

Kemijski sastav i biološki potencijal motra

Podrug, Roko

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:333521>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI POTENCIJAL MOTRA

DIPLOMSKI RAD

ROKO PODRUG

Matični broj: 59

Split, listopad 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU
DIPLOMSKI STUDIJ
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI POTENCIJAL MOTRA

DIPLOMSKI RAD

ROKO PODRUG

Matični broj: 59

Split, listopad 2023.

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

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

DIPLOMA THESIS

ROKO PODRUG

Parent number: 59

Split, October 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Kemijско tehnološki fakultet
Prehrambena tehnologija

DIPLOMSKI RAD

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 MOTRA Roko Podrug, 59

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj okolišnih faktora na kemijski sastav i biološki potencijal samonikle biljke motar (*Crithmum maritimum* L.) te mogućnosti njene primjene u prehrambenoj industriji. Analizirani su metanolni ekstrakti lista motra prikupljeni duž Jadranske obale na 7 različitih lokacija. U eksperimentalnom dijelu rada spektrofotometrijski je u uzorcima određen udio ukupnih fenola i flavonoida, te je korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC; engl. *High-performance liquid chromatography*) identificirana i kvantificirana klorogenska kiselina i njeni derivati. Antioksidacijska aktivnost određena je pomoću 3 različite metode: metodom određivanja snage redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP), ispitivanjem kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) te metodom redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (engl. 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH). Dobiveni rezultati ukazuju na utjecaj mjesta uzorkovanja na njihov kemijski sastav i biološki potencijal. Pjeskovito stanište, koje biljci uskrađuje hranjive tvari i izlaže je stresu, pokazalo se kao potencijalno važni uzročnik bogatog fenolnog sastava i izuzetnog biološkog potencijala uzoraka. Sukladno tome, najviši udio fenolnih komponenti (ukupni fenoli, flavonoidi, klorogenska kiselina) i najbolja redukcijska snaga i antioksidacijski potencijal zabilježen je u uzorku lista motra uzorkovanom na lokaciji Neretva, dok su uzorci prikupljeni na srednjem Jadranu (Lokacije Split i Drašnice) imali najniži udio navedenih spojeva i slabu antioksidacijsku aktivnost.

Ključne riječi: halofit, motar, fenoli, klorogenska kiselina, antioksidacijska aktivnost, tekućinska kromatografija

Rad sadrži: 34 stranice, 22 slike, 3 tablice, 38 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-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

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

DIPLOMA THESIS

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

Roko Podrug, 59

Abstract: The aim of this work was to investigate the influence of environmental factors on the chemical composition and biological potential of the wild sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) and the possibilities of its application in the food industry. Methanolic extracts of sea fennel leaves collected along the Adriatic coast at 7 different locations were analyzed. In the experimental part of the work, the content of total phenols and flavonoids was determined spectrophotometrically, while the concentration of chlorogenic acid and its derivatives was identified and quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC). Antioxidant activity was determined using 3 different methods: the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method, the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) test, and the method of reducing 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). The obtained results indicate the influence of the sampling site on the chemical composition and biological potential of the samples. The sandy habitat, which deprives the plant of nutrients and exposes it to stress, can potentially be a reason for the rich phenolic composition and exceptional biological potential of the samples. Accordingly, the highest proportion of phenolic components (total phenols, flavonoids, chlorogenic acid) and the best reducing power and antioxidant potential was recorded for the sea fennel leaves sampled at the Neretva location, while the samples collected in the central Adriatic (Split and Drašnice locations) had the lowest content of the mentioned compounds and weak antioxidant activity.

Key words: halophyte, sea fennel, phenols, chlorogenic acid, antioxidation activity, liquid chromatography

Thesis contains: 34 pages, 22 pictures, 3 tables, 38 literature references

Origin 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) for 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 listopada 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

Iskreno se zahvaljujem mojoj obitelji na pomoći i potpori kroz sve ove godine školovanja i to što nikad nisu odustali od mene, mojih želja i snova. Također se zahvaljujem svim dragim osobama koje su mi uljepšale ovo najljepše razdoblje života koje smo proveli u beskrajnim druženjima i stvaranju uspomena. Veliko hvala mojoj mentorici Danijeli Skroza koja me uvijek s radošću dočekivala i olakšala svaki moj problem te je rad s njom bilo jedno posebno i lijepo iskustvo koje bih svima preporučio. Hvala također kolegici Maji koja je mukotrpno ispravljala moj diplomski više puta te svakako hvala profesorici Ivani na uputama, podučavanju i na svakom izmamljenom osmijehu zbog njenog izuzetno simpatičnog humora.

ZADATCI DIPLOMSKOG RADA

- 1) Pripraviti metanolne ekstrakte uzoraka lista motra (*Crithmum maritimum* L.) prikupljenog duž Jadranke obale (7 lokacija)
- 2) Spektrofotometrijski odrediti sadržaj ukupnih fenola i flavonoida
- 3) Identificirati i kvantificirati klorogensku kiselinu i njene derivate u uzorcima lišća motra korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti
- 4) Odrediti biološki potencijal listova motra koristeći različite metode određivanja antioksidacijske aktivnosti (ORAC, FRAP i DPPH testove)
- 5) Na osnovu dobivenih rezultata donijeti zaključak o utjecaju okolišnih faktora na kemijski sastav i biološki potencijal motra, te mogućnosti primjene u prehrambenoj industriji

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj okolišnih faktora na kemijski sastav i biološki potencijal samonikle biljke motar (*Crithmum maritimum* L.) te mogućnosti njene primjene u prehrambenoj industriji. Analizirani su metanolni ekstrakti lista motra prikupljeni duž Jadranske obale na 7 različitih lokacija. U eksperimentalnom dijelu rada spektrofotometrijski je u uzorcima određen udio ukupnih fenola i flavonoida, te je korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC; engl. *High-performance liquid chromatography*) identificirana i kvantificirana klorogenska kiselina i njeni derivati. Antioksidacijska aktivnost određena je pomoću 3 različite metode: metodom određivanja snage redukcije željeza (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP), ispitivanjem kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) te metodom redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (engl. 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH). Dobiveni rezultati ukazuju na utjecaj mjesta uzorkovanja na njihov kemijski sastav i biološki potencijal. Pjeskovito stanište, koje biljci uskraćuje hranjive tvari i izlaže je stresu, pokazalo se kao potencijalno važni uzročnik bogatog fenolnog sastava i izuzetnog biološkog potencijala uzoraka. Sukladno tome, najviši udio fenolnih komponenti (ukupni fenoli, flavonoidi, klorogenska kiselina) i najbolja redukcijska snaga i antioksidacijski potencijal zabilježen je u uzorku lista motra uzorkovanom na lokaciji Neretva, dok su uzorci prikupljeni na srednjem Jadranu (Lokacije Split i Drašnice) imali najniži udio navedenih spojeva i slabu antioksidacijsku aktivnost.

Ključne riječi: halofit, motar, fenoli, klorogenska kiselina, antioksidacijska aktivnost, tekućinska kromatografija

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the influence of environmental factors on the chemical composition and biological potential of the wild sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) and the possibilities of its application in the food industry. Methanolic extracts of sea fennel leaves collected along the Adriatic coast at 7 different locations were analyzed. In the experimental part of the work, the content of total phenols and flavonoids was determined spectrophotometrically, while the concentration of chlorogenic acid and its derivatives was identified and quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC). Antioxidant activity was determined using 3 different methods: the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method, the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) test, and the method of reducing 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). The obtained results indicate the influence of the sampling site on the chemical composition and biological potential of the samples. The sandy habitat, which deprives the plant of nutrients and exposes it to stress, can potentially be a reason for the rich phenolic composition and exceptional biological potential of the samples. Accordingly, the highest proportion of phenolic components (total phenols, flavonoids, chlorogenic acid) and the best reducing power and antioxidant potential was recorded for the sea fennel leaves sampled at the Neretva location, while the samples collected in the central Adriatic (Split and Drašnice locations) had the lowest content of the mentioned compounds and weak antioxidant activity.

Key words: halophyte, sea fennel, chlorogenic acid, flavonoids, antioxidation activity, liquid chromatography

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. Halofiti	2
1.2. Motar (<i>Crithmum maritimum</i> L.)	3
1.3. Utjecaj okolišnih faktora na rast i razmnožavanje motra	5
1.3.1. Utjecaj soli.....	5
1.3.2. Utjecaj staništa	6
1.3.3. Utjecaj temperature	7
1.4. Kemijski sastav lišća motra.....	8
1.5. Upotreba lišća motra: pregled znanstvene literature	10
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
2.2. Postupci određivanja ukupnih fenola i flavonoida UV/Vis spektrofotometrijom	13
2.2.1 Postupak određivanja ukupnih fenola.....	14
2.2.2. Postupak Određivanja ukupnih flavonoida.....	15
2.3. Određivanje klorogenske kiseline i njenih derivata HPLC metodom	16
2.4. Postupci određivanja antioksidacijske aktivnosti	18
2.4.1. FRAP metoda	19
2.4.2. DPPH metoda.....	20
2.4.3. ORAC metoda	21
3. REZULTATI I RASPRAVA	22
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola.....	22
3.2. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida.....	24
3.3. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti	27
3.3.1. Rezultati FRAP metode.....	27
3.3.2. Rezultati DPPH metode.....	28
3.3.3. Rezultati ORAC metode.....	29
4. ZAKLJUČCI	29
5. LITERATURA.....	31

UVOD

Motar (*Critmum maritimum* L.) je višegodišnja aromatična biljka koja se od davnina koristi u narodnoj medicini i kulinarstvu. Prema dostupnoj literaturi, motar se ističe visokim biološkim i nutritivnim potencijalom, te značajnim udjelom bioaktivnih spojeva, kao što su polifenoli, karotenoidi, esencijalne masne kiseline, vitamini, minerali i spojevi eteričnih ulja. Zahvaljujući brojnim pozitivnim svojstvima povoljno djeluje na ljudsko zdravlje zbog čega u posljednje vrijeme postaje predmetom sve većeg broja istraživanja. Dokazana su mu brojna biološka svojstva poput, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, protuupalnog i proliferativnog djelovanja, te antiskorbutivna, diuretička i karminativna svojstva. Prema znanstvenim studijama ovaj halofit pokazuje visokovrijedan potencijal u prehrambenoj industriji, kako za fermentirane tako i za nefermentirane proizvode, za biljne infuzije, praškove, umake i začine. Također, ne može se zanemariti ni činjenica da motar, uslijed visokog sadržaja eteričnog ulja i njegovog ugodnog i karakterističnog mirisa, ima i visokovrijedni potencijal u kozmetičkoj industriji. Ipak, mjesta za napredak svakako ima, te se očekuje još mnogo istraživačkih napora, za povećanje njegove primjene u prehrambenoj i neprehrambenoj industriji.

Kao jedan od predstavnika halofitnih biljaka, motar je izuzetno prilagodljiv mediteranskoj klimi, pa je tako otporan na rizike i udare koje donose klimatske promjene. U ovom radu dat će se uvid u kemijski i biološki potencijal lista motra uzorkovanog duž Jadranske obale. Usporedbom rezultata i lokacije uzorkovanja pokušat će se izvesti zaključak o utjecaju okolišnih faktora na rast, kemijski sastav i biološki potencijal motra, te opravdati mogućnost njegove primjene u prehrambene svrhe.

1. OPĆI DIO

1.1. Halofiti

Halofiti ili slanjače su biljke koje su, ovisno o tipu staništa, razvile različite morfološke, fiziološke i biokemijske prilagodbe (izlučivanje vode pomoću žlijezda, odbacivanje dijelova biljke u kojima su natopljene soli ili nakupljene veće količine vode u staničnom soku), kako bi opstale na tlima koja su ponekad visoko zasićena solju. Na temelju njihove tolerancije na sol razlikujemo obigatorne i fakultativne halofite. Da bi opstali, obigatorni halofiti kao što je caklenjača (slika 1) moraju živjeti na zaslanjenim staništima, dok fakultativni halofiti mogu živjeti na slanim staništima, ali im više odgovaraju slatkovodna ili staništa s nižom koncentracijom soli. Jedan od pripadnika fakultativnih halofita je primorski zvjezdan (slika 2). Vrste najotpornije na visoki salinitet u našem dijelu Mediterana su omakalj, vrebina, slizovina ili veliki pelin.^{1, 2, 3}



Slika 1. Caklenjača⁴



Slika 2. Primorski zvjezdan⁵

Halofiti predstavljaju otprilike 1% svih kopnenih biljaka u svijetu, sa gotovo 2500 vrsta. Obično ih nalazimo na obalama diljem svijeta gdje su izloženi abiotskim stresovima, uključujući izloženost promjenjivoj slanosti tla ili sušama. Iako u manjoj mjeri, halofiti koloniziraju obalne pješčane dine te su tu podvrgnuti teškim okolišnim stresovima što dovodi do proizvodnje sekundarnih biljnih metabolita koji posjeduju široki raspon bioaktivnosti. S globalnog stajališta halofiti su se istaknuli kao vrlo zanimljivi usjevi s velikim potencijalom za korištenje u tlima gdje druge vrste ne mogu uspijevati.^{2, 6} Među halofitima, motar je prepoznat kao potencijalni usjev za biosolnu poljoprivredu, što znači da se može koristiti za razvoj održivih agroekosustava koji zahtijevaju manje ulaganja od onih konvencionalnih, te se time pružaju višestruke usluge za rješavanje problema koje uzrokuju sve veće klimatske promjene.²

1.2. Motar (*Crithmum maritimum* L.)

Crithmum maritimum L. (obalni petrovac, motar ili šćulac) jedini je predstavnik roda *Crithmum* (tablica 1) i značajna biljka stjenovitih morskih obala Hrvatske. Motar je rasprostranjen duž Jadranske obale, od Istre do Boke kotorske, a može se naći uz samo more u škrapama, po stijenama, kamenjarima, na grebenima, na pjeskovitim tlima, a katkad i dalje na kamenitim krovovima i starim zidinama. Često raste u većim zajednicama izložen visokoj temperaturi i zrakama sunca, čime se može svrstati i u heliofite.⁷

Tablica 1. Sistematizacija motra⁸

CARSTVO	Plantae
ODJELJAK	Magnoliophyta
RAZRED	Magnoliopsida
RED	Apiales
PORODICA	Apiaceae
ROD	<i>Crithmum</i>
VRSTA	<i>Crithmum maritimum</i> L.

Ova višegodišnja zeljasta biljka ima uspravnu, debelu i glatku stabljiku žućkaste boje koja je u gornjem dijelu uglavnom razgranata dok je pri dnu odvenjela. Rijetko doseže visinu iznad 50 cm. Motar razvija sjajne, mesnate i aromatične listove, slankasta okusa koji se šire radijalno tvoreći rozetu. Listovi su dugi 2-5 cm te ponekad završavaju bodljikavim vrhom. Od davnih vremena se upotrebljavaju za jelo te kao tradicionalni lijek zbog svojih izuzetnih antiskorbutivnih i diuretičkih svojstava, a poznato je i da eliminiraju plinove i sprječavaju nadutost. Listovi sadrže visoku koncentraciju spojeva eteričnih ulja pa svježi ili kratko prokuhani mogu imati izuzetno snažan miris.⁷ Cvatnja se odvija od srpnja do rujna, a nastali cvijet je žućkaste boje, sa jajolikim plodovima koji rastu do 5-6 mm, te su tipični za pripadnike porodica štitarki. Plodovi su bogati lipidima (oko 44% na bazi suhe težine) s oleinskom kiselinom kao glavnom komponentom (78,6% ukupnih masnih kiselina).^{7,9}



Slika 3. Motar (*Crithmum maritimum* L.) u prirodnom staništu¹⁰

Motar proizvodi veliku količinu održivog sjemena koje lako klija. Ipak, unatoč činjenici da ovaj halofit raste u blizini morske vode klijanje sjemena je inhibirano kada salinitet prelazi 50 mM NaCl. Stoga, iako sjemenke motra ostaju održive u uvjetima visoke slanosti, klijanje počinje tek početkom proljeća nakon ispiranja soli koja je posljedica zimskih oborina.^{7, 11}

Bura je također izuzetno bitna za razvoj motra jer donosi dragocjenu posolicu, ali i vedro vrijeme, stoga sol ostaje dulje vremena na biljci. Sol širi pore lišća i tako omogućava prodor vlage i jutarnje rose, dok zimi štiti biljku od smrzavanja, pa nije neobično da se velike količine motra mogu pronaći i na otocima uz Velebitski kanal.¹²

1.3. Utjecaj okolišnih faktora na rast i razmnožavanje motra

Motar, kao i većina ostalih pripadnika halofita može rasti i razmnožavati se u uvjetima u kojima većina biljaka ne bi preživjela. Međutim, nekoliko okolišnih čimbenika ipak može nepovoljno utjecati na njegov rast i razmnožavanje. Kao uvjeti okoliša koji imaju najveći utjecaj na ovu višegodišnju, zeljastu biljku ističu se stanište, temperatura, te ono najvažnije i nezaobilazno, utjecaj soli na rast i razvitak same biljke.

1.3.1. Utjecaj soli

Provedena su razna istraživanja kojima je pokazano i istaknuto da je motar fakultativni halofit umjerene otpornosti na sol. Mehanizmi tolerancije na sol uglavnom se dijele u dvije skupine: u prvom slučaju unos soli u biljku se smanjuje na minimum, dok se u drugom aktiviraju mehanizmi koji sprječavaju postizanje visokih koncentracija soli u citoplazmi. Oba mehanizma su važne adaptivne reakcije koje omogućuju ovim biljnim vrstama da rastu u slanim tlima. Prekomjerna slanost dovodi do oksidativnog stresa unutar biljnih tkiva, s posljedičnim stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive oxygen species*), uključujući superoksidni anion, vodikov peroksid te hidroksil radikal. To može poremetiti cjelovitost staničnih membrana i aktivnosti raznih enzima što na kraju rezultira oštećenjem biljaka. Detoksikaciju i eliminaciju ROS-a provodi složeni antioksidativni sustav, čije su glavne komponente karotenoidi, askorbat i glutation, iako temeljnu ulogu imaju antioksidativni enzimi. Čini se kako sposobnost eliminacije ROS-a i smanjenje njihovih štetnih učinaka na makromolekule predstavlja vitalno važnu karakteristiku za toleranciju na stres od soli.^{9, 13}

U plodu motra natrijev klorid se uglavnom nakuplja u vanjskim ovojnicama, odnosno spužvastoj ovojnici, sekretornoj ovojnici i sloju endokarpa. Ovaj fenomen je od vitalnog eko-fiziološkog značaja za ovaj halofit, budući da čuva vitalnost embrija čak i ukoliko se salinitet poveća. Nakon ispiranja soli zimskim kišama, počinje upijanje vode i može doći do klijanja sjemena što omogućuje motru da se nastani u slanim biotipima.¹⁴

1.3.2. Utjecaj staništa

Meot-Duros i sur. (2009)¹⁵ su u svom nedavnom istraživanju ispitivali antioksidativnu aktivnost biljaka sa različitih staništa, posebno se osvrćući na razliku između pješčanih i onih na liticama morskih obala. Rezultati njihove studije pokazali su da se u motru sa pješčanih brežuljaka akumuliralo više klorogenske kiseline od onih sakupljenih ispod litica (do 9 puta više). To bi se moglo objasniti utjecajem raznih čimbenika okoliša koja se razlikuju kod ova dva tipa staništa. Biljke koje rastu na pješčanim brdima vjerojatno su pod većim stresom od onih ispod litica zbog nedostatka hranjivih tvari. Sukladno tome, pokazalo se da širok raspon okolišnih stresova, uključujući nedostatak bora i dušika, povećava razine klorogenske kiseline u biljkama. Štoviše, biljke u pijesku patile su i od vodenog stresa (zbog prirode pješčanog staništa) i od ionskog stresa, za razliku od biljaka koje žive ispod litica. Stoga je moguće da su biljke koje žive u stresnom okruženju pješčanih brda proizvele više ROS-a, što zauzvrat aktivira sintezu antioksidansa kao što je klorogenska kiselina ili drugih sustava za hvatanje radikala kako bi se spriječila smrt stanica. Aktivnost hvatanja radikala razlikovala se između dviju populacija, što je povezano i sa godišnjim dobima. Ekstrakti lišća imali su jaču aktivnost hvatanja radikala ljeti, kada je prirodno zračenje na svom maksimumu. Štoviše, sposobnost hvatanja DPPH radikala pokazuje dobru korelaciju s razinom fenolnih spojeva, posebno s klorogenskom kiselinom. Tako su obje biljne populacije najveću koncentraciju ukupnih fenola imale ljeti, dok su zimi imale najnižu razinu ukupnih fenola i klorogenske kiseline, te samim time i najslabiju sposobnost hvatanja radikala.

1.3.3. Utjecaj temperature

Iako velika količina soli može negativno utjecati na motar, morska voda bogata solju pruža i određene prednosti. Morska voda nastoji spriječiti ozljede sjemena pri visokoj temperaturi smanjujući, ako ne i u potpunosti potiskujući propadanje spužvaste ovojnice merikarpa. Ovo djelovanje morske vode može biti od ekološke važnosti jer pomaže sjemenkama koje nisu uspjele proklijati u proljeće da se vežu tijekom vrućeg ljetnog razdoblja kako bi mogle proklijati iduće jeseni. Istraživanje znanstvenika provedeno u južnoj Engleskoj vodi do zaključka kako bi motar mogao klijeti tokom cijele godine. Međutim, neuspjeh klijanja zimi može se pripisati visokoj slanosti tla, a ne temperaturi (u radu navode temperaturu od 9°C) koja je dovoljno visoka za klijanje. Također, visoke ljetne temperature sprječavaju njegovo klijanje. Niska klijavost u jesen može se objasniti brzim porastom slanosti tla i padom temperature, dok se visoka klijavost u proljeće može objasniti smanjenjem slanosti tla i povišenjem temperature, kao i povoljnim učinkom dnevne temperature. ¹⁶

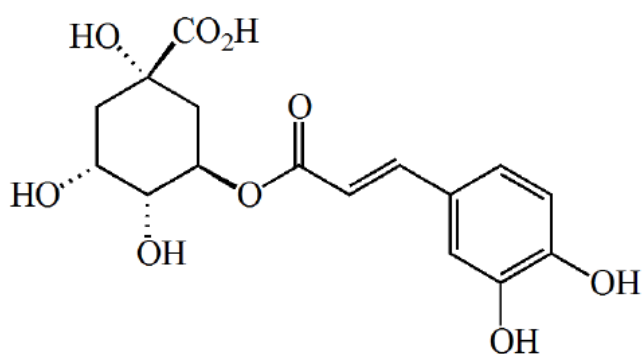


Slika 4. Sjeme motra ¹⁷

1.4. Kemijski sastav lišća motra

Svakim danom sve više istraživanja donosi nova saznanja o blagotvornom djelovanju motra na ljudsko zdravlje, te njegovu primjenu u ljudskoj prehrani. Tome uvelike pridonosi i bogat kemijski sastav lišća, sa izrazito vrijednim bioaktivnim komponentama.

List motra predstavlja bogat izvor hidrofilnih (polifenoli, vitamin C) te lipofilnih (karotenoidi, eterična ulja, masne kiseline) bioaktivnih spojeva. Bioaktivni spojevi su uglavnom sekundarni biljni metaboliti koje biljka proizvodi, akumulira i koristi za privlačenje ili odbijanje štetnika, te pri određenim uvjetima, kao što su nedostatak hranjivih tvari, slanost, napadi štetnika i sl. Sukladno tome, sastav fenola može jako varirati ovisno o tome u kojoj se fazi nalazi biljka, da li je u vegetativnoj fazi (tokom lipnja) ili fazi cvatnje (tokom kolovoza). Fenolni profil lista uglavnom je karakteriziran prisutnošću hidroksicimetnih kiselina, od kojih je najzastupljenija klorogenska kiselina (slika 5) i flavonoida kao što su rutin i kvercetin.¹⁸



Slika 5. Kemijska struktura klorogenske kiseline¹⁹

Dobro je poznato da fenolni spojevi posjeduju snažno antioksidacijsko, protuupalno i antiproliferativno djelovanje na stanice raka. Klorogenska kiselina, kao najzastupljeniji antioksidativni spoj u motru, pokazuje različita autoimuna svojstva za suočavanje sa raznim hipoglikemijskim i hipolipidemijskim uzročnicima bolesti, kao što su reumatoidni artritis i dijabetes.¹⁸

U uvjetima visoke slanosti biljka proizvodi i jako veliku količinu nezasićenih masnih kiselina, posebice oleinske i linoleinske kiseline. Nadalje, što se tiče masnih kiselina, list motra je jako dobar izvor omega-3 i omega-6 masnih kiselina, te bi njegova upotreba kao hrane mogla imati blagotvoran učinak prema koronarnim bolestima srca.^{11, 18}

Motar je također bogat i dijetalnim vlaknima (3-6,2 g/100g biljke). U pravilu visok unos dijetalnih vlakana negativno utječe na apsorpciju ugljikohidrata pa dovodi do snižavanja razine glukoze i inzulina u krvi. Međutim, prekomjeren unos dijetalnih vlakana također može smanjiti asimilaciju minerala i pogodovati razvijanju gastrointestinalnih bolesti zbog fermentacije i stvaranja plinova.¹⁸

Što se tiče minerala, natrij je najzastupljeniji element u lišću motra. U halofitima, a tako i u motru, natrij se obično nakuplja u biljnim tkivima kao izravna posljedica saliniteta tla. Natrij je esencijalni nutrijent za ljudska bića, međutim prekomjeren unos ovog elementa povezan je sa povećanjem krvnog tlaka, a time i s povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti.

11

U uzorcima divljeg motra određen je niži sadržaj vode, kao i veći sadržaj ukupnih lipida i proteina, u usporedbi s kultiviranim motrom. Ispitivanjem sadržaja kationa, Bianco i sur. (2018)²⁰ su dokazali da je divlji motar ima višu količinu natrija i kalcija, a nižu količinu magnezija i kalija u odnosu na uzgojeni motar.²⁰

Tablica 2. Ionski sastav divljeg i kultiviranog motra²⁰

Tip motra	Na⁺ (mg/100g)	K⁺ (mg/100g)	Mg²⁺ (mg/100g)	Ca²⁺ (mg/100g)
Divlji	291	335	28	310
Kultivirani	168	588	41	250

Listovi motra također sadrže značajnu količinu drugih spojeva kao što su askorbinska kiselina, tanini i flavonoidi. Houta i sur. (2011.)²¹ odredili su sadržaj ovih spojeva u različitim organima biljke. Uspoređujući nadzemni dio biljke, i to isključivo list i cvijet motra, listovi su imali veću količinu ovih spojeva, dok je najveća razlika bila u koncentraciji tanina; u listovima je određena vrijednost od 1,38 mg CE/g, a u cvjetovima od 0,43 mg CE/g.

21

1.5. Upotreba lišća motra: pregled znanstvene literature

U prošlosti se motar koristio u narodnoj medicini za prevenciju skorbuta, a danas u nekim mediteranskim regijama i dalje uživa dobar glas kao tradicionalni lijek. Primjerice, u Španjolskoj se ukiseljeno lišće jede kao digestiv, u sjevernim krajevima uvarak od motra koristi se za njegu urogenitalnog trakta i jetre, dok se u Italiji isti uvarak smatra korisnim lijekom za liječenje hripavca i prehlade. Nadalje, za stanovnike središnje Italije, sok od lišća motra tradicionalno se koristi zbog svog diuretičkog i karminativnog učinka, dok se infuzija od ploda koristi radi blagotvornog učinka na želučani i probavni sustav.¹¹

U mnogim zemljama svježi listovi motra koriste se za pripremu juha, umaka i salata, ili se prerađuju poput kapara u octu. Konzervirani motar upisan je u „Popis tradicionalnih poljoprivredno-prehrambenih proizvoda“ talijanskog Ministarstva poljoprivrede. Također, Britansko otočje posjeduje tradicionalno jelo koje se priprema korištenjem lišća motra pomiješanog sa ukiseljenim krastavcima i kaparima.¹¹

Većina komercijalno dostupnih konzervi i umaka (uključujući i one slične pestu) proizvode se u industrijskim razmjerima te se često pasteriziraju. Takav toplinski proces, koji jamči sigurnost konačnog proizvoda, značajno utječe na sadržaj termo-tolerantnih hranjivih tvari poput vitamina C. Sukladno tome, posljednjih godina su istraživački naponi usmjereni na valorizaciju ove prehrambene kulture primjenom blagih tehnologija prerade, kao što su fermentacija, blaga pasterizacija u spremniku i sušenje, koje više poštuju biološki i nutritivni potencijal motra.¹⁸

Maoloni i sur. (2022) su proveli istraživanje gdje je motar predložen kao idealan sastojak za proizvodnju industrijskih prototipova dva nova zelena umaka. U toj studiji, provedeni su testovi roka trajnosti, te mikrobiološke stabilnosti dvaju umaka stabiliziranih toplinskim tretmanima koji se obično primjenjuju u industrijskim razmjerima za inaktivaciju vegetativnih stanica mikroorganizama i patogena kvarenja. Dobiveni rezultati pokazali su stabilnost oba umaka tijekom jednog mjeseca skladištenja. Štoviše, testovi mikrobne stabilnosti provedeni na listu prema *Staphylococcus aureus* otkrili su da su oba blaga toplinska tretmana uspjela ubiti vegetativne stanice ovog patogena. Osim toga, uočena je inhibicija rasta *Bacillus cereus* tijekom skladištenja pri 37 °C.¹⁸



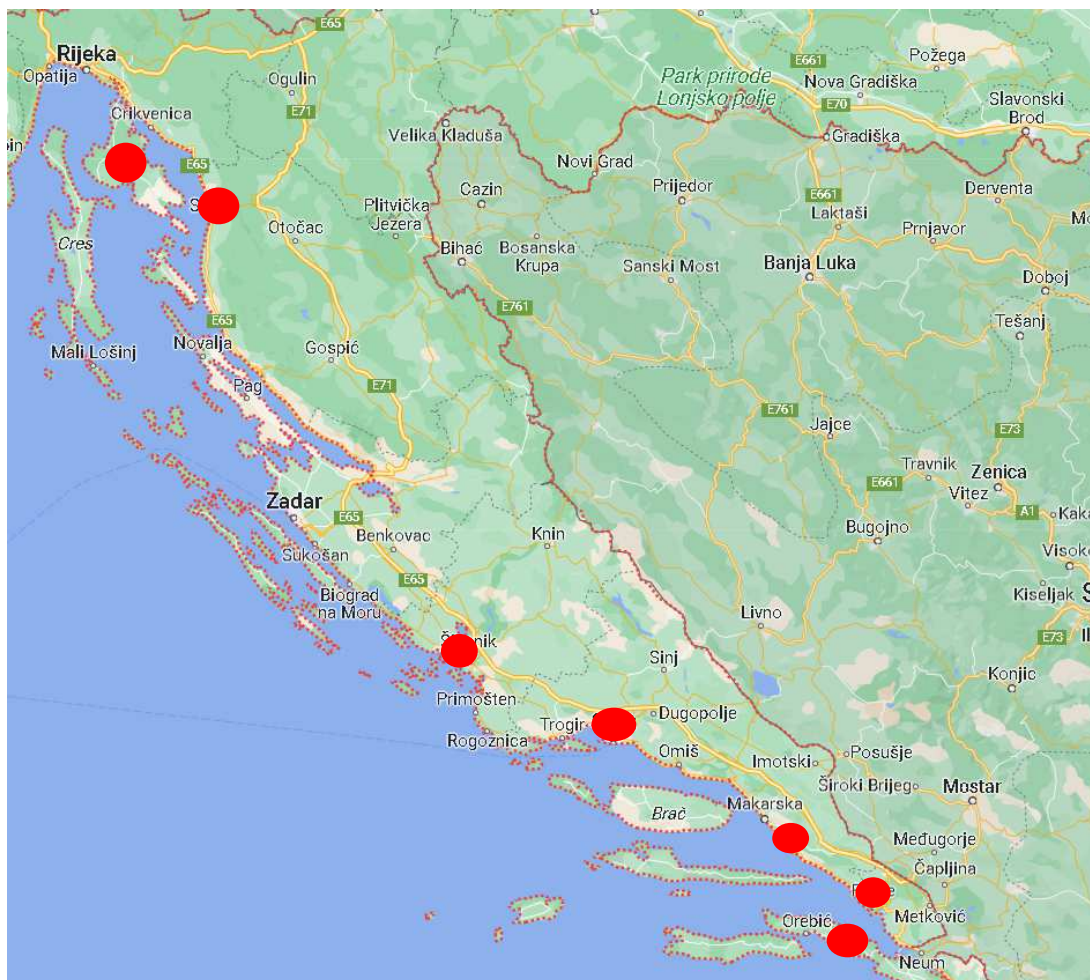
Slika 6. Stabilni umaci spravljeni od motra ¹⁸

Nadalje, još je jedno istraživanje dovelo do novih spoznaja gdje je motar prepoznat kao obećavajući sastojak za formuliranje inovativne ne-mliječne probiotičke hrane. Maoloni i sur. (2023)¹⁸ su procjenjivali preživljavanje i stabilnost komercijalno dostupnih formulacija ljudskih probiotika SYN BIO i *Lactiplantibacillus plantarum* IMC 509 tijekom produljenog skladištenja konzerviranog motra u uvjetima hlađenja. Ukratko, blanširani izbojci motra namakani su u salamuri (koja sadrži 7% NaCl-a; 1% fruktoze umjetno zakiseljene s 0,5% mliječne kiseline), pasterizirani pri 95 °C tijekom 5 minuta u kipućoj vodi, ohlađeni u ledenoj vodi, te čuvani 4 tjedna na sobnoj temperaturi (18 °C) kako bi se pH uravnotežio. Broj mezofilnih bakterija mliječne kiseline koji je bio sposoban za život bio je visoko iznad preporučenog praga za blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje. Autori su ovo otkriće potkrijepili sposobnošću testiranih probiotičkih sojeva da se prilagode prijanjanjem na tkivo motra, te navikavanjem na ovu osebujnu okolinu. Stoga je motar naveden kao dobar supstrat za formuliranje novih ne-mliječnih probiotika. ¹⁸

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Priprema ekstrakata

Uzorci biljnog materijala, listovi motra (*Crithmum maritimum* L.) prikupljeni su duž obale Jadrana sa različitih lokacija - otoka, poluotoka i obalnog područja. Uzorkovanje je obavljeno na sjevernom Jadranu (otok Krk i Senj), srednjem Jadranu (Jadrija, Split i Drašnice), te na južnom Jadranu (ušće rijeke Neretve i poluotoku Pelješcu). Svi uzorci listova motra ubrani su na udaljenosti manjoj od 10 m od mora. Tlo na mjestima uzorkovanja sa područja Krka, Jadrije, Drašnica te Pelješca je litički leptosol te nije prisutna druga vegetacija. U Senju je osim motra na tlu rasla niska trava. Na području Splita uz motar je bila prisutna i druga halofitna biljka, primorski oman (*Inula crithmoides*), dok je uzorak iz Neretve prikupljen sa pjeskovitog tla te su osim motra prisutne ostale biljne vrste otporne na slanu vodu.

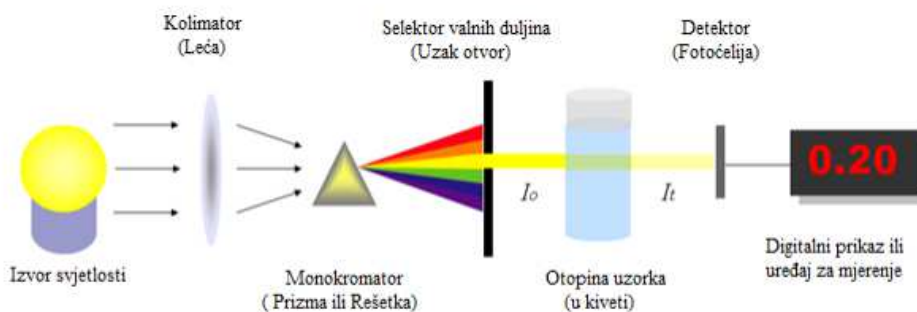


Slika 7. Prikaz lokaliteta uzorkovanja lišća motra ²²

Uzorci lista osušeni su postupkom liofilizacije nakon čega su homogenizirani u mlincu. Ekstrakcija je provedena u plastičnoj epruveti u kojoj je odvagano 200 g uzorka i dodano 8 mL 80%-tnog metanola. Tako pripremljeni uzorci stavljeni su u ultrazvučnu kupelj (Sonorex, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Njemačka) tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega su uzorci prebačeni na miješanje u trajanju od 3 sata u Orbital Shaker-Incubator ES-20 (SIA Biosan Riga, Latvija). i ostavljeni preko noći u hladnjaku. Nakon 24 sata filtrirani su pomoću filtera CHROMAFIL Xtra MV 45/25 i šprice BD Discardit II Syringe volumena 5 mL. Svi su uzorci pripremljeni u duplikatu.

2.2. Postupci određivanja ukupnih fenola i flavonoida UV/Vis spektrofotometrijom

Za određivanje ukupnih fenola i flavonoida najčešće se koristi UV/Vis spektrofotometrijske metode kojima se mjeri apsorbancija. Kada kroz otopinu ispitivane molekule prolazi svjetlo, dio se propušta, a dio apsorbira od strane molekule. Spektrofotometar tada mjeri propušteno ili neapsorbirano zračenje, odnosno mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak, te ga uspoređuje sa ulaznim svjetlom. Time je omogućeno mjerenje apsorbancije, transmitacije (izražene u %) te određivanje koncentracije analita u ispitivanim uzorcima. Mjerenja se vrše na sobnoj temperaturi, a uzorak mora biti pripremljen u obliku otopine. Uzorak se u uređaj stavlja u staklenoj ili plastičnoj kiveti za mjerenja u vidljivom dijelu spektra, ili u kvarcnoj kiveti za mjerenje u UV dijelu spektra.^{23, 24}



Slika 8. Shematski prikaz osnovnih dijelovi UV/Vis spektrofotometra ²³

2.2.1 Postupak određivanja ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola korištena je Folin-Ciocalteu metoda. Zasniva se na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, pri čemu dobivamo smjesu reduciranih plavih oksida. Dobiveno plavo obojenje ima maksimalnu apsorpciju pri 765 nm i direktno je proporcionalno ukupnoj količini izvorno prisutnih fenolnih spojeva. Ova metoda se najčešće koristi jer je brza, jednostavna i jeftina.²⁵

Postupak određivanja:

U kivete se doda 25 μ L biljnog uzorka te 1,975 mL destilirane vode i 125 μ L Folin-Ciocalteu reagensa. Smjesa se pomiješa i nakon 1 minute doda 375 μ L otopine Na_2CO_3 ($w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 20\%$) i smjesa ostavi stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Za svaki uzorak napravljena su tri ponavljanja. Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina galne ($c(\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}) = 100 \text{ mg/L}$) i klorogenske kiseline ($c(\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9) = 1000 \text{ mg/L}$). Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne, odnosno klorogenske kiseline po L ekstrakta (mg GAE/L, odnosno mg CGA/L).



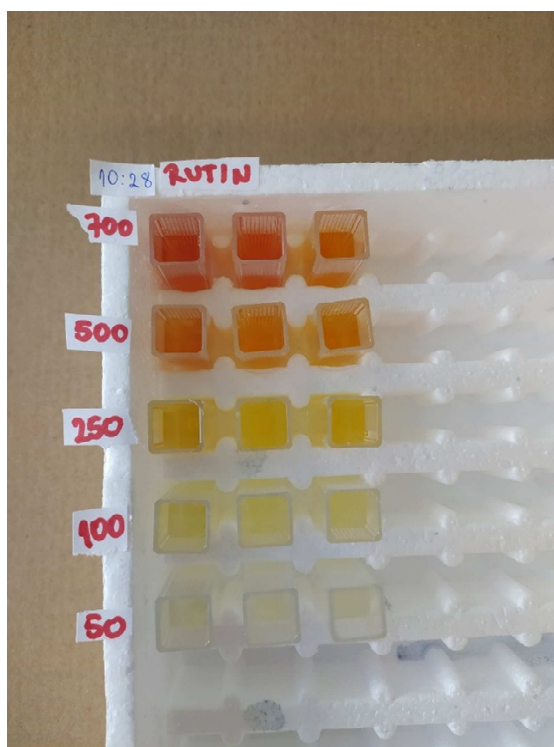
Slika 9. UV/Vis spektrofotometar UV-1900i (Shimadzu, Kyoto, Japan)²⁶

2.2.2. Postupak Određivanja ukupnih flavonoida

Metoda određivanja ukupnih flavonoida je također kolorimetrijska i provodi se dodatkom aluminijeva klorida sa ili bez natrijevog nitrita. Koristeći i natrijev nitrit nastaje žuto obojenje čiji se intenzitet mjeri pri 510 nm.²⁷

Postupak određivanja:

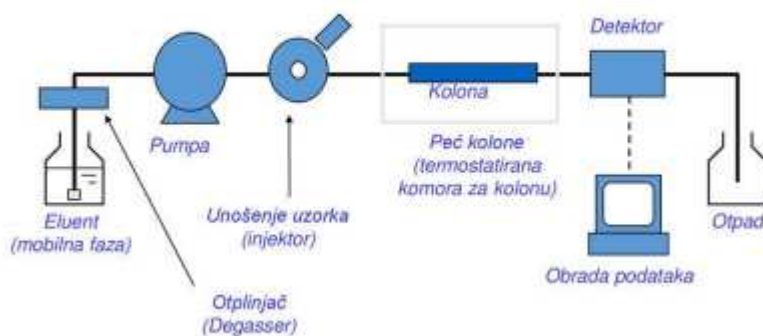
U plastične kivete pipetira se po 0,25 mL uzorka, 1,25 mL vode i 0,075 mL otopine NaNO_2 (w (NaNO_2) = 5%). Potom se nakon 5 minuta doda 0,155 mL otopine AlCl_3 (w (AlCl_3) = 10%) i pričeka 6 minuta. Zatim se doda 0,5 mL NaOH (c (NaOH) = 1 mol/L) i 0,775 mL vode. Absorbancija se mjerila pri valnoj duljini od 510 nm. Za svaki uzorak urađena su po 3 ponavljanja. Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina rutina u rasponu koncentracija 50-1000 mg/L.



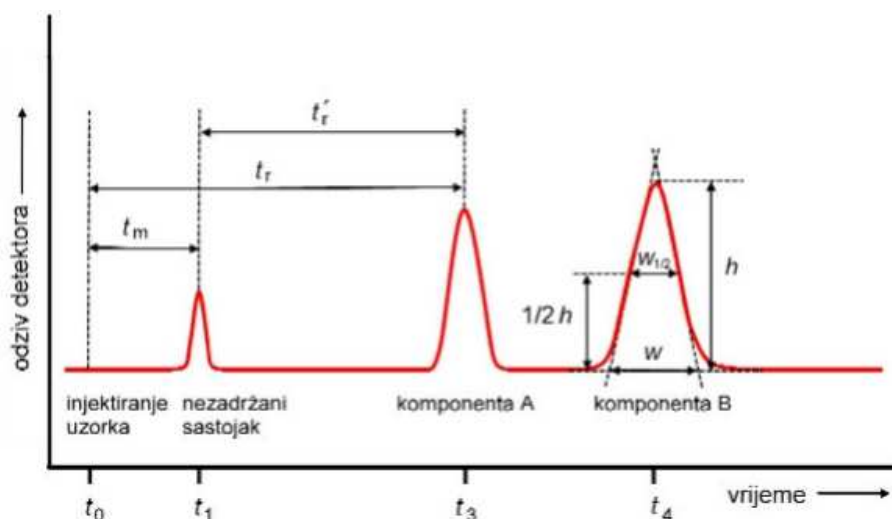
Slika 10. Metoda određivanja apsorbancije rutina (vlastita fotografija)

2.3. Određivanje klorogenske kiseline i njenih derivata HPLC metodom

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je analitička metoda koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na temelju interakcija tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Dijeli se na kromatografiju na normalnoj i obrnutoj fazi. Uređaj za tekućinsku kromatografiju sastoji se od rezervoara mobilne faze, pumpe, injektora, kolone (stupca), detektora i pisaača (slika 11). Uzorak se injektorom uvodi u sustav, te mobilnom fazom prolazi kroz kolonu, u kojoj dolazi do odjeljivanja komponenti na temelju njihovog različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Odvojeni uzorci se zatim eluiraju s kolone i idu do detektora koji dobivene rezultate pretvara u prepoznatljiv signal za računalo. Poseban računalni program stvara jasan računalni zapis, kromatogram, koji prikazuje ovisnost koncentracije o volumenu ili vremenu elucije (slika 12). Najčešće korišteni detektori su UV/Vis s nizom dioda (engl. *Diode array detector*, DAD), fluorescencijski detektor (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektor (engl. *electrochemical detector*, ED), detektor indeksa loma (engl. *refractive index detector*, RID), detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku (engl. *evaporative light-scattering detector*, ELSD) i detektor masene spektrometrije (engl. *mass spectrometry detector*, MSD).²⁸



Slika 11. Shematski prikaz osnovnih dijelova tekućinske kromatografije ²⁹



Slika 12. Shematski prikaz kromatograma uzorka ³⁰

Svi korišteni standardi (neoklorogenska kiselina, klorogenska kiselina i kriptoklorogenska kiselina) bili su od proizvođača Sigma Aldricha (St. Louis, MO, SAD); acetonitril i metanol od VWR (Randor, PA, SAD), 85%-tna *orto*-fosforna kiselina od Honeywell Fluka (Charlotte, NC, SAD). Reagensi su HPLC kvalitete, a ultra čista voda dobivena je od Millipore sustava.

Za fenole, standardne krivulje su konstruirane u šest točaka razrjeđivanjem radne standardne otopine uporabom metanola/vode (80:20, v/v). Kalibracijske krivulje za neoklorogensku i kriptoklorogensku kiselinu postavljene su u rasponu koncentracija 0,1-50 $\mu\text{g/mL}$, a za klorogensku 5-500 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracije uzoraka su izražene kao mg ispitivanog spoja po gramu suhog ekstrakta (mg/g).

Fenolni spojevi iz ekstrakta lista kvantificirani su visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom u kombinaciji sa UV/Vis detektorom (Shimadzu Nexera LC-40, Shimadzu, Kyoto, Japan) prema postupku koji su opisali Politeo i sur. (2023), uz male modifikacije. Ukratko, odvajanje i kvantifikacija uzoraka provedena je korištenjem stupca reverzne faze C18 dimenzija 250mm \times 4,6 mm \times 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 (ultra čista voda/ 85%-tna *orto*-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, izokratno 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 minuta, uključujući

vrijeme za ponovno ekvilibriranje. U HPLC sustav je ubrizgano po 20 μ L uzorka, u duplikatu.

Spojevi su praćeni na 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 spojeva iz ispitivanih uzoraka izražene su u mg spoja po L ekstrakta (mg/L).



Slika 13. Tekućinski kromatogram³¹

2.4. Postupci određivanja antioksidacijske aktivnosti

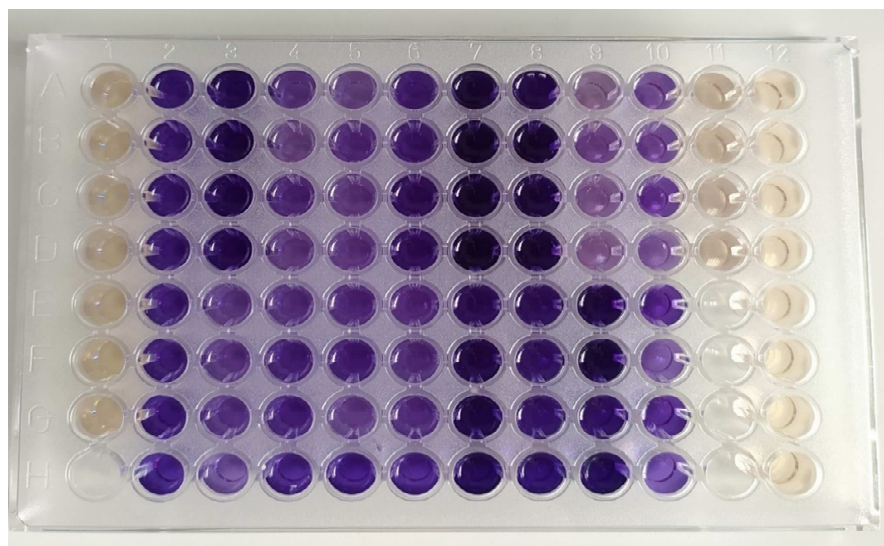
Testove antioksidacijske aktivnosti dijelimo u dvije grupe: one zasnovane na prijenosu vodika (HAT) i testove prijenosa jednog elektrona (ET). Kombinirani HAT i ET testovi se mogu odvijati istovremeno, ali će u tom slučaju dominantni mehanizam ovisiti o strukturi i svojstvima antioksidanta, njegovom koeficijentu razdvajanja, topljivosti te o sustavu otapala.³²

2.4.1. FRAP metoda

FRAP metodom mjeri se antioksidacijski potencijal uzorka, a reakcija se očituje redukcijom Fe^{3+} iona koji je žute boje u Fe^{2+} oblik koji je plave boje što ovisi i o koncentraciji dodanog antioksidanta. Reakcija se odvija pri pH 3,6 dok se samo mjerenje apsorbancije vrši pri 592 nm.³³

Postupak određivanja:

FRAP reagens je napravljen miješanjem 25 mL acetatnog pufera ($c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ mmol/L}$, 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). U otvore mikrotitarske pločice doda se 300 μL svježe pripremljene otopine FRAP reagensa te se očita apsorbancija pri 592 nm. Zatim se doda 10 μL uzroka te se nakon 4 minute prati promjena apsorbancije. Promjena apsorbancije računa se kao razlika između konačne vrijednosti nakon 4 minute i apsorbancije FRAP reagensa prije dodatka samog uzroka. Dobivene vrijednosti se usporede s vrijednostima dobivenih za otopinu standarda, a to je u našem slučaju Trolox. Analiza je odrađena u 4 ponavljanja, a rezultati su izraženi u μM Trolox ekvivalenata (TE).



Slika 14. Izgled mikrotitarske pločice nakon dodatka antioksidansa (vlastita fotografija)

2.4.2. DPPH metoda

DPPH metoda se koristi kada se želi procijeniti antioksidacijska aktivnost spojeva prisutnih u ekstraktima ili drugim biološki važnim izvorima, a temelji se na sposobnosti uklanjanja radikala djelovanjem antioksidanta. DPPH radikal je stabilan zbog delokalizacije elektrona te ne dimerizira kao ostali radikali, a također uzrokuje i ljubičasto obojenje. Apsorpcija se mjeri pri 517 nm, a reakcijom DPPH radikala i antioksidansa dolazi do redukcije koja dovodi do gubitka ljubičaste boje pri čemu nastaje blijedo žuto obojenje.³³

Postupak određivanja:

U otvore mikrotitarske pločice otpipetira se 290 μ L otopine DPPH i izmjeri se apsorbancija na 517 nm. Zatim se doda 10 μ L uzorka te se nakon sat vremena opet izmjeri apsorbancija. Analiza se provodi u 4 ponavljanja, a rezultati se prikazuju kao % inhibicije DPPH radikala koji se računa prema izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \left(\frac{AC(0) - AA(t)}{AC(0)} \right) \times 100$$

gdje je:

AC(O) apsorbancija DPPH radikala pri t = 0

AA(t) apsorbancija nakon vremena t (1h)



Slika 15. Mikrotitarski čitač absorbancije³⁴

2.4.3. ORAC metoda

ORAC (kapacitet apsorpcije kisikovih radikala) metoda je jedna od najkorištenijih metoda za mjerenje antioksidacijskog potencijala. Mjeri se inhibicija AAPH peroksil radikala, gdje je izvor radikala, najčešće azo-spoj 2,2'-azobis(2-amidino-proionamid)-dihidroklorid (AAPH) koji se raspada stalnom brzinom pri 37 °C tvoreći peroksil radikale. Kod ove metode se mjeri slabljenje fluorescencije pri čemu antioksidansi usporavaju reakcije prijenosom atoma vodika i inhibiraju razgradnju fluoresceinskog signala. Kao kontrola se koristi Trolox otopina.³⁵

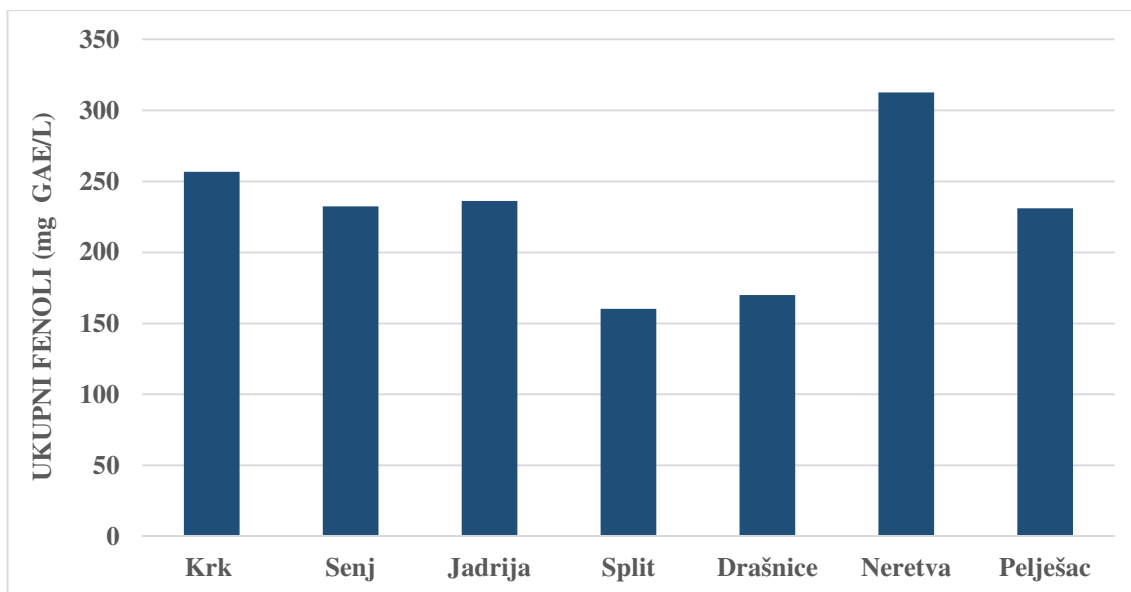
Postupak određivanja:

U otvore mikrotitarske pločice doda se 150 µL fluoresceina ($c = 0,08 \mu\text{M}$) i 25 µL uzorka ($c = 0,075\text{M}$ fosfatnog pufera za slijepu probu / otopine Troloxa za izradu baždarne krivulje). Mjerenje se provodi u spektrofotometru pri valnim duljinama od 485 nm i 520 nm. Pripremljene otopine se prvo termostatiraju 30 minuta na 37 °C te se nakon toga doda 25 µL AAPH ($c = 0,15 \text{ mol/L}$) i svake minute se mjeri promjena intenziteta fluorescencije u razdoblju od 80 minuta. Analiza je provedena na uzorcima razrjeđenjima 1000 puta i rezultati su izraženi u µM Trolox ekvivalenata. Metoda je rađena na Multimode Reader BioTek Synergy HTX (Agilent, Kalifornija, SAD).

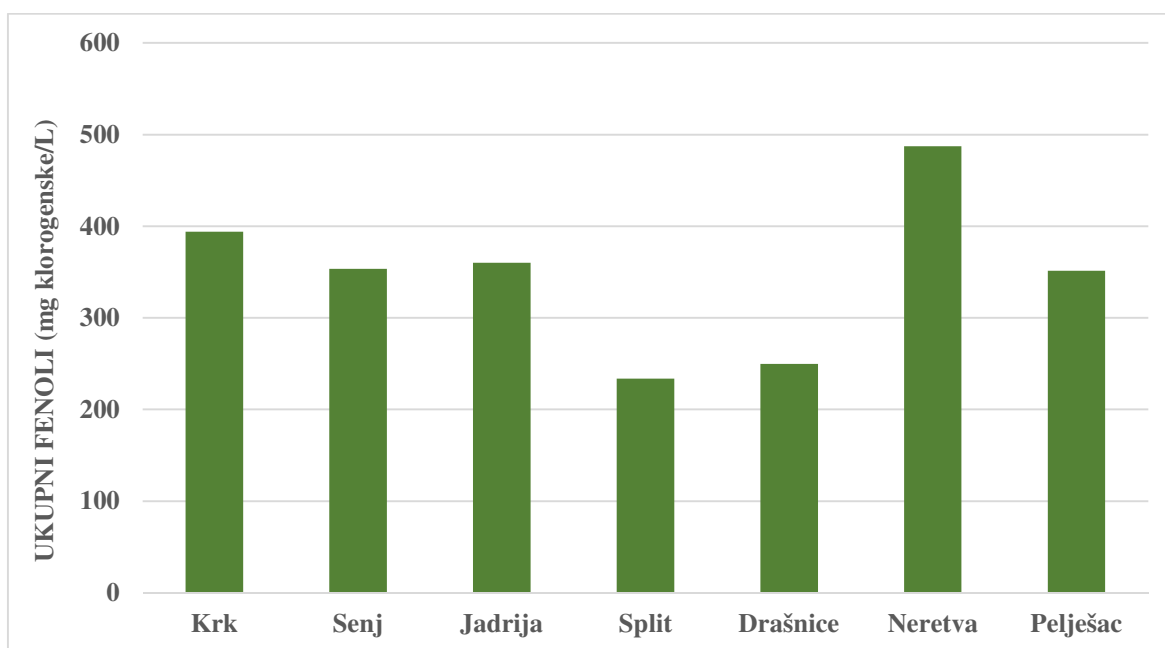
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Ukupni fenoli određivani Folin-Ciocalteu metodom prikazani su na slikama 16 i 17. Uzorci lišća motra sakupljeni na području Splitsko-dalmatinske županije, na lokacijama Split i Drašnice, pokazali su znatno niže vrijednosti ukupnih fenola u odnosu na ostale ispitivane uzorke. Uzorci sa lokacija Krk, Senj, Jadrija i Pelješac pokazali su približno iste rezultate, dok je znatno visok udio fenola potvrđen u ekstraktima lista motra prikupljenog sa područja rijeke Neretve (312,67 mg GAE/L). Kako je već prethodno navedeno, motar nakuplja veće količine fenola, kada raste na pješčanim staništima, pa to može biti i jedan od objašnjenja najvećeg udjela fenola. Uzorak iz Neretve je prikupljen nedaleko od mjesta ulijevanja rijeke u more, odnosno u samoj delti rijeke. Riječne delte formiraju se kao rezultat akumulacije sedimenta na ušću rijeke, odnosno, delta nastaje taloženjem sedimenta (šljunak, pijesak, glina) kada rijeka donosi više materijala nego što morski procesi to mogu odnijeti dalje od ušća.³⁶ Možemo pretpostaviti da su razlog niskim vrijednostima sadržaja fenola u uzroku iz Splita prisustvo drugih biljnih vrsta koje rastu na mjestu uzorkovanja motra, kao što je primorski oman (*Inula crithmoides* L.) budući da je i ova biljka također halofit te mu pogoduje određena količina soli koju i upija. Stoga je za očekivati da motar neće biti izložen visokim koncentracijama soli kao ostali uzorci koji rastu na mjestima gdje nije zabilježena nikakva druga vegetacija.



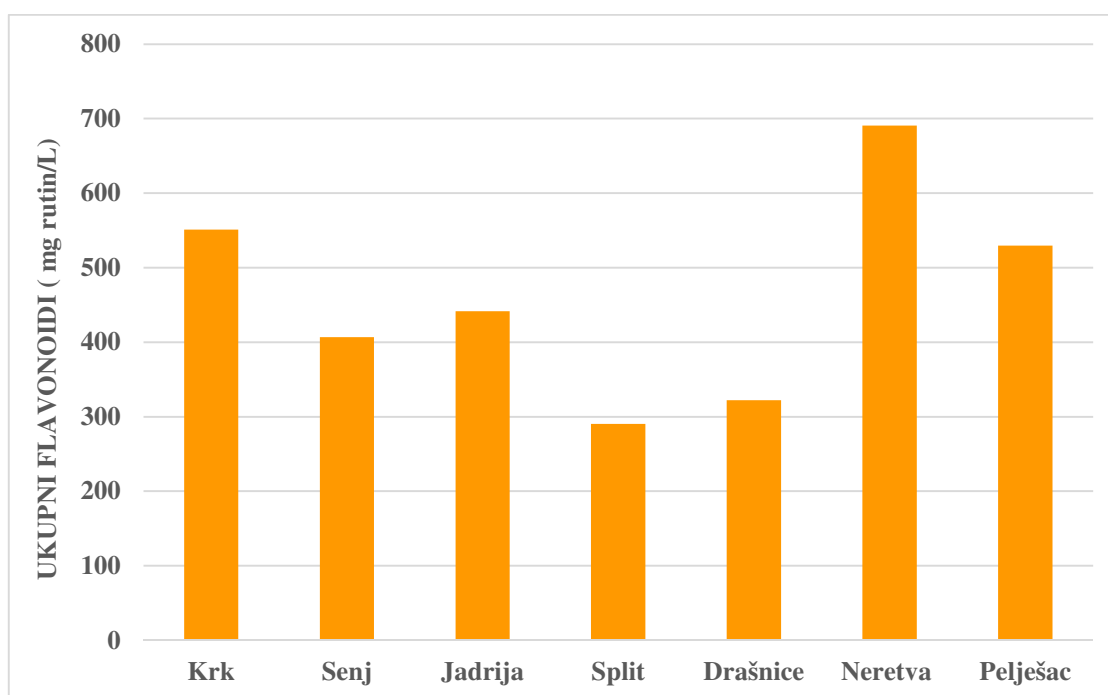
Slika 16. Usporedni prikaz sadržaja ukupnih fenola u lišću motra s različitih lokacija



Slika 17. Usporedni prikaz sadržaja ukupnih fenola u lišću motra s različitih lokacija

3.2. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida

Rezultati sadržaja ukupnih flavonoida svih ispitivanih uzoraka prikazani su na slici 18 te su izražene u mg ekvivalenta rutina po litri ekstrakta (mg RU/L). Kao i kod sadržaja ukupnih fenola, najniži udio flavonoida pronađen je u uzorcima s lokacije Split što možemo prepisati činjenici prisustva drugih halofitnih vrsta na mjestu uzorkovanja. Najviši udio flavonoida prisutan je u uzorcima lista motra s lokacije Neretva. Osim uzoraka prikupljenim na lokaciji Split (290,27 mg RU/L), i uzorci s lokacije Drašnice (322,27 mg RU/L) su imali nisku količinu ukupnih flavonoida. Ekstrakt motra s lokacije Neretva imao je najviši udio flavonoida u iznosu od 690,93 mg RU/L, a slijedili su ga ekstrakti s lokacija Krk (550,93 mg RU/L) i Pelješac (529,60 mg RU/L). I u sadržaju flavonoida uočavamo niske vrijednosti za uzorke s lokacija srednjeg Jadrana u odnosu na uzorke s lokacija južnog Jadrana (Neretva i Pelješac). Također, kako smo spomenuli i kod ukupnih fenola, slično vrijedi i za flavonoide.



Slika 18. Prikaz vrijednosti ukupnih flavonoida u listu motra

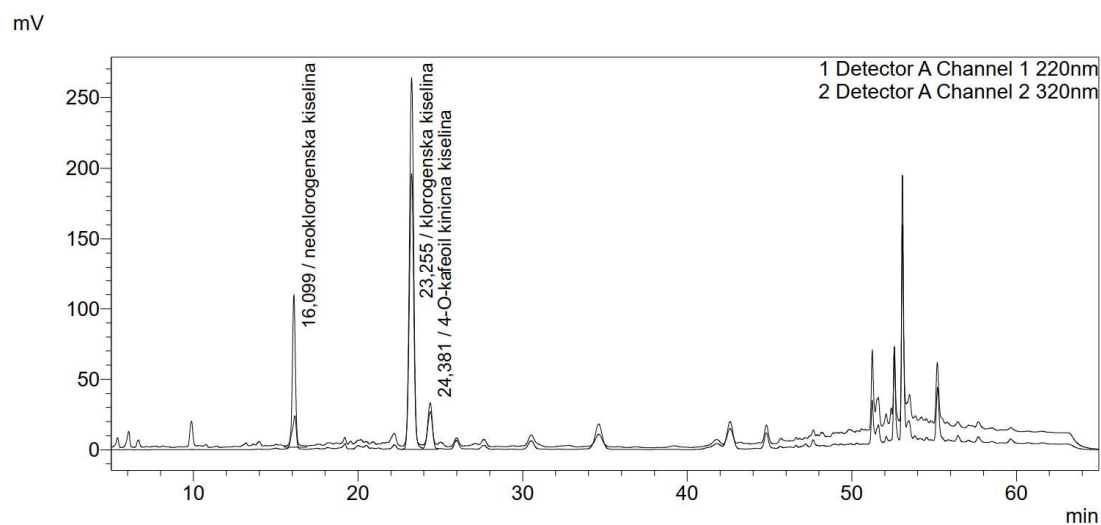
3.3. Rezultati HPLC metode

U ekstraktima lišća motra kvantificirani su najzastupljeniji fenolni spojevi, odnosno fenolne kiseline, klorogenska i njeni derivati, koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, te su dobiveni rezultati prikazani u tablici 3. Klorogenska kiselina se pokazala najdominantnijom od navedene tri fenolne kiseline u svim analiziranim uzorcima. Najviša koncentracija klorogenske kiseline (154,653 mg/L) određena je u ekstraktu lista motra s lokacije Neretva, dok je najniža koncentracija klorogenske kiseline određena u uzorku iz Drašnica (24,65 mg/L). U usporedbi s drugim uzorcima, ekstrakti lista motra s lokacije Neretva imao je od 1,5-6 puta viši udio klorogenske kiseline. Također zanimljivo je istaknuti da je udio klorogenske kiseline bio u rasponu od 73-86%, i to u uzorcima s lokacije Neretva je bila najzastupljenija dok je najniži udio prisutan u uzorcima s lokacije Split. Najviše vrijednosti neoklorogenske kiseline izmjerene su u ekstraktu lišća s lokacije Pelješac (9,71 mg/L) dok je najviša koncentracija kriptoklorogenske kiseline također određena u uzorku uzorkovanom na lokaciji Neretva (15,93 mg/L).

Dobivene rezultate možemo usporediti i povezati s istraživanjem koje su proveli Meot-Duros i sur. (2019) ¹⁵ gdje je dokazano da biljke pjeskovitih staništa razvijaju veće količine antioksidanata kao što je klorogenska kiselina, u odnosu na one koje rastu na liticama uz more.

Tablica 3. Koncentracije (mg/L) klorogenske kiseline i njenih derivata u ekstraktima lišća

Fenolni spoj (mg/L)	Krk	Senj	Jadrija	Split	Drašnice	Neretva	Pelješac
Klorogenska kiselina	81,15	48,38	43,93	27,04	24,65	154,65	97,08
Neoklorogenska kiselina	7,47	4,26	3,85	4,27	2,63	9,54	9,71
Kriptoklorogenska kiselina	10,43	6,73	6,05	5,94	4,35	15,93	13,67



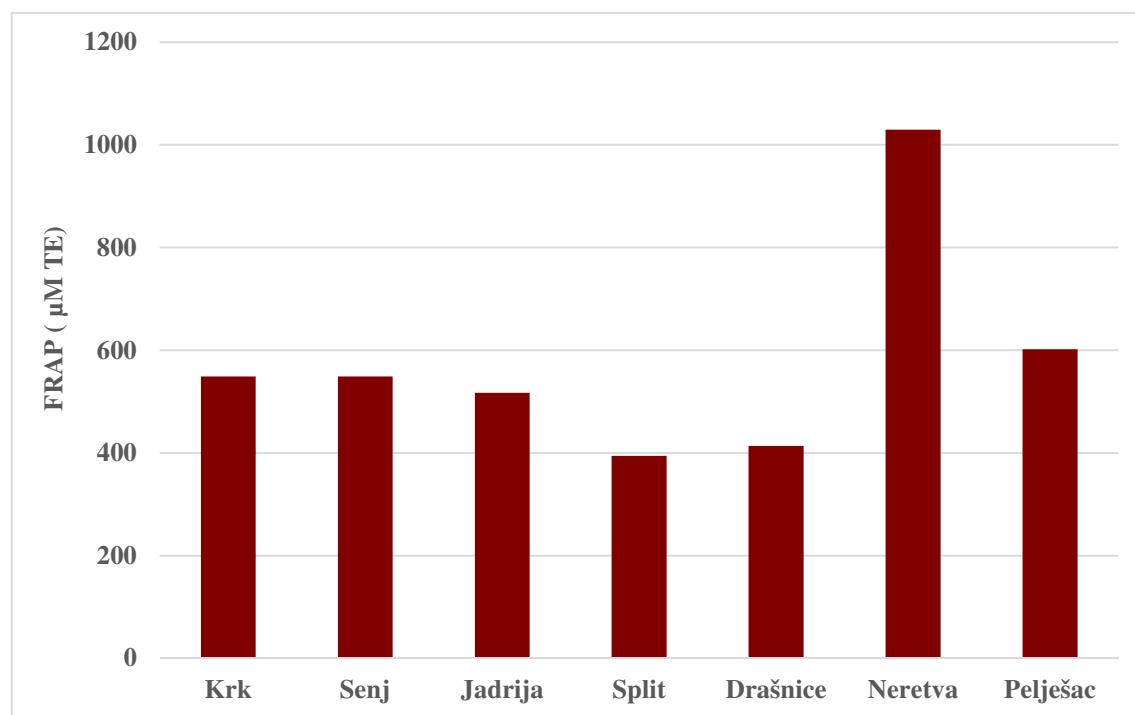
Slika 19. Ukupni ionski kromatogram ekstrakta lista iz Korčule analiziranog HPLC tehnikom, s karakterističnim retencijskim vremenima ($RT_{\text{neoklorogenska kiselina}} = 16.099$,

$RT_{\text{klorogenska kiselina}} = 23.255$, $RT_{\text{4-kafeoil kinična kiselina}} = 24.381$ min)

3.3. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

3.3.1. Rezultati FRAP metode

Na slici 20. prikazani su rezultati redukcijske sposobnosti ekstrakata motra određeni FRAP metodom. Rezultati analize pokazuju izuzetno dobru aktivnost ekstrakata s lokacije Neretva u usporedbi s drugim lokalitetima. Uzorci s lokacije Neretva pokazali su više od dvostruko bolju redukcijsku sposobnost (1029,49 $\mu\text{M TE}$) u odnosu na ekstrakte s lokacije Krk (549,1 $\mu\text{M TE}$), Senj (548,72 $\mu\text{M TE}$), Jadrija (517,05 $\mu\text{M TE}$), Pelješac (601,67 $\mu\text{M TE}$), Split (394,29 $\mu\text{M TE}$) ili Drašnice (413,72 $\mu\text{M TE}$). Navedene razlike u aktivnosti su jako dosta u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola i ukupnih flavonoida.

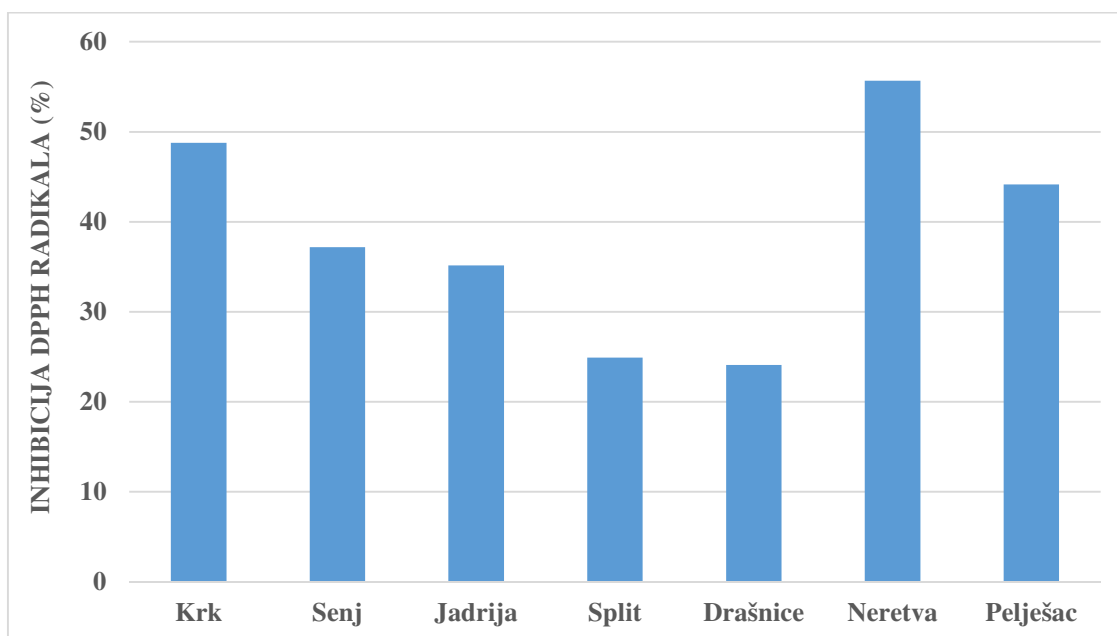


Slika 20. Prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti korištenjem FRAP metode u listovima motra prikupljenih duž obale Jadrana

U istraživanju Generalić Mekinić i sur. (2018) također je praćena antioksidacijska aktivnost te su ekstrakti motra pokazali redukcijsku sposobnost od 19,9 mM TE. Uspoređujući s rezultatima u ovom radu vidimo da su vrijednosti niže odnosno 0,3-1 mM TE.³⁷

3.3.2. Rezultati DPPH metode

Na slici 21 prikazani su rezultati oksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzoraka dobiveni korištenjem DPPH metode. Iz grafičkog prikaza može se uočiti da je samo uzorak s lokacije Neretva postigao više od 50% inhibicije DPPH radikala. Kao i u prethodnim metodama, uzorci s lokacije srednjeg Jadrana (Jadrija, Split i Drašnice) pokazali su najslabiji oksidacijski kapacitet koji se kretao od 24-35%. Vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost pokazao je i uzorak lista motra s lokacije Krk (48,75%). Razlike u antioksidacijskoj aktivnosti možemo opet pripisati staništu, obzirom da motar koji je izložen vrlo visokim razinama stresa zbog nedostatka hranjivih tvari, pokazuje bolju aktivnost.

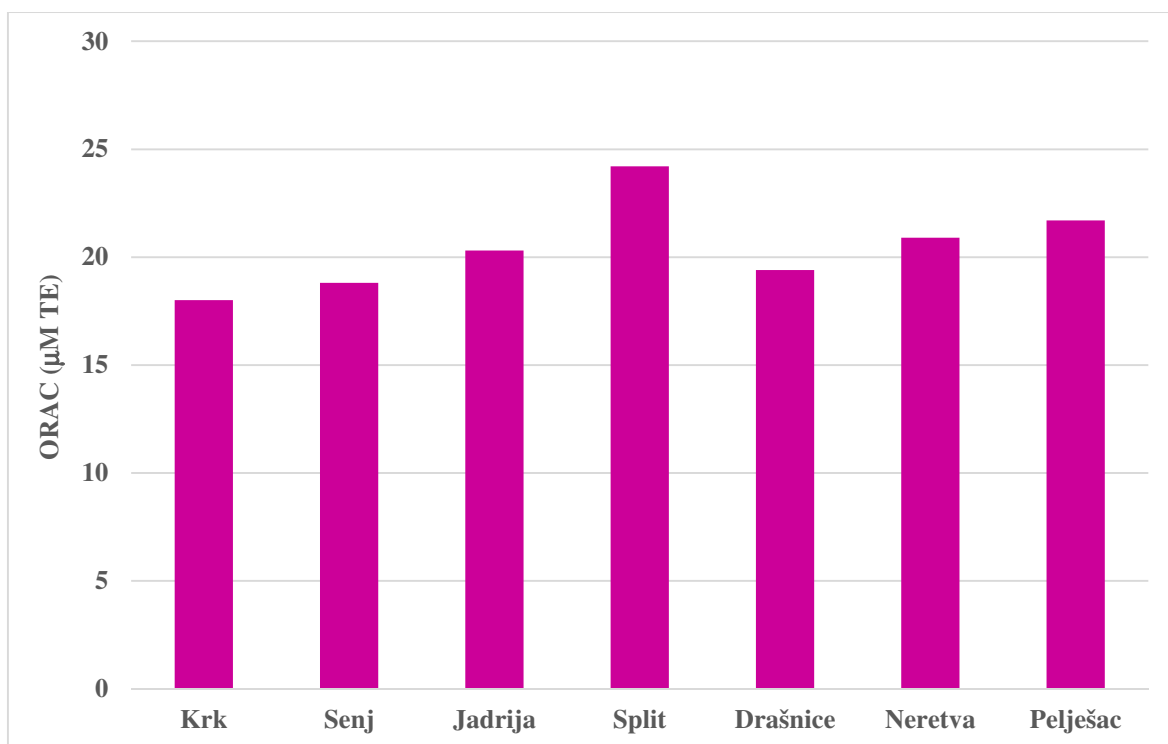


Slika 21. Prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti listova motra DDPH metodom prikupljenih s različitih lokacija duž obale Jadrana

U istom istraživanju Generalić Mekinić i sur. (2018) ekstrakt motra pokazao je inhibiciju od 44,5 %, što je približna vrijednost rezultatima ovog rada. Vidimo kako ima nižih vrijednosti (Split, Drašnice 24%), ali i puno viših vrijednosti (Neretva 55%) ovisno o samoj lokaciji.³⁷

3.3.3. Rezultati ORAC metode

Rezultati dobiveni ORAC metodom uvelike se razlikuju od prethodnih antioksidacijskih metoda. Kod ove metode vrijednosti svih analiziranih uzoraka su približno iste. Ono što privlači pažnju je uzorak prikupljen na lokaciji Split ($24,2 \mu\text{M TE}$) koji pokazuje najvišu antioksidacijsku aktivnost, dok najnižu ima uzorak prikupljen na lokaciji Krk ($18 \mu\text{M TE}$). Činjenica da su svi uzorci prije provedbe ove metode razrijeđeni 100 puta ukazuje na jako dobar antioksidacijski potencijal lista motra bez obzira na lokaciju na kojoj su uzorkovani. Obzirom da su razlike između najboljeg i najslabijeg uzorka zanemarive možemo zaključiti da svi uzorci imaju dobar kapacitet apsorpcije kisikovih radikala.



Slika 22. Prikaz rezultata dobivenih ORAC metodom prikupljenih listova s različitim lokacija duž obale Jadrana

Souid i sur. (2021) u svom su istraživanju za ekstrakt lista motra dobili vrijednost od $15,84 \mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari, dok su se vrijednosti u ovom radu kretale od 18 do $24 \mu\text{M TE}$.³⁸

4. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata možemo izvesti nekoliko zaključaka:

- određivanjem udjela ukupnih fenola i flavonoida najviši sadržaj zabilježen je u uzorku lista motra s lokacije Neretva dok su uzorci prikupljeni na srednjem Jadranu imali najniži udio navedenih spojeva,
- uzorak s lokacije Neretva pokazuju također i najviši sadržaj fenolnih kiselina, osobito klorogenske (86%), ali i najbolju antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP i DPPH metodama,
- najslabiji rezultati sadržaja fenola i antioksidacijske aktivnosti zabilježeni su za uzorke s lokacija Split i Drašnice,
- ORAC metodom najbolji antioksidacijski potencijal pokazao je ekstrakt lista motra s lokacije Split,
- rezultati potvrđuju hipoteze drugih autora koji pjeskovito stanište, koje biljci uskraćuje hranjive tvari i izlaže je stresu, navode kao glavni razlog za bogat fenolni sastav motra i izuzetan biološki potencijal.

Također, na osnovu rezultata se može zaključiti kako motar prikupljen na različitim lokacijama duž Jadranske obale posjeduje dobar fenolni sastav i biološki potencijal zbog čega se može opravdati njegova veća upotreba u prehrambenoj industriji. Potencijal ove biljke je još uvijek nedovoljno istražen, te bi trebalo posvetiti više pažnje detaljnijim i opsežnijim ispitivanjima utjecaja staništa i klimatskih uvjeta na kemijski i biološki potencijal, što bi uvelike doprinijelo njegovoj većoj iskoristivosti u prehrambene svrhe.

5. LITERATURA

1. J. Aronson, J. Blondel, Biology and wildlife of Mediterranean region. Oxford University press, New York, 1999, str 126-127.
2. S. Zenobi, M. Fiorentini, L. Ledda, P. Deligios, L. Aquilanti, R. Orsini, *Crithmum maritimum* L. Biomass Production in Mediterranean Environment. *Agronomy* (2022), 12, 926. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy12040926>
3. I. Devčić (2017), Biljke otporne na sol. Internetski članak. www.agroklub.com. Pristupljeno 19.08.2023.
4. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a4/1Salicornia_europaea.jpg (Preuzeto 15.09.2023.)
5. <https://i.pinimg.com/originals/3e/a8/ca/3ea8caff3910ac180abb36d7fe348ebd.jpg> (Preuzeto 01.10.2023.)
6. J. M. Castillo, J. M. Mancilla - Leyton, R. Martins - Nogueroles, X. Moreira, A. J. Moreno - Perez, S. Munoz - Valles, J.J. Pedroche, M. E. Figueroa, A. Garcia -Gonzales, J. J. Salas, M. C. Millan – Linares, M. Francisco, J. Cambrolle, Interactive effects between salinity and nutrient deficiency on biomass production and bio-active compounds accumulation in the halophyte *Crithmum maritimum*. *Sci. Hort.*, 301 (2022) doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111136>
7. S. Kovačić, T. Nikolić, M. Rušić, M. Milović, V. Stamenković, D. Mihelj, N. Jasprica, S. Bogdanović, J. Topić (2008). Flora jadranske obale i otoka. Školska knjiga, Zagreb.
8. A. Atia, A. Debez, M. Rabhi, H. Athar, C. Abdelly, Alleviation of salt – induced seed dormancy in the perennial halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) *Pak J Bot* 38(5):1367-1372, 2006.
9. Y. Ventura, M. Myrzabayeva, Z. Alikulov, R. Omarov, I. Khozin – Goldberg, M. Sagi, Effects of salinity, on flowering, morphology, biomass accumulation and leaf metabolites in an edible halophyte. *AoB Plants*, Vol. 6, 2014. doi: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu053>
10. https://www.mediteranka.com/media/k2/items/cache/1698b847c2e4fe98c05adcdc9d420590_XL.jpg (Preuzeto 20.08.2023.)
11. C. Guerreiro Pereira, L. Barreira, N. da Rosa Neng, J. M. F. Nogueira, C. Marques, T. F. Santos, J. Varela, L. Custodio, Searching for new sources of innovative products for 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 Toxic. (2017) 581-589. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.018
12. URL: <https://www.scribd.com/doc/296418638/LJEKOVITO> (30.08.2023.)
 13. S. Casagrande – Monti, *Crithmum maritimum* L. Curriculum in technologie agrarie, Universita politecnica; 2018-2019
 14. A. Atia, Z. Barhoumi, R. Mokded, C. Abdelly, A. Smaoui, Environmental eco – physiology and economical potential of halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). Vol. 5 (16), J. Med. Plant. Res., 2011, str. 3564-3571.
 15. L. Meot – Duros, C. Magne, Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. Plant. Physiol. Biochem. (2009) 37-41 doi: 10.1016/j.plaphy.2008.09.006
 16. O. T. Okusanya, The effect of Sea Water and Temperature on the Germination Behaviour of *Crithmum maritimum*. Vol 41, Physiol. Plant., 1977, str. 265-267 doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1977.tb04881.x>
 17. <https://maslina.slobodnadalmacija.hr/maslina/agrobiznis/motar-je-hrana-buducnosti-1323658>
 18. M. Kraouia, A. Nartea, A. Maoloni, A. Osimani, C. Garofalo, B. Fanesi, L. Ismael, L. Aquilanti, D. Pacetti, Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) as an Emerging Crop for the Manufacturing of Innovative Foods and Nutraceuticals. Molecules, 2023, 4741. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28124741>
 19. <https://www.researchgate.net/publication/269708853/figure/fig1/AS:295109104029696@1447370901061/Chemical-structure-of-chlorogenic-acid-5-O-caffeoyl-quinic-acid-CGA.png> (Preuzeto 02.10.2023.)
 20. V. V. Bianco, M. Renna, P. Santamaria. Ortaggi liberati – Dieci prodotti straordinari della biodiversita pugliese. Universita degli Studi di Bari, Italy;2018
 21. O. Houta, A. Akrou, M. Neffati, H. Amr, Phenolic content, Antioxidant and Antimicrobial Potential of *Crithmum maritimum* cultivated in Tunisia Arid Zones. J. Biol. Act. Prod. Nat. (2011) 138-143. doi: 10.1080/22311866.2011.10719081
 22. URL:<https://www.google.com/maps/place/Hrvatska/@44.3248336,11.123022,6z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x133441080add95ed:0xa0f3c024e1661b7f!8m2!3d45.1!4d15.2000001!16zL20vMDFwaje?entry=ttu> (Preuzeto 19.08.2023.)
 23. P. Bajt, Lambert – Beerov zakon. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju; 2018

24. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler (1999). Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb.
25. N. Mikolajczak, M. Tanska, D. Ogradowska, Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. Vol. 113, Trends Food Sci. Technol., 2021, str. 110-138.
26. <https://www.speckandburke.co.uk/media/1662/shimadzu-uv1900-4.png> (Preuzeto 28.09.2023.)
27. A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman, Y. M. Hijji, Determination of total flavonoid content by aluminium chloride assay: A critical evaluation. Vol. 150, LWT (2021). doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
28. T. Marković, Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa. Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu; 2019. (na hrvatskom jeziku)
29. M. Severović, Kromatografija kao analitička metoda za određivanje bioloških uzoraka. Završni rad, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2020.
30. <https://repositorij.ktfsplit.hr/islandora/object/ktfst%3A981/datastream/PDF/view> (Preuzeto 26.09.2023.)
31. https://www.ktf.unist.hr/images/phocagallery/merceg-labortorij-5bf2/thumbs/phoca_thumb_1_laboratoriji%20i%20oprema%2035.jpg (Preuzeto 28.09.2023.)
32. F. Shahidi, Y. Zhong, Measurement of antioxidant activity. Vol. 18, J. Funct. Foods. (2015) 575-581 doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
33. T. M. Rašić, Antioksidacijski potencijal kupine. Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu; 2021.
34. <https://imagehost.vendio.com/a/10281990/view/Sunrise603000081-3.jpg> (Preuzeto 28.09.2023.)
35. D. Bursač Kovačević, Utjecaj sorte, uzgoja i prerade na stabilnost polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet jagode. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu; 2010.
36. I. Galinović, Geometrijske karakteristike sedimentnih jezgri iz deltne ravnice rijeke Neretve. Diplomski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu; 2017.
37. I. Generalić Mekinić, V. Šimat, I. Ljubenković i sur. Influence of 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>.

38. A. Souid, C. M. Della Croce, S. Frassinetti i sur. Nutraceutical Potential of Leaf Hydro-Ethanolic Extract of the Edible Halophyte *Crithmum maritimum* L. *Mol.* 26 (2021) 5380; doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26175380>