jaka bura koja pogađa upravo otok Pag.²⁷ Cavtat je zbog svoje otvorenosti također izložen vjetru.²⁸ Na Korčuli je dosta vjetrovito odnosno sa sjeveroistočne strane je izložena jakim udarima bure.²⁹



Slika 4. Mjesta uzorkovanja motra³⁰

Ubrani uzorci su prije postupka ekstrakcijeliofilizirani, a potom usitnjeni u mlincu te pohranjeni na sobnu temperaturu do trenutka provedbe ekstrakcije. Ekstrakcija je provedena korištenjem 80%-tnog metanola, na način da je vagano 200 mg

usitnjenog uzorka na analitičkoj vagi SAB 125i Solis (Adam, Kingston, UK). U plastičnu posudicu je odvagano uzorku dodano 8 mL vodene otopine metanola (80:20, v/v) i smjesa je stavljena na ekstrakciju u ultrazvučnu kupelj (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Njemačka) tijekom 15 minuta, nakon čega je uslijedilo trosatno miješanje u Orbital Shaker-Incubatoru ES 20 (SIA Biosan, Riga, Latvija). Ekstrakti su ostavljeni u hladnjaku preko noći te su nakon 24 sata filtrirani korištenjem filtera CHROMAFIL Xtra MV 45/25 i šprice BD Discardit II Syringe volumena 5 mL. Svi su uzorci za analize pripremljeni u duplikatu.



Slika 5. Pripremljen biljni ekstrakt lista motra (vlastita fotografija)

2.2. Određivanje fenolnog sastava spektrofotometrijskim (UV/Vis) metodama

2.2.1. Određivanje udjela ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

U kivete se pipetira 25 μL uzorka, 1,975 mL destilirane vode i 125 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Uzorci se promiješaju, te im se nakon 1 minute doda 375 μL otopine Na_2CO_3 (w (Na_2CO_3) = 20%, w/v). Uzorci se ostave 2 sata na sobnoj

temperaturi u mraku, nakon čega im se spektrofotometrijski izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Za izradu baždarnog pravca korištene su otopine galne i klorogenske kiseline koncentracije 50-1000 mg/L (6 točaka koncentracija 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 700 mg/L i 1000 mg/L), a rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne odnosno klorogenske kiseline po L ekstrakta (mg GAE/L, odnosno mg CA/L).



Slika 6. Pripremljene otopine za određivanje fenola u uzorcima cvijeta; 11 - Cavtat cvijet, 12 – Korčula cvijet, 13 – Pag cvijet (vlastita fotografija)



Slika 7. UV/Vis spektrofotometar UV-1900i (Shimadzu, Kyoto, Japan)³¹

2.2.2. Određivanje ukupnih flavonoida

U kivete se doda 0,25 mL uzorka, 1,25 mL vode te 0,075 mL NaNO_2 ($w(\text{NaNO}_2) = 5\%$, w/v). Nakon 5 minuta doda se 0,15 mL AlCl_3 ($w(\text{AlCl}_3) = 10\%$, w/v), potom nakon 6 minuta, doda se još 0,5 mL NaOH ($c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$) i 0,775 mL vode. Tako pripremljenom uzorku izmjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm. Za izradu baždarnog pravca korištene su otopine rutina raspona koncentracija 50-1000 mg/L (6 točaka koncentracija 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 700 mg/L i 1000 mg/L). Rezultati su izraženi u mg rutina po L ekstrakta (mg RU/L).



Slika 8. Priprema otopina rutina za izradu baždarne krivulje (vlastita fotografija)

2.2.3. Određivanje klorogenske kiseline i njenih derivata HPLC metodom

Fenolne kiseline: neoklorogenska, klorogenska i kriptoklorogenska kupljene su od Sigma Aldrich (St. Louis, MO, SAD); acetonitril i metanol od VWR (Radnor, PA, SAD) i 85%-tna orto-fosforna kiselina od Honeywell Fluka (Charlotte, NC, SAD). Svi reagensi su bili HPLC kvalitete, a ultra čista vode dobivena je iz Millipore sustava.

Za fenole, standardne krivulje konstruirane su u šest točaka razrjeđivanjem radne standardne otopine upotrebom metanola/vode (80:20, v/v). Kalibracijske krivulje za neoklorogensku i 4-O-kafeoilkiničnu kiselinu postavljene su u rasponu koncentracija 0,1-50 µg/mL, dok je za klorogensku kiselinu raspon bio 5-500 µg/mL. Koncentracije uzoraka izražene su kao mg ispitivanog spoja po litri ekstrakta (mg/L).

Fenolni spojevi ekstrakta lista i cvijeta motra kvantificirani su visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom spojenom s UV-VIS detektorom (Shimadzu Nexera LC-40, Shimadzu, Kyoto, Japan) prema postupku opisanom u Politeo i sur. (2023), uz male modifikacije. Ukratko, odvajanje i kvantifikacija uzoraka provedeno je korištenjem stupca obrnute faze C18 dimenzija 250 mm × 4,6 mm × 5 µm (Phenomenex, Torrance, AC, SAD) pri 35 °C. Kromatografsko odvajanje fenolnih spojeva provedeno je pri brzini protoka od 1 mL/min korištenjem gradijentne elucije s otapalom A (ultračista voda/85%-tna *o*-fosforna kiselina; 99,8:0,2, v/v) i otapalom B (metanol/acetonitril; 1:1, v/v): 0-16 min, 4-15% B; 16-37,5 min, izokratski 15% B; 37,5-50 min, 15-35% B; 50-60 min, 35% B, i 62 min 4% B, s ponovnim ekvilibriranjem od 3 minute. Ukupno vrijeme rada bilo je 65 min, uključujući vrijeme za ponovno ekvilibriranje. 20 µL uzorka ubrizgano je u HPLC sustav, u duplikatu. Spojevi su praćeni pri 220 i 320 nm pomoću UV-Vis detektora. Pikovi su identificirani usporedbom vremena zadržavanja s onima autentičnih standarda i obogaćenih uzoraka. Podaci su prikupljeni, obrađeni i integrirani pomoću softvera LabSolution (Shimadzu, Kyoto, Japan). Koncentracije komponenata ispitivanih uzoraka izražene su u mg po L ekstrakata (mg/L).



Slika 9. Primjer izgleda tekućinskog kromatografa³²

2.3. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

2.3.1. FRAP metoda

FRAP reagens je napravljen miješanjem 25 mL acetatnog pufera ($c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 3,6$), 2,5 mL otopine FeCl_3 ($c(\text{FeCl}_3) = 20 \text{ mmol/L}$) i 2,5 mL otopine TPTZ-a ($c(\text{TPTZ}) = 10 \text{ mmol/L}$ u 40 mmol/L HCl). Za izradu baždarne krivulje korištene su otopine Troloxa. U mikrotitarsku pločicu otpipetira se 300 μL otopine FRAP reagensa te se odmah očita apsorbancija. Zatim se doda 10 μL uzorka te se očitava promjena apsorbancije nakon 4 minute korištenjem Microplate Reader Sunrise (Tecan, Männedorf, Švicarska). Rezultati se izražavaju u μM Trolox ekvivalenata ($\mu\text{M TE}$).

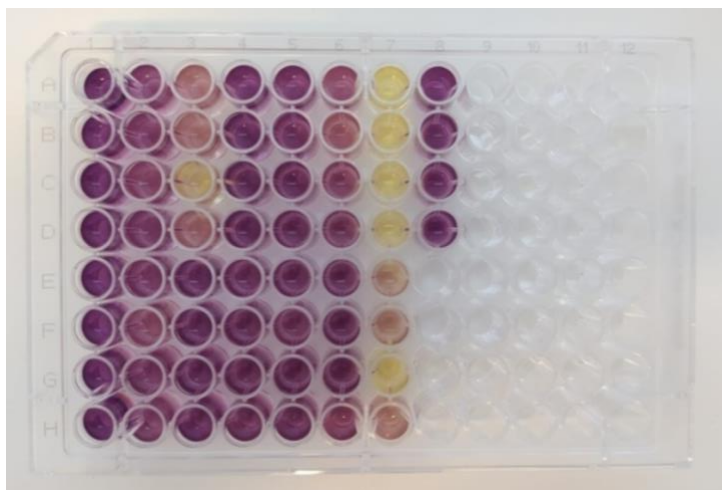


Slika 10. Microplate Reader Sunrise³³

2.3.2. DPPH metoda

I ova metoda je provedena korištenjem uređaja Microplate Reader Sunrise. Postupak se sastoji od pipetiranja 290 μL otopine DPPH ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) u otvore mikrotitarske pločice kojoj se odmah očita apsorbancija. Nakon toga doda se 10 μL uzorka te nakon jednog sata ponovno mjeri promjena apsorbance.

Dobiveni rezultati su izraženi kao % inhibicije DPPH radikala, koji se računa preko izraza:
$$\text{Inhibicija (\%)} = \left(\frac{AC(0) - AA(t)}{AC(0)} \right) * 100$$



Slika 11. Izgled mikrotitarske pločice (vlastita fotografija)

2.3.3. ORAC metoda

Kod ove metode su se za izradu baždarnog pravca koristile otopine Troloxa. U mikrotitarsku pločicu otpipetira se 150 μL fluoresceina ($c(\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5) = 0,08 \mu\text{M}$) i 25 μL uzorka odnosno fosfatnog pufera ($c = 0,075 \text{ M}$) za slijepu probu te otopine Troloxa za izradu baždarnog pravca. Otopine se prvo termostatiraju pri 37 $^\circ\text{C}$ kroz 30 minuta, a zatim im se dodaje 25 μL AAPH ($c(2,2\text{'-azobis}(2\text{-amidinopropan})\text{-dihidroklorid}) = 0,15 \text{ mol/L}$). Slijedi mjerenje promjene intenziteta fluorescencije svake minute tijekom 80 minuta i to na valnim duljinama od 485 i 520 nm. Rezultati su analizirani pri razrjeđenjima 1:100 i izraženi kao μM Trolox ekvivalenata. ORAC metoda rađena je na Multimode Reader BioTek Synergy HTX (Agilent, Kalifornija, SAD).

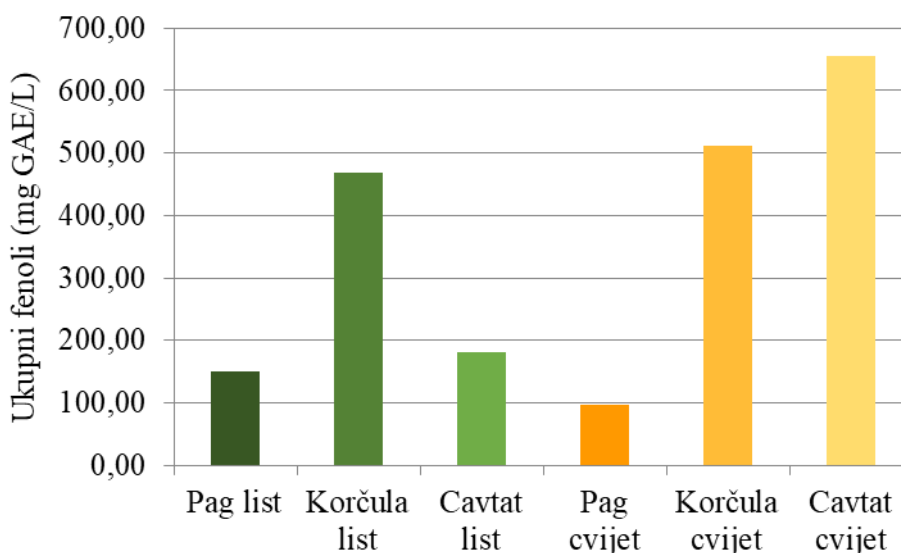


Slika 12. Multimode Reader BioTek Synergy HTX³⁴

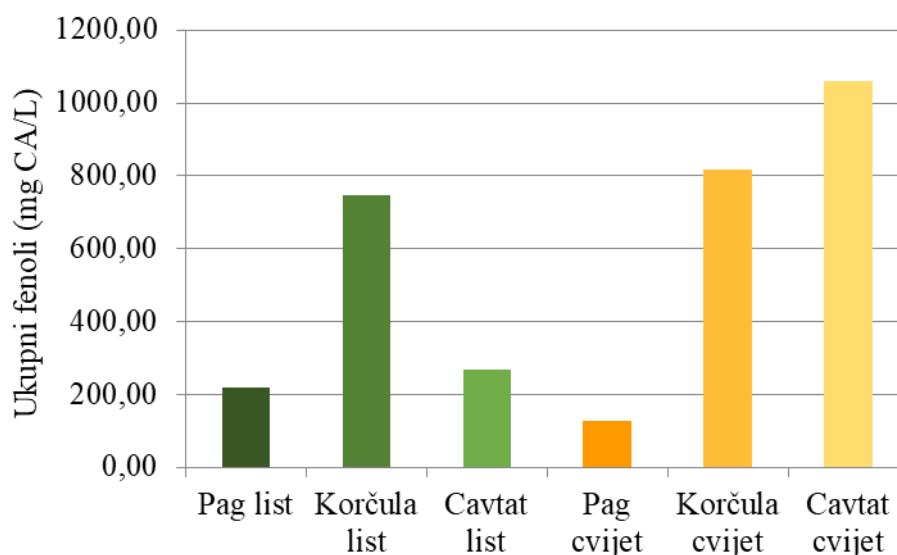
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Rezultati sadržaja ukupnih fenola analizirani Folin-Ciocalteu metodom prikazani su na slikama 13 i 14. Slika 13 prikazuje rezultate ukupnih fenola izražene u mg ekvivalenta galne kiseline po litri ekstrakta (mg GAE/L), dok slika 14 pokazuje rezultate izražene u mg ekvivalenta klorogenske kiseline po litri ekstrakta (mg CA/L). Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako je udio ukupnih fenola najviši u ekstraktu cvijeta motra s lokacije Cavtat (655,33 mg GAE/L; 1058,56 mg CA/L), zatim u ekstraktu cvijeta motra s lokacije Korčula (510,67 mg GAE/L; 817,44 mg CA/L) i nakon toga u ekstraktu lista motra također s lokacije Korčula (468,67 mg GAE/L; 747,44 mg CA/L). Ostala tri uzorka pokazala su znatno nižu količinu ukupnih fenola (> 200 mg GAE ili CA/L) te su u usporedbi sa prva tri uzorka njihove vrijednosti bile dva do tri puta manje. Iz ovih rezultata također možemo zaključiti kako ekstrakti cvijeta motra sa lokacije Korčula i Cavtat imaju viši udio ukupnih fenola u odnosu na ekstrakte lista motra sa iste lokacije, u usporedbi sa lokacijom Pag gdje je viši udio fenola bio u listu.



Slika 13. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lista i cvijeta motra s 3 ispitivane lokacije



Slika 14. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lista i cvijeta motra s 3 ispitivane lokacije

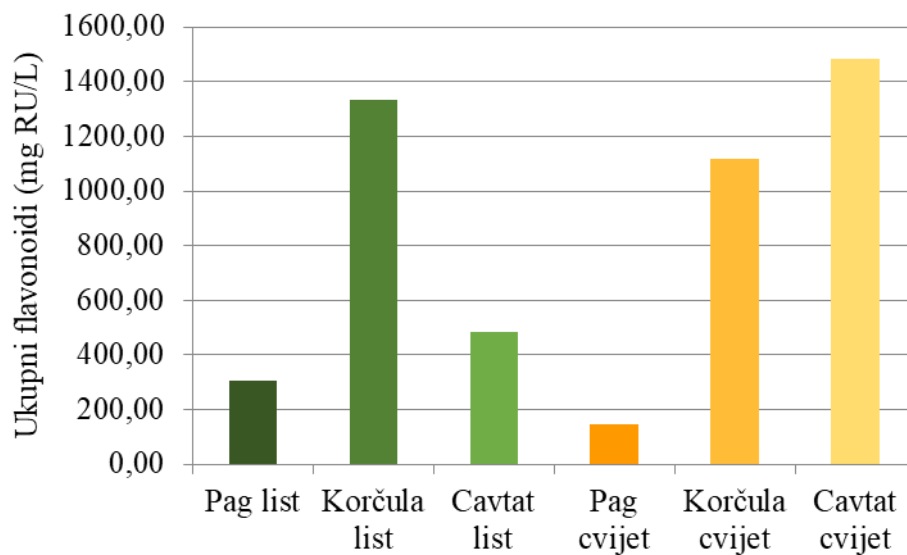
Usporedbom rezultata s drugim studijama uočeno je da su ekstrakti lista u studijama koje su proveli Meot-Duros i sur. (2008) te Houta i sur. (2011) pokazali viši sadržaj fenola u odnosu na cvijet što nije bio slučaj u ovom radu. Houta i sur. (2011) u svojim rezultatima navode udio ukupnih polifenola u ekstraktu lista 11,52 mg GAE/g, dok je u ekstraktu cvijeta udio iznosio 9,43 mg GAE/g.¹³ Meot-Duros i sur. (2008) su dokazale nešto više vrijednosti ukupnih polifenola u ekstraktu lista, 31,93 mg GAE/g.²² Generalić Mekinić i sur. (2018) su analizirali ukupne fenole u različitim periodima vegetacije odnosno prije cvjetanja, na početku cvjetanja i u punom cvjetanju. Došli su do rezultata koji pokazuju najveći udio ukupnih fenola prije cvjetanja (mjesec travanj), zatim na početku cvjetanja (mjesec lipanj) i na kraju u punom cvjetanju (mjesec kolovoz).¹¹

3.2. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida

Na slici 15 prikazani su rezultati određivanja ukupnih flavonoida analiziranih kolorimetrijskom metodom. Najveću vrijednost ukupnih flavonoida imao je ekstrakt cvijeta motra s područja Cavtata (1485,60 mg RU/L), zatim slijede ekstrakti motra s

Korčule i to s izmjerenim vrijednostima za list 1334,93 mg RU/L i za cvijet 1116,27 mg RU/L. Za uzorke s lokacije Pag, kao i kod ukupnih fenola, izmjerene su nešto niže vrijednosti u odnosu na ostale uzorke. Rezultati pokazuju da ekstrakti cvijeta motra pokazuju visoku količinu ukupnih flavonoida, izuzev ekstrakta cvijeta s Paga koji je pokazao najnižu vrijednost od svih testiranih uzoraka.

Kao i kod rezultata za ukupne fenole i ovdje su se uzorci sakupljeni sa lokaliteta otoka Korčule pokazali najviši udio ukupnih flavonoida, dok su uzorci s otoka Paga imali najniže vrijednosti.



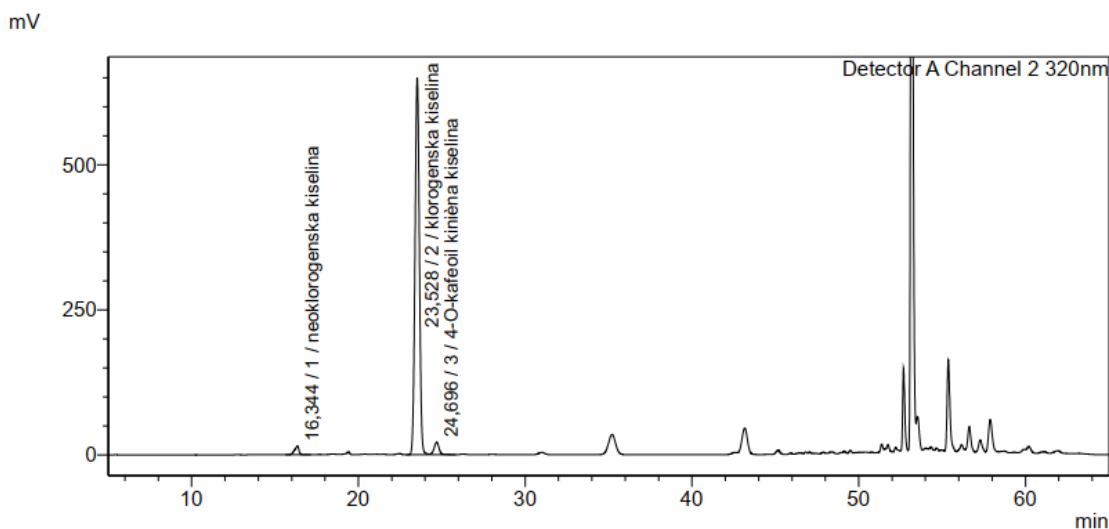
Slika 15. Grafički prikaz rezultata određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lista i cvijeta motra s 3 ispitivane lokacije

Usporedba dobivenih rezultata s drugim istraživanjima je u ovom slučaju nešto teža, jer drugi autori koriste različite standarde preko kojih izražavaju sadržaj ukupnih flavonoida (katehin – CE ili kvercetin – QE). Tako npr. Costa i sur. (2018) u svojim rezultatima navode sadržaj flavonoida u etanolnim ekstraktima motra od 3,7 mg QE/g,¹⁴ dok je u radu Houta i sur. (2011) udio ukupnih flavonoida u ekstraktu lista bio 3,93 mg CE/g, a u ekstraktu cvijeta 3,71 mg CE/g.¹³ Ono što možemo ponovno primijetiti je da je cvijet imao bolje rezultate u ovom radu u odnosu na druge navedene studije.

3.3. Rezultati HPLC metode

Uz pomoć HPLC metode izmjerene su koncentracije nekih od najzastupljenijih fenolnih kiselina (neoklorogenska, klorogenska i kriptoklorogenska) u ekstraktima lista i cvijeta motra, a rezultati su prikazani u tablici 2.

U svim testiranim uzorcima najzastupljenija kiselina je bila klorogenska, zatim kriptoklorogenska i na kraju neoklorogenska kiselina. Najvišu koncentraciju klorogenske kiseline imao je ekstrakt cvijeta motra s lokacije Cavtata dok je najnižu koncentraciju imao ekstrakt cvijeta motra s lokacije Pag. Uzorci s lokacije Korčula (cvijet i list) ponovno se ističu s visokim sadržajem klorogenske kiseline, ali i neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline. Uspoređujući rezultate ukupnog sadržaja fenola i flavonoida s koncentracijom derivata klorogenske kiseline, još jednom je potvrđeno kako je motar s područja Korčule bogat izvor biološki aktivnih spojeva, dok je ekstrakti s područja Paga najsiromašniji. Možemo još izdvojiti i zaključak kao su uzorci s lokacije Pag i Korčula imali viši udio kiselina u uzorcima lista u odnosu na cvijet, dok je kod uzoraka s lokacije Cavtat cvijet imao viši udio fenolnih kiselina u odnosu na list.



Slika 16. Kromatogram klorogenske kiseline i njenih derivata u ekstraktu lišća motra uzorkovan na otoku Korčuli HPLC tehnikom

Tablica 2. Rezultati određivanja koncentracije najzastupljenijih spojeva u ekstraktima lista i cvijeta motra s 3 ispitivane lokacije uz pomoć HPLC metode

Fenolni spojevi (mg/L)	PAG		KORČULA		CAVTAT	
	List	Cvijet	List	Cvijet	List	Cvijet
Neoklorogenska kiselina	2,96	0,28	30,05	4,58	5,57	7,30
Klorogenska kiselina	32,40	7,50	248,44	199,67	82,04	331,82
Kriptoklorogenska	4,70	0,40	42,06	7,20	8,92	10,09

U odnosu na rezultate koji su već spomenuti u općem dijelu ovog rada, Souid i sur. (2021) također navode kao najzastupljeniji fenolni spoj klorogensku kiselinu (7,25 mg/g suhe tvari), dok je udio neoklorogenske kiseline bio 3,5 puta manji (2,03 mg/g suhe tvari). Ono što se posebno ističe u ovom radu je viši udio klorogenske kiseline u odnosu na neoklorogensku kiselinu, i to je 8-14 puta kod ekstrakata lista i 25-45 puta viši udio u uzorcima cvijeta.¹⁰

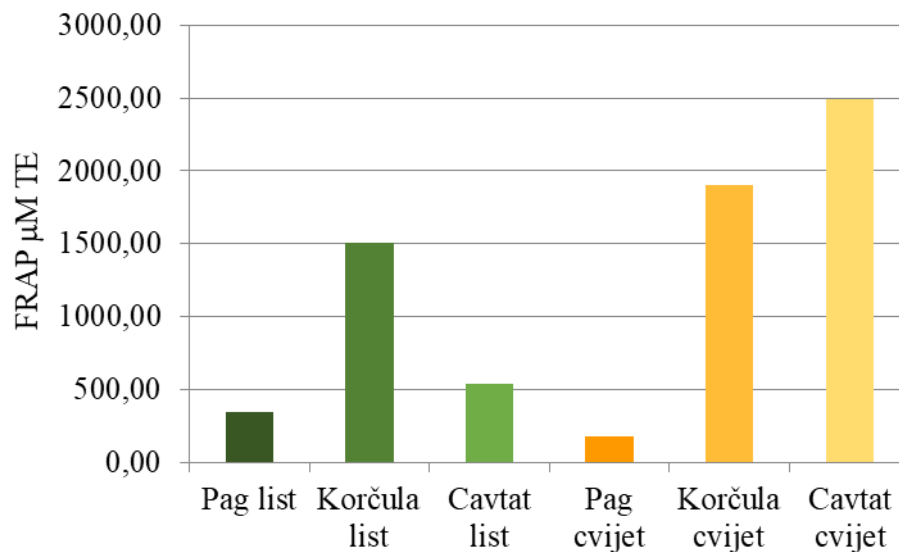
3.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Antioksidacijska aktivnost određena je korištenjem tri različite metode a rezultati su prikazani na slikama 17-19.

Rezultate dobiveni FRAP metodom izraženi su u μM ekvivalenta Troloxa (μM TE) i prikazani na slici 17. Najveću redukcijsku sposobnost imao je ekstrakt cvijeta s lokacije Cavtat od 2493,59 μM TE, potom ekstrakt cvijeta (1901,28 μM TE) i lista

(1508,97 $\mu\text{M TE}$) s lokacije Korčula. Ostali ekstrakti pokazali su 5-30 puta lošiju aktivnost.

Kao i kod fenolnog sastava i ovdje možemo izdvojiti uzorke s lokacije Korčula s najboljim redukcijskim sposobnostima u odnosu na uzorke s lokacije Pag koje su imale najslabiji fenolni sastav i najlošiju redukcijsku sposobnost.

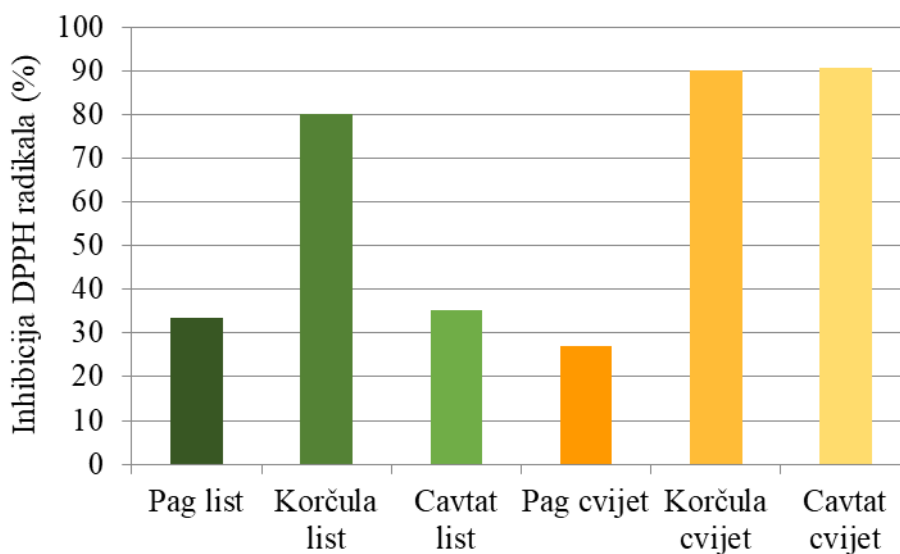


Slika 17. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u ekstraktima lista i cvijeta motra s 3 ispitivane lokacije

Generalić Mekinić i sur. (2018) u svom znanstvenom istraživanju također su pratili redukcijsku sposobnost etanolnih ekstrakata motra uzorkovanog tijekom vegetacijskog perioda i navode najveću aktivnost za ekstrakte lista iz travnja (35,1 mM TE) dok je najslabija aktivnost određena za uzorke iz kolovoza i prosinca gdje je vrijednost iznosila 19,9 mM TE. Ovi autori navode FRAP vrijednosti za uzorke u 8 mjesecu u iznosu od 19,9 mM TE što je značajnije više u usporedbi s rezultatima dobivenim u ovom radu gdje su se te vrijednosti kretale od 0,2-2,5 mM TE.¹¹

3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Druga metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti je DPPH metoda čiji rezultati su prikazani na slici 18. Najveći postotak inhibicije DPPH radikala određen je za ekstrakte cvijeta s lokacije Cavtat i Korčula, a iznosio je 90-91%. Nešto niži, ali i dalje jako visok antioksidacijski kapacitet imao je ekstrakt lista s lokacije Korčula s 80,2% inhibicije. U ostalim ekstraktima antioksidacijski kapacitet je bio ispod 40%.

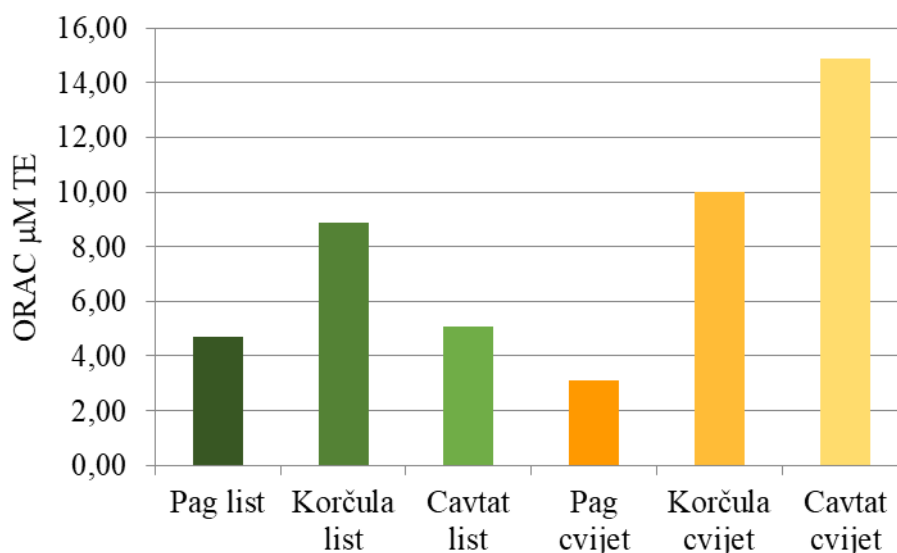


Slika 18. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u ekstraktima lista i cvijeta motra s 3 ispitivane lokacije

U istraživanju provedenom od strane Generalić Mekinić i sur. (2016) antioksidacijski kapacitet etanolnog ekstrakta cvijeta motra iz kolovoza iznosio je 61%, dok je za list, također iz kolovoza, imao postotak inhibicije DPPH radikala 61,8%.⁷ U usporedbi s rezultatima ovog rada metanolni ekstrakti cvijeta s lokacije Korčula i Cavtat su bili bolji za 30%, odnosno ekstrakti lista s lokacije Korčula za 20%.

3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom

Treća metoda kojom se mjerila antioksidacijska aktivnost je ORAC metoda, a rezultati ove analize su prikazani na slici 19. Svi ekstrakti su razrjeđenja 1:100 prije početka analize, a dobiveni rezultati su izraženi u $\mu\text{M TE}$. Najvišu vrijednost, kao i u svim ostalim metodama, imao je ekstrakt cvijeta s lokacije Cavtat ($14,90 \mu\text{M TE}$) dok je ekstrakt cvijeta s lokacije Pag imao najnižu vrijednost od svih uzoraka ($3,10 \mu\text{M TE}$). Uz ekstrakt cvijeta s lokacije Korčula, ponovno se izdvajaju ekstrakti lista i cvijeta s lokacija Korčula čije su ORAC vrijednosti iznosile $8,90 \mu\text{M TE}$ odnosno $10,00 \mu\text{M TE}$.



Slika 19. Grafički prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom u ekstraktima lista i cvijeta motra razrijeđenim 1:100 s 3 ispitivane lokacije

U istraživanju Souid i sur. (2021) etanolnom ekstraktu lista motra također je određena ORAC vrijednost koja je iznosila $15,84 \mu\text{M TE/g}$ suhe tvari.¹⁰ U istraživanju Generalić Mekinić i sur. (2018) za etanolni ekstrakt motra u mjesecu kolovozu ORAC vrijednosti je iznosila $17,7 \text{ mM TE}$.¹¹ U usporedbi s rezultatima prezentiranim u ovom radu navedeni autori su dokazali bolji antioksidacijski potencijal u svojim ekstraktima lista motra u odnosu na one ispitivane u ovom radu.

4. ZAKLJUČAK

Temeljem opisanih rezultata možemo izvesti nekoliko zaključaka. Pregledom literature uočeno je kako vrijeme uzorkovanja kao i vegetacijski period ima značajan utjecaj na kemijski sastav i biološki potencijal motra što je u ovom radu i uzeto u obzir. Kako se u literaturi navodi da je fenolni profil motra najbolji prije cvatnje ili na početku cvatnje, u ovom istraživanju motar je uzorkovan ubrani u fazi cvatnje tijekom mjeseca kolovoza. Određivanjem fenolnog sastava utvrđen je visok udio fenola, flavonoida, a osobito klorogenske kiseline u svim testiranim uzorcima. Osim utjecaja vegetacijskog razdoblja na sadržaj fenolnih spojeva u ovom radu je uočen i utjecaj lokacije branja motra, pa tako uzorci s lokacije Korčula pokazuju najviši udio fenolnih komponenta, ali i najbolju antioksidacijsku aktivnost određenu svim metodama, dok su najlošiji rezultati zabilježeni za uzorke s lokacije Pag. Također, na osnovu rezultata se može zaključiti kako su ekstrakti cvijeta lista motra pokazali jako dobre rezultate, u nekim slučajevima bolje od ekstrakta lista, što ukazuje na izuzetan potencijal ove biljke koji je još uvijek nedovoljno istražen i neiskorišten.

5. LITERATURA

1. Hameed, M. A. Khan, Halophytes: Biology and Economic Potentials, J. Sci. 39 (2011) 40-44
2. URL:https://www.ladraillecomeestible.com/wp-content/uploads/2019/09/70344960_416526585664857_4453614389957754880_n.jpg (6.8.2023.)
3. M. Kraouia, A. Nartea, A. Maoloni i sur., Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) as an Emerging Crop for the Manufacturing of Innovative Foods and Nutraceuticals, Mol. 28 (2023) 4741, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28124741>
4. M. Renna, Reviewing the Prospects of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) as Emerging Vegetable Crop, Plants. 7 (2018) 92, doi: [10.3390/plants7040092](https://doi.org/10.3390/plants7040092)
5. W. Franke, Vitamin C in Sea Fennel (*Crithmum maritimum*) an Edible Wild Plant, Econ. Bot. 36 (1982) 163-165, doi: [10.1007/BF02858711](https://doi.org/10.1007/BF02858711)
6. A. Atia, Z. Barhoumi, R. Mokded i sur., Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), J. Med. Plant Res. 5 (2011) 3564-3571
7. I. Generalić Mekinić, I. Blažević, I. Mudnić i sur., Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity, J. Food Sci. Technol. 53 (2016) 3104-3112, doi: [10.1007/s13197-016-2283-z](https://doi.org/10.1007/s13197-016-2283-z)
8. I. Albertos, O. Martinez-Alvarez, M. E. Lopez-Caballero, A. B. Martin-Diana, Use of Sea Fennel as a Natural Ingredient of Edible Films for Extending the Shelf Life of Fresh Fish Burgers, Mol. 25 (2020) 5260, doi: [10.3390/molecules25225260](https://doi.org/10.3390/molecules25225260)
9. V. V. Bianco, M. Renna, P. Santamaria, Ortaggi liberati l'ebook, BiodiverSO, Puglia, 2018
10. A. Souid, C. M. Della Croce, S. Frassinetti i sur., Nutraceutical Potential of Leaf Hydro-Ethanollic Extract of the Edible Halophyte *Crithmum maritimum* L., Mol. 26 (2021) 5380, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26175380>
11. I. Generalić Mekinić, V. Šimat, I. Ljubenković i sur., 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>

12. Ž. Maleš, I. Žuntar, B. Nigović i sur., Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire – *Crithmum maritimum* L., *Acta Pharm.* 53 (2003) 139-144
13. O. Houta, A. Akrouf, M. Neffati, H. Amri, Phenolics Contents, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of *Crithmum maritimum* Cultivated in Tunisia Arid Zones, *J. Biol. Act. Prod. Nat.* 1 (2013) 138-143, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/22311866.2011.10719081>
14. C. Costa, L. Padalino, S. Spinelli i sur., Study of the Efficacy of Two Extraction Techniques from *Crithmum maritimum* and *Salicornia europaea*, *J. Food. Nutr. Res.* 6 (2018) 456-463, doi: 10.12691/jfnr-6-7-6
15. N. Sabo, Primjena spektrofotometrije u učenju Biologije i ostalih predmeta prirodoslovnog područja, *Educ. biol.* 7 (2021) 70-82, doi: 10.32633/eb.7.8
16. N. Mikołajczak, M. Tanska, D. Ogrodowska, Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability, *Trends. Food. Sci. Technol.* 113 (2021) 110-138, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.046>
17. A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman, Y.M. Hijji, Determination of total flavonoid content by aluminium chloride assay: A critical evaluation, *Food. Sci. Technol.* 150 (2021) 111932, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
18. URL:https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Odredjivanje_struktura_organ_skih_spojeva_nastavni_tekst.pdf (17.9.2023)
19. R. Malviya, V. Bansal, O. P. Pal, P. K. Sharma, High performance liquid chromatography: A short review, *J. Glob. Pharma. Technol.* 2 (2010) 22-26
20. URL:<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (17.9.2023.)
21. L. Meot-Duros, C. Magne, Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves, *Plant Physiol. Biochem.* 47 (2009) 37-41, doi: 10.1016/j.plaphy.2008.09.006
22. L. Meot-Duros, G. Le Floch, C. Magne, Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species, *J. Ethnopharmacol.* 116 (2008) 258-262, doi: 10.1016/j.jep.2007.11.024
23. R. Pavela, F. Maggib, G. Lupidi, Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera*

- littoralis* (Bosid.), Ind. Crops. Prod. 109 (2017) 603-610, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.09.013
24. R. Giordano, Z. Saii, M. Fredsgaard i sur., Pharmacological Insights into Halophyte Bioactive Extract Action on Anti-Inflammatory, Pain Relief and Antibiotics-Type Mechanisms, Mol. 26 (2021) 3140, doi: 10.3390/molecules26113140
25. F. Shahidi, Y. Zhong, Measurement of antioxidant activity, J. Funct. Foods. 18 (2015) 757-781, doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047
26. Y. Zhong, F. Shahidi, Methods for the assessment of antioxidant activity in foods, Handbook of Antioxidants for Food Preservation. 12 (2015) 287-333, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>
27. URL: <https://www.croatia-service.com/hr/informacije/wyspa-pag/> (21.9.2023.)
28. URL: <https://www.poslovniturizam.com/destinacije/cavtat/45/> (21.9.2023.)
29. URL: <https://www.ikorculainfo.com/hr/otok-korcula/klima.htm> (21.9.2023.)
30. URL: <https://www.google.com/maps/search/karta+hrvatske+pag+korcula+cavtat/@43.5013816,16.7876488,8z?hl=hr&entry=ttu> (18.8.2023.)
31. URL: <https://www.shimadzu.com/an/products/molecular-spectroscopy/uv-vis/uv-vis-nir-spectroscopy/uv-1900i/option.html> (22.9.2023.)
32. URL: https://www.ktf.unist.hr/images/stories/Galerija_KTF_nebrisi/slika6.png (24.9.2023.)
33. URL: <https://shop.tecan.com/us/en/product/30190079/Sunrise-absorbance-reader-with-temperature-control> (24.9.2023.)
34. URL: <https://www.agilent.com/cs/publishingimages/synergy-HTX-right-facing-tray-out-320x320.jpg> (24.9.2023.)