

Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva lista motar (*Crithmum maritimum* L.)

Devčić, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:732307>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Iva Devčić

6973/PT

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA
LISTA MOTAR (*Crithmum maritimum* L.)

ZAVRŠNI RAD

Modul: Analitička kemija

Mentor: doc.dr.sc. Maja Dent

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta "Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane" (IP-PE- FF) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva lista motar (*Crithmum maritimum* L.)

Iva Devčić, 0058205539

Sažetak: Motar je aromatska halofilna biljka koja se zbog svog bogatog sastava biološki aktivnih spojeva koristi u prehrani. U ovom radu istraživana je utjecaj različitih vrsta otapala (voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-aceton-metanol-voda (1:1:1:1)) na ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista motar. Ekstrakcija je provedena refluksiranjem pri temperaturi ključanja otapala kroz 1 h. U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko (UV/VIS) određivanje masenih udjela ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola. Dobiveni rezultati su pokazali da primjena ekstrakcijskog otapala ima utjecaj na izolaciju fenolnih spojeva te da se bolji učinak ekstrakcije fenolnih spojeva postiže dodatkom vode u otapalo, nego primjenom čistog otapala, a vodena otopina etanola ima najbolji ekstrakcijski učinak kod izolacije ukupnih fenola (77,05 mg/g), hidroksicimetnih kiselina (53,49 mg/g) i flavonola (38,24 mg/g), dok je primjena čistog otapala, odnosno metanola, pokazala najbolji učinak kod ukupnih flavonoida (38,13 mg/g). Provedeno istraživanje pokazuje da je list motar dobar izvor fenolnih spojeva.

Ključne riječi: ekstrakcija, fenolni spojevi, motar, otapalo, spektrofotometrija

Rad sadrži: 35 stranica, 16 slika, 8 tablica, 41 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Maja Dent

Datum obrane: 20. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food technology

Spectrophotometric determination phenolic compounds of the Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) leaves

Iva Devčić, 0058205539

Abstract: Sea fennel is aromatic halophyte which have high content of biologically active compounds and it's used in nutrition. In this thesis was examine how different solvents effect (water, ethanol (96%), ethanol-water (1:1), acetone (100%), acetone-water (1:1), methanol (100%), methanol-water (1:1), ethanol-acetone-methanol (1:1:1) and ethanol-acetone-methanol-water (1:1:1:1)) on extraction phenolic compounds of sea fennel leaves. Duration of extraction was 1 hour on boiling temperature of each solvent. Extracts were analysed with spectrophotometry (UV/VIS) for total phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acid and flavonols content. Results show that solvent has effect on extraction of phenolic compounds, solvents mixed with water have higher capacity to extract phenolics than pure solvents and ethanol-water has the highest capacity of extraction of mass fraction of total polyphenols (77,05 mg/g), hidroxcinnamic acids (53,49 mg/g) and flavonols (38,24 mg/g), and pure solvent, methanol, has the highest capacity of extraction of total flavonids (38,13 mg/g). This results show that leaves of sea fennel have a high phenolic content.

Key words: extraction, phenolic compounds, sea fennel, solvent, spectrophotometry

Thesis contains: 35 pages, 16 figures, 8 tables, 41 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Maja Dent

Defence date: 20th September 2018.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	Motar	2
2.2	Fenolni spojevi	3
2.2.1	Flavonoidi	4
2.2.2	Fenolne kiseline	7
2.2.3	Fenolni spojevi biljke motar	8
2.3	Ekstrakcija fenolnih spojeva	8
2.3.1	Ekstrakcija refluksiranjem	9
2.4	Spektrofotometrija	10
3	MATERIJALI I METODE	12
3.1	Materijal	12
3.2	Kemikalije	12
3.3	Aparatura i pribor	12
3.4	Metode rada	13
3.4.1	Ekstrakcija refluksiranjem	13
3.4.2	Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva lista motar	14
4	REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1	Ukupni fenoli	21
4.2	Ukupni flavonoidi	23
4.3	Hidroksicimetne kiseline	25
4.4	Flavonoli	27
5	ZAKLJUČAK	31
6	POPIS LITERATURE	32

1 UVOD

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je aromatska jestiva halofilna biljka koja raste na obalama Sredozemlja i Atlantskog oceana. Tradicionalno se koristi u salatama, juhama ili kao začim jer je bogat izvor minerala i vitamina C te se koristi i u narodnoj medicini. Na obalnim područjima Sredozemlja koristi se još od antičkih vremena, ali i danas se konzumira u mnogim područjima diljem Europe. Motar sadrži fenolne spojeve, a istraživanja vezana uz njega uglavnom uključuju organske ekstrakte u kojima se istražuje antioksidativna i antimikrobiološka aktivnost različitih grupa bioaktivnih molekula među kojima značajnu ulogu zauzimaju fenolni spojevi (Pereira i sur., 2017; Nabet i sur., 2016). Na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva lista motar utječu brojni čimbenici kao što su izbor ekstrakcijskog otapala, dodatak vode u otapalo te uvjeti provedene ekstrakcije.

Cilj ovog istraživanja bio je spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli) lista motar te ispitati utjecaj ekstrakcijskog otapala (voda, etanol, aceton, metanol) i vodenih otopina otapala, te smjese otapala u jednakim omjerima na učinkovitost izolacije fenolnih spojeva.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Motar

Motar (*Crithmum maritimum* L.) je trajna zeljasta biljka. Stabljika je uspravna i u gornjem dijelu razgranata, glatka, debela i okruglasta, žućkaste boje, često odrvenjela pri dnu. Visoka je do 50 cm, a listovi su jednom ili dvaput rasperani u linearno lancetaste 2,5-5 cm duge i do 6 mm široke listiće. Listići su mesnati, aromatični, sjajni, sivkasto-zeleni do plavozeleni. Cvate ljeti (od srpnja do rujna) (Kovačić i sur., 2008), cvatovi su štitasti, žuti do žućkasto-zeleni (Lesinger, 2006), okruglih i smotanih latica sa 8-36 zraka. Plodići su dugi 5-6 mm, žućkasti ili grimizni. Motar se još može pronaći i pod nazivima obalni petrovac, šćulac, obalac, matar, slatki kopar.

Rasprostranjen je na Sredozemlju, obalama Crnog mora, atlantskoj obali od Portugala do sjeverne Francuske, u južnoj Engleskoj te na Kanarskim otocima. Raste duž obale, u škrapama, po stijenama, na grebenima, kamenjarima, uz samo more, a katkad i dalje, na starim zidinama i kamenitim krovovima te često raste u većim populacijama. Pogoduju mu posolica i zaslanjeno oskudno tlo (halofit) uz puno sunca (heliofit) (Kovačić i sur., 2008).

Carstvo: Plantae

Razred: Magnoliopsida

Red: Apiales

Porodica: Apiaceae

Rod: *Crithmum*

Vrsta: *Crithmum maritimum*



Slika 1. *Crithmum maritimum* L. (vlastite fotografije, 2018)

Mesnati i čvrsti listovi ove izuzetno halofilne štitarke imaju slan i žačinski, aromatičan okus i dugo se upotrebljavaju za jelo (Grlić, 2005). Prvi zapisi o motru potječu iz grčke mitologije, a u antici su ukiseljene listove konzumirali pomorci na dugim putovanjima (Kovačić i sur., 2008), u narodnoj medicini koristi se za liječenje brojnih tegoba (Lesinger, 2006).

Svježe ubrani listovi motra sadrže vitamin C i karotin te ima visok sadržaj eteričnih ulja, a poseban miris biljke potječe od eteričnog ulja kojem je glavni sastojak dilapiol (Grlić, 2005).

Motar je jedina vrsta svoga roda (Kovačić i sur., 2008).

2.2 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su spojevi koji sadrže barem jedan aromatski prsten i jednu ili više hidroksilnu skupinu direktno vezanu na aromatski prsten. U prirodi su obično prisutni spojevi s više hidroksilnih skupina, zbog toga se nazivaju i polifenolni spojevi (Paixão i sur., 2007) te se rijetko nalaze u slobodnom obliku, uglavnom su esterificirani ili konjugirani (Čović i sur., 2009.). U namirnicama, polifenoli doprinose gorčini, trpkosti, boji, okusu, mirisu i oksidacijskoj stabilnosti proizvoda, zbog čega su vrlo značajni u prehrambenoj industriji (Shahidi i sur., 2004).

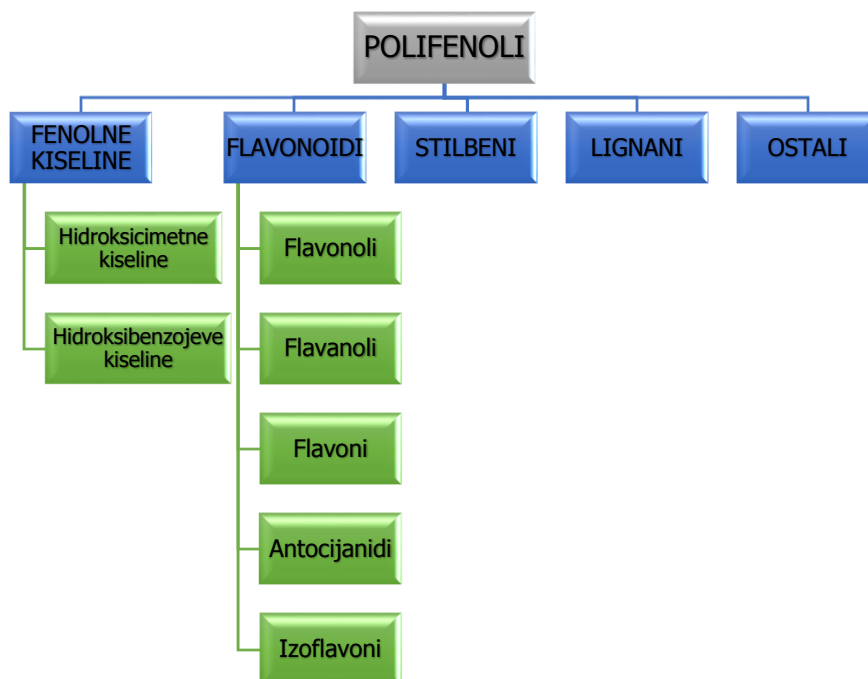
Fenolni spojevi su jedni od najvećih i najraširenijih sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti voća, povrća i drugih biljnih vrsta (Lapornik i sur., 2005). Osnovna strukturna formula polifenola je konjugirani oblik benzenskog ili aromatskog prstena na koji je direktno vezana hidroksilna skupina (Bravo, 1998). Polifenoli imaju različita svojstva, ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi.

Biljni polifenoli su topljivi u polarnim organskim otapalima, osim ako nisu potupno esterificirani, eterificirani ili glikolizirani. Topljivost u vodi se povećava sa brojem hidroksilnih grupa, uz nekoliko iznimki.

Svi fenolni spojevi intenzivno apsorbiraju u UV području spektra, a oni obojani i u vidljivom dijelu spektra. Svaka grupa fenolnih spojeva ima različite apsorpcijske karakteristike, odnosno područje spektra u kojem pokazuje maksimalnu apsorpciju.

Kao sekundarni biljni metaboliti, polifenoli, su najviše uključeni u zaštitu od UV zračenja i patogena. Također, neka istraživanja su pokazala da njihova uloga nije samo zaštitni mehanizam protiv biotičkog i abiotičkog stresa, već da su dio molekularnog programa koji doprinosi normalnom rastu i razvoju biljke.

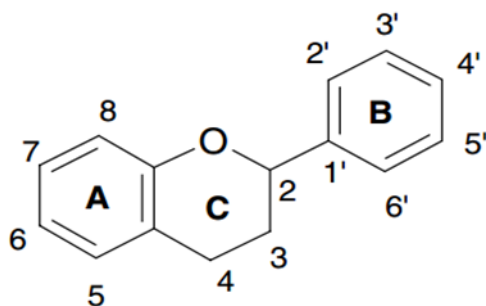
Fenolni spojevi se manifestiraju uglavnom kao žuti, crveni, plavi i ljubičasti pigmenti, ali i kao različiti spojevi koji doprinose okusu hrane (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).



Slika 2. Podjela polifenola (Han i sur., 2007)

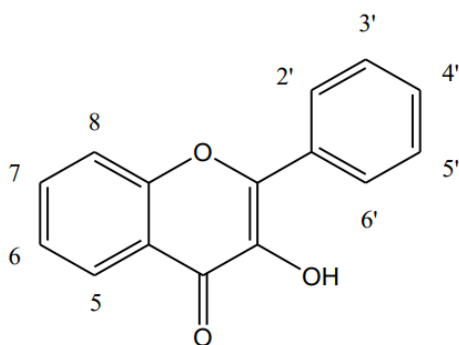
2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi su najrasprostranjenija podskupina polifenolnih spojeva te su prisutni u svim dijelovima biljke: korijenu, lišću, stabljici i plodovima i dio su ljudske prehrane. Međusobno se razlikuju po strukturi i karakteristikama, a identificirano je preko 4000 različitih flavonoida unutar nekoliko kategorija (Cook i Samman, 1996.). To su niskomolekularni spojevi sa 15 ugljikovih atoma koji sadrže difenilpropanski kostur povezan s piranskim prstenom u sredini (Pietta, 2000) te se razlikuju s obzirom na povezanost B i C prstena, ali i prema stupnju nezasićenosti, stupnju oksidacije i prema broju i položaju hidroksilne skupine u C prstenu (He i Giusti, 2010; Ignat i sur., 2011).



Slika 3. Opća strukturna formula flavonoida (Balasundram i sur., 2006)

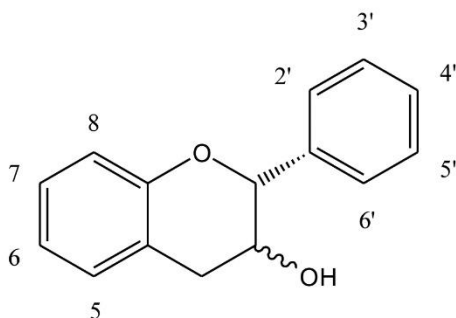
Flavonoli su najrašireniji flavonoidi u hrani, a najistaknutiji su kamferol i kvercetin te su uglavnom prisutni u relativno malim koncentracijama. Uglavnom su prisutni u obliku glikozida te se najčešće vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i s galaktozom, arabinozom i ksilozom (Erdman i sur., 2007). Široko su rasprostranjeni u carstvu biljaka i do sada je u biljkama identificirano oko 200 različitih flavonola. Imaju nezasićenu vezu između C_2 i C_3 atoma C prstena te vezanu hidroksilnu skupinu na C_3 atomu C prstena (Castillo-Muñoz i sur., 2007).



Slika 4. Kemijska struktura flavonola (Robards i sur., 1999)

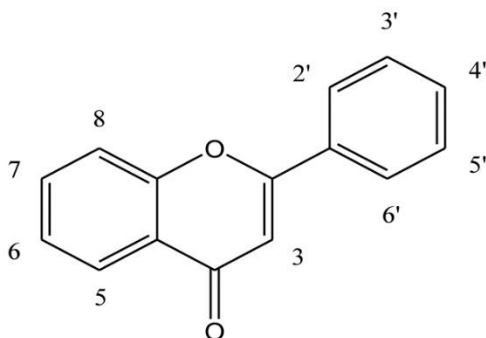
Flavanoli su složena podvrsta flavonoida, poznati su i kao katehini, a glavni predstavnik je flavan-3-ol. Ova skupina spojeva razlikuje se od drugih flavonoida, jer se ne pojavljuju u obliku glikozida, ali javljaju se u četiri izomerna oblika, među njima je katehin najrašireniji i nalazi se u mnogim vrstama voća, nalazi se i u crvenom vinu, ali zeleni čaj i čokolada najvažniji su njegov izvor. Međusobnim povezivanjem, odnosno polimerizacijom tvore procijanidine

(kondenzirane tanine) koji su odgovorni za trpkost voća i pića (Santos-Buelga i Scalbert, 2000).



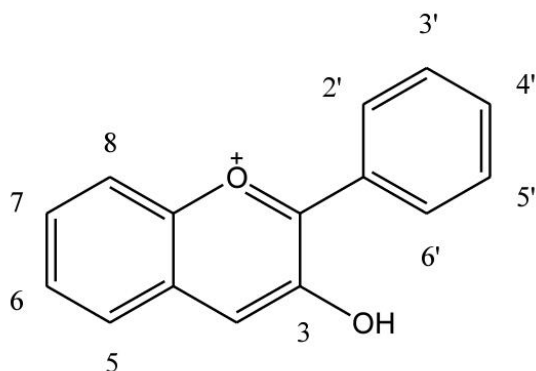
Slika 5. Kemijska struktura flavanola (Robards i sur., 1999)

Flavoni su u voću i povrću zastupljeni u znatno manjim količinama. Za razliku od flavanola nemaju hidroksilnu skupinu na C₃-atomu C prstena (Macheix i sur., 1990). U kori citrusa nalaze se velike količine polimetoksiliranih flavona: tangeretin, nobiletin i sinensetin (Shahidi i Naczka, 1995) koji spadaju u najhidrofobnije flavonoide. Iako je više od 100 flavona identificirano u biljkama, te kemijske spojeve ne nalazimo često u voću.



Slika 6. Kemijska struktura flavona (Robards i sur., 1999)

Antocijani su derivati 2-fenilbenzopirilijevih (flavilijevih) soli koje se nalaze u biljkama u obliku glikozida, poznati pod nazivom antocijani, dok se njihovi aglikoni nazivaju antocijanidini. U prirodi je pronađeno više od 20 različitih antocijanidina, a najvažniji su cijanidin, pelargonidin, delphinidin, peonidin, petunidin i malvidin (Fennema, 1985). Prisutni su u crvenom, plavom i ljubičastom voću i cvijeću te služe kao obrambeni mehanizam biljaka od UV oštećenja.

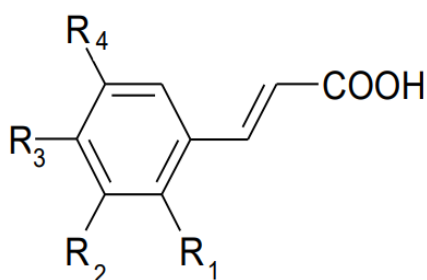


Slika 7. Kemijska struktura antocijanida (Robards i sur., 1999)

2.2.2 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su polifenolni spojevi malih molekulskih masa koji se nalaze u hrani biljnog porijekla, a dijele se u dvije osnovne skupine: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline (Belitz i sur., 2004).

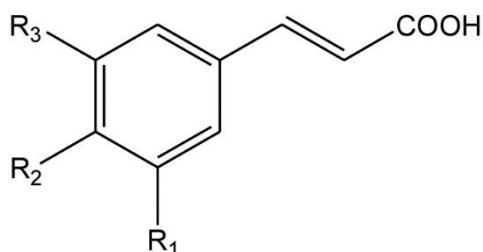
Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina je C_6-C_3 . Najvažnije hidroksicimetne kiseline su: kafeinska kiselina, ferulinska, p-kumarinska i sinapinska kiselina (Bravo, 1998), a u prirodi se uglavnom nalaze u obliku estera (Macheix i sur., 1990). Zbog svog antioksidacijskog djelovanja fenolne kiseline imaju pozitivno djelovanje na zdravlje ljudi (Lafay i Gil-Izquierdo, 2008).



Slika 8. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Robards i sur., 1999)

Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina je C_6-C_1 te nastaju direktno iz benzojeve kiseline. U hidroksibenzojeve kiseline ubrajaju se: galna, p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska, vanilinska, elaginska i salicilna kiselina (Bravo, 1998). U prirodi

se nalaze uglavnom u slobodnom obliku, ali se povezuju i s konjugiranim šećerima i organskim kiselinama.



Slika 9. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

2.2.3 Fenolni spojevi biljke motar

Motar je bogat fenolnim spojevima, sadrži flavonoide, flavonole, hidroksicimetne kiseline i kondenzirane tanine, koji su sadržani u svim dijelovima biljke: cvijetu, listu i stabljici, ali u različitim udjelima (Pereira sur., 2017), količine fenolnih spojeva ovise o primjenjenoj ekstrakcijskoj metodi (Jallali i sur., 2012; Pereira i sur., 2017; Meot-Duros i Magne, 2008).

2.3 Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija podrazumijeva postupak izdvajanja jednog ili većeg broja sastojaka iz otopine, suspenzije ili čvrstog materijala pomoću otapala, odnosno radi se o prijenosu tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo (Albu i sur., 2004). Osnovni cilj ekstrakcije je izolacija što veće količine željene tvari, a da pritom izolirana tvar ima što veću kvalitetu. Za učinkovito provođenje ekstrakcije potrebno je odrediti optimalne uvjete, pri čemu se moraju pratiti brojni faktori kao što su: veličina čestica, značajke samog otapala, vrste spojeva koje se ekstrahiraju kao i vrijeme i temperatura ekstrakcije (Putnik i sur., 2016). Vodene smjese etanola ili acetona pokazale su se osobito učinkovite, kod ekstrakcije fenolnih spojeva iz različitih biljnih materijala, u usporedbi s čistim otapalima (Lapornik i sur., 2005; Sun i Ho, 2005; d'Alessandro

i sur., 2012). Osim odgovarajućeg otapala, za uspješno provođenje ekstrakcije treba uzeti u obzir i druge čimbenike poput molekularnog afiniteta otapala i otopljene tvari, prijenosa mase u odgovarajućem otapalu, sigurnosti okoliša, toksičnosti za ljude i financijskoj isplativosti. Također, važnu ulogu ima i primjena odgovarajuće metode ekstrakcije. One se dijele na konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (nove, suvremene) (Azmir i sur., 2013).

KONVENCIONALNE METODE EKSTRAKCIJE	NEKONVENCIONALNE METODE EKSTRAKCIJE
<ul style="list-style-type: none">• Soxhlet ekstrakcija• ekstrakcija refluksiranjem• maceracija• destilacija	<ul style="list-style-type: none">• ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom• ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima• ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom• ekstrakcija pomoću enzima• ekstrakcija pomoću elektičnog polja• ekstrakcija superkričnim fluidima

Slika 10. Ekstrakcijske metode (Azmir i sur., 2013)

2.3.1 Ekstrakcija refluksiranjem

Refluksiranje je postupak prevođenja otapala u paru i ponovno kondenziranje nastalih para u tekućinu koja se vraća u reakcijsku smjesu. Najčešće se primjenjuje kod ekstrakcije čvrstog materijala tekućim otapalom (ekstrakcija čvrsto - tekuće) pri čemu se tvari iz čvrste faze izdvajaju i prelaze u tekuću fazu odnosno u otapalo. Metoda podrazumijeva zagrijavanje uzorka sa otapalom u aparaturi sa povratnim hladilom (Rapić, 1994).

2.4 Spektrofotometrija

Najčešće se primjenjuje spektrofotometrija u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (VIS) području elektromagnetskog zračenja zbog svoje jednostavnosti i niskih troškova (Liu i sur., 2008).

Apsorpcijska spektroskopija koja se temelji na ultraljubičastom (UV) i vidljivom (VIS) zračenju najkorištenija je tehnika u kvantitativnoj kemijskoj analizi zbog svoje široke primjenjivosti, velike osjetljivosti, prihvatljive točnosti, te jednostavnosti i brzine izvođenja. Područje ultraljubičastog dijela elektromagnetskog spektra odnosi se na valne duljine od 200 do 400 nm, dok se područje vidljivog dijela elektromagnetskog spektra odnosi na valne duljine od 400 do 800 nm. UV/VIS zračenje u molekuli uzrokuje prijelaz valentnih elektrona u više nepopunjene energetske orbitale, a dio molekule koji apsorbira UV/VIS zračenje naziva se kromofor (nezasićeni dio molekule). Metoda se zasniva na propuštanju zrake svjetlosti kroz uzorak, mjerenju intenziteta svjetla koje je prošlo kroz uzorak te uspoređivanju tog intenziteta sa intenzitetom ulaznog svjetla. Apsorpcija zračenja dana je Lambert - Beerovim zakonom:

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon b c$$

pri čemu je A apsorbancija, I_0 intenzitet ulaznog svjetla, I intenzitet svjetla propuštenog kroz uzorak, ϵ molarni apsorpcijski koeficijent, c množinska koncentracija i b debljina sloja otopine. Iz Lambert-Beerovog zakona proizlazi zaključak da je apsorbancija linearno proporcionalna koncentraciji analita što omogućuje jednostavno računanje koncentracije iz izmjerene apsorbancije.

Za mjerenje apsorbancije koristi se spektrofotometar (Slika 11) koji se sastoji od: izvora svjetla (zračenja), selektora valnih duljina (monokromator), spremnika za uzorak (kiveta), detektora i procesora signala.



Slika 11. UV/Vis spektrofotometar (vlastita fotografija, 2018)

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijal

Motar je ubran na području Dalmacije (otok Pag) tijekom srpnja 2017. Nakon branja je osušen te neposredno prije provođenja analiza je usitnjen.

3.2 Kemikalije

- Aceton (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijev klorid, 99% (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Etilni alkohol, 96% (Kefo, Slovenija)
- Folin-Ciocalteu reagens (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Kafeinska kiselina (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Kalijev acetat (Acros Organics, Nizozemska)
- Klorovodična kiselina, 37% (Panreac, Španjolska)
- Kvercetin, 95% (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Metanol (J. T. Baker, Nizozemska)
- Natrijev karbonat (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)

3.3 Aparatura i pribor

- Analitička vaga (A&D Instruments Ltd, GR-200-EC, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Automatska pipeta
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Filter papir (Papir crna vrpca Munktell 125mm/388, Filtrak, Njemačka)
- Graduirane pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL
- Grijač (Tehtnica, Železniki, Jugoslavija)
- Menzura
- Odmjerne tikvice volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL, 1000 mL

- Povratno hladilo
- Propipeta
- Staklene čaše
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni lijevci
- Tikvica s okruglim dnom
- UV/VIS Spektrofotometar (PERKIN-ELMER, Lambda 1, Massachusetts, USA)
- Vortex mješalica (Metron, Zagreb, Hrvatska)

3.4 Metode rada

Iz lista motar su postupcima ekstrakcije refluksiranjem na temperaturi ključanja otapala kroz 1 sat dobiveni ekstrakti u kojima se potom spektrofotometrijski određivao maseni udio fenolnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli).

3.4.1 Ekstrakcija refluksiranjem

Ekstrakcija fenolnih spojeva refluksiranjem provedena je na uzorcima osušenih i usitnjenih listova motara. 1 g uzorka ekstrahiran je s 25 mL otapala kroz 1 h, na temperaturi ključanja otapala. Korištena otapala su: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-aceton-metanol-voda (1:1:1:1).

Nakon završene ekstrakcije uzorci su profiltrirani preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany) u odmjerne tikvice koje su nadopunjene do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju. Priređeni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču pri temperaturi od -18°C do provođenja analiza.



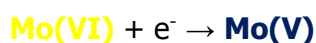
Slika 12. Ekstrakcija refluksiranjem (vlastita fotografija, 2018)

3.4.2 Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva lista motar

Određivanje fenolnih spojeva lista motar je provedeno u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem primjenom sljedećih otapala: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-aceton-metanol-voda (1:1:1:1).

3.4.2.1 Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli se određuju spektrofotometrijski, a metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog plavog obojenja pri 765 nm (Singleton i Rossi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volframov i molibdenov oksid koji su plave boje. Redukcija ovih kiselina, odnosno tvorba relativno plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima (Jakopić i sur., 2009).



Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline

Za pripremu baždarnog dijagrama pripremi se standardna otopina galne kiseline, masene koncentracije 5 g L^{-1} . Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da koncentracije standardnih otopina galne kiseline iznose 50, 100, 150, 250, 500 mg L^{-1} . Iz svake tikvice otpipetira se u odmjernu tikvicu od 25 mL: 250 μL standardne otopine galne kiseline, 1,25 mL F.C. reagensa i 15 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute doda se 3,75 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom uzorci stoje u mraku 2 h. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i masenih koncentracija galne kiseline nacrtava se baždarni dijagram, a potom se koncentracija ukupnih fenola izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar
- Analitička vaga
- Odmjerne tikvice volumena 25 mL, 100 mL i 1000 mL
- Automatska pipeta
- Graduirane pipete volumena 1 mL, 2mL, 5mL
- Propipeta

Kemikalije

- Folin-Ciocalteu reagens (F. C. reagens)
F. C. reagens se razrijedi deioniziranom vodom u omjeru 1:2.
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna otopina)
200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- Standard galne kiseline
Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Postupak određivanja ukupnih fenola

Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakta je potrebno prethodno razrijediti.

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se redom: 250 μ L ekstrakta, 15 mL deionizirane vode i 1,25 mL F. C. reagensa. Nakon 3 minute doda se 3,75 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom uzorci stoje u mraku 2 h. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline mg GAE g^{-1} suhog lista motar.

3.4.2.2 Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje flavonoida provodi se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Izrada baždarnog dijagrama kvercetina

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg L^{-1} . Od te otopine standarda rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose: 10, 25, 50 i 75 mg L^{-1} . Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg L^{-1} . Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10%-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode. Reakcijska smjesa potom stoji 30 min, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i masenih koncentracija kvercetina nacrtava se baždarni dijagram, a potom se koncentracija ukupnih flavonoida izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar
- Staklene epruvete
- Analitička vaga
- Graduirane pipete volumena 2 mL, 5 mL

- Automatska pipeta
- Odmjerne tikvice volumena 10 mL i 100 mL
- Propipeta
- Vortex mješalica

Kemikalije

- Etanol, 96%
- Metanol, 100%
- Aluminijev klorid, 10%
1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid-heksahidrat, p. a.) otopi se sa 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Kalijev acetat, 1 M
9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Standard kvercetina
Odvaži se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Postupak određivanja flavonoida

Ekstrakti se prije analize trebaju razrijediti otapalom korištenim za ekstrakciju. U staklenu epruvetu otpipetira se redom: 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijeva klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata i 2,8 mL deionizirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10%-tnog aluminijeva klorida dodaje isti volumen deionizirane vode. Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm. Maseni udjeli flavonoida izraženi su kao ekvivalent kvercetina mg QE g⁻¹ suhog lista motar.

3.4.2.1 Određivanje hidroksicimetnih kiselina

Određivanje hidroksicimetnih kiselina se provodi spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

Izrada baždarnog dijagrama kafeinske kiseline

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kafeinske kiseline koncentracije 100 mg L^{-1} . Od te otopine standarda rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kafeinske kiseline iznose: 10, 25, 50 i $66,7 \text{ mg L}^{-1}$. Također se za analizu uzima alikvotna otopina standarda. U staklenu epruvetu otpipetira se redom: 250 μL otopine standarda, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i masenih koncentracija kafeinske kiseline nacrtava se baždarni dijagram, a potom se koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar
- Staklene epruvete
- Analitička vaga
- Graduirane pipete volumena 5 mL
- Automatska pipeta
- Propipeta
- Odmjerne tikvice volumena 10 mL i 100 mL
- Vortex mješalica

Kemikalije

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
- Etanol, 96%
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g L^{-1} HCl (u 96% etanolu)
0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96%) do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g L^{-1} HCl
0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Standard kafeinske kiseline (100 mg L^{-1})
Odvažuje se 10 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu

volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.

Postupak određivanja hidroksicimetnih kiselina

Ekstrakte je prije mjerenja potrebno razrijediti. U staklenu epruvetu otpipetira se redom: 250 μL ekstrakta, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Apsorbancija se mjeri na 320 nm. Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina izraženi su kao ekvivalent kafeinske kiseline mg CAE g^{-1} suhog lista motar.

3.4.2.2 Određivanje flavonola

Određivanje flavonola se provodi spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 360 nm (Howard i sur., 2003).

Izrada baždarnog dijagrama kvercetina

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg L^{-1} . Od te otopine standarda rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose: 2.5, 5, 10, i 50 mg L^{-1} . Također se za analizu uzima alikvotna otopina standarda. U staklenu epruvetu otpipetira se redom: 250 μL otopine standarda, 25 μL 1 g L^{-1} HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Apsorbancija se mjeri na 360 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija i masenih koncentracija kvercetina nacrtava se baždarni dijagram, a potom se koncentracija flavonola izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Aparatura i pribor

- Spektrofotometar
- Staklene epruvete
- Analitička vaga
- Graduirane pipete volumena 5 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10 mL, 100 mL
- Propipeta
- Automatska pipeta
- Vortex mješalica

Kemikalije

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
- Etanol, 96%
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g L^{-1} HCl (u 96% etanolu)
0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96%) do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g L^{-1} HCl
0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Standard kvercetina (100 mg L^{-1})
Odvaž se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

Postupak određivanja flavonola

Ekstrakte je prije mjerenja potrebno razrijediti. U staklenu epruvetu otpipetira se redom: 250 μL ekstrakta, 250 μL 1 g L^{-1} HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L^{-1} HCl. Apsorbancija se mjeri na 360 nm. Maseni udjeli flavonola izraženi su kao ekvivalent kvercetina mg QE g^{-1} suhog lista motar.

4 REZULTATI I RASPRAVA

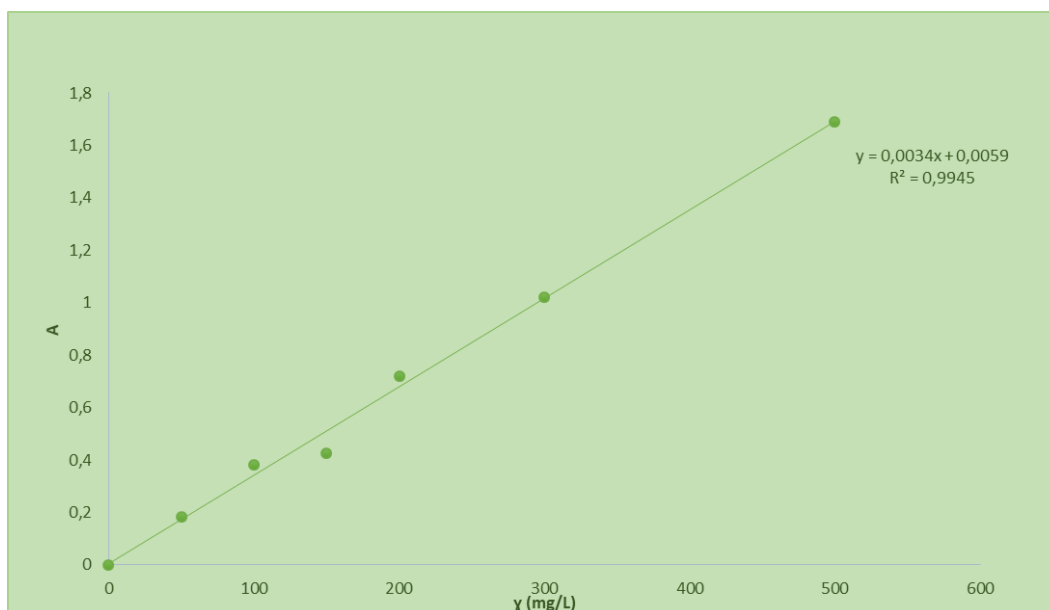
U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, hidrokscimetnih kiselina i flavonola u pripremljenim ekstraktima lista motar ekstrakcijom refluksiranjem provedenom pri temperaturi ključanja otapala kroz 1 h. Korištena otapala su: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-aceton-metanol-voda (1:1:1:1).

4.1 Ukupni fenoli

Za određivanje ukupnih fenola u listu motar bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Tablica 1 prikazuje vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 13). Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao mg galne kiseline na g suhog lista motar (Tablica 2).

Tablica 1. Masene koncentracije standardnih otopina galne kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm

STANDARDNA OTOPINA	$\gamma / (\text{mg L}^{-1})$	A
0	0	0
1	50	0,184
2	100	0,382
3	150	0,425
4	200	0,721
5	300	1,021
6	500	1,689



Slika 13. Baždarni dijagram galne kiseline

Tablica 2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola lista motar. Maseni udjeli ukupnih fenola su izraženi kao mg galne kiseline (GAE)/g suhog lista motar.

	OTAPALA	w (mg GAE/g)±SD
REFLUKSIRANI EKSTRAKTI	voda	54,15±12,09
	etanol (96%)	35,97±1,44
	etanol-voda (1:1)	77,05±7,88
	aceton (100%)	4,26±0,68
	aceton-voda (1:1)	76,74±2,91
	metanol (100%)	35,36±4,25
	metanol-voda (1:1)	73,84±4,37
	etanol-aceton-metanol (1:1:1)	30,66±4,02
	etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1)	67,54±1,01

Iz dobivenih rezultata vidimo da se maseni udio ukupnih fenola kreće od 4,26 mg GAE g⁻¹ do 77,05 mg GAE g⁻¹. Najveći maseni udjeli ukupnih fenola iz lista motar su dobiveni primjenom vodenih otopina etanola i acetona, dok su primjenom vodene otopine metanola i

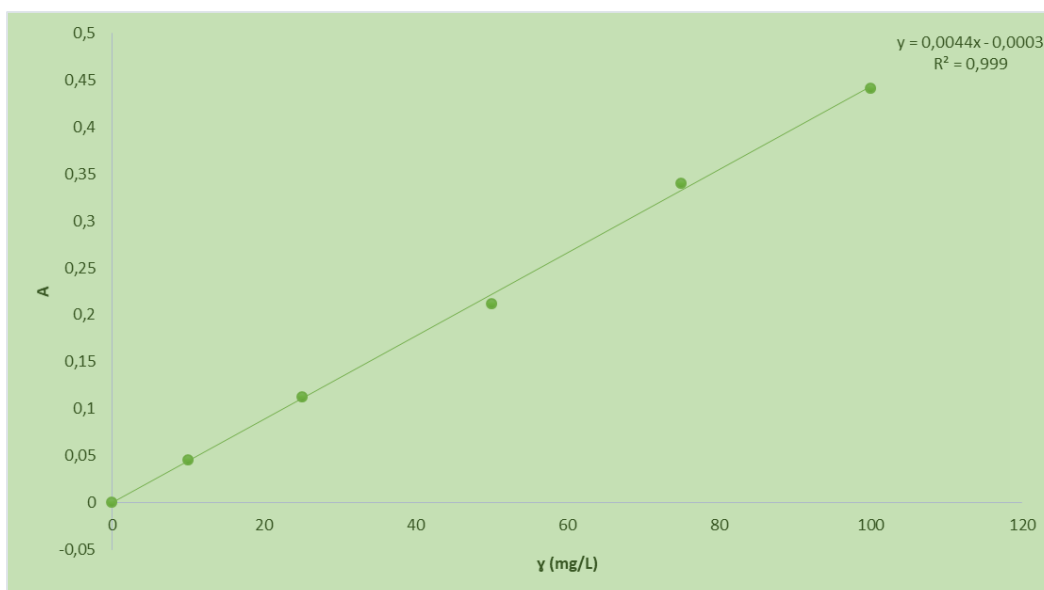
etanol-metanol-aceton-voda nešto niži. Primjenom vode kao ekstrakcijskog otapala je izoliran nešto niži maseni udio ukupnih fenola (54,15 mg GAE g⁻¹) lista motar. Dodatak vode u ekstrakcijsko otapalo povećava ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola iz lista motar u odnosu na primjenu čistog otapala (etanol, metanol, aceton). Primjenom ekstrakcijskih otapala (etanol, metanol, aceton) bez dodatka vode su ekstrahirani značajno niži maseni udjeli ukupnih fenola (4,26 – 35,97 mg GAE g⁻¹) iz lista motar.

4.2 Ukupni flavonoidi

U tablici 3 su prikazane vrijednosti masenih koncentracija kvercetina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 14). Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija ukupnih flavonoida u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli ukupnih flavonoida izraženi su kao mg kvercetina na g suhog lista motar (Tablica 4).

Tablica 3. Masene koncentracije standardnih otopina kvercetina i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 415 nm

STANDARDNA OTOPINA	$\gamma / (\text{mg L}^{-1})$	A
0	0	0
1	10	0,045
2	25	0,113
3	50	0,212
4	75	0,340
5	100	0,442



Slika 14. Baždarni dijagram kvercetina

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida lista motar. Maseni udjeli ukupnih flavonoida su izraženi kao mg kvercetina (QE)/g suhog lista motar.

OTAPALA		w (mg QE/g)±SD
REFLUKSIRANI EKSTRAKTI	voda	24,09±3,07
	etanol (96%)	31,90±1,86
	etanol-voda (1:1)	34,21±0,47
	acetona (100%)	11,09±0,35
	acetona-voda (1:1)	34,01±3,10
	metanol (100%)	38,13±1,85
	metanol-voda (1:1)	30,21±3,01
	etanol-acetona-metanol (1:1:1)	27,79±3,92
	etanol-metanol-acetona-voda (1:1:1:1)	34,25±0,59

Dobiveni rezultati pokazuju da se maseni udio flavonoida kreće od 11,09 mg QE g⁻¹ do 38,13 mg QE g⁻¹. Najveći maseni udio flavonoida postignut je primjenom metanola kao ekstrakcijskog otapala, dok vodene otopine etanola i acetona pokazuju nešto niži ekstrakcijski učinak, kao i primjena vodenih otopina svih otapala. Primjenom acetona kao ekstrakcijskog otapala je ekstrahirano značajno niži maseni udio flavonoida (11,09 mg QE g⁻¹) iz lista motar.

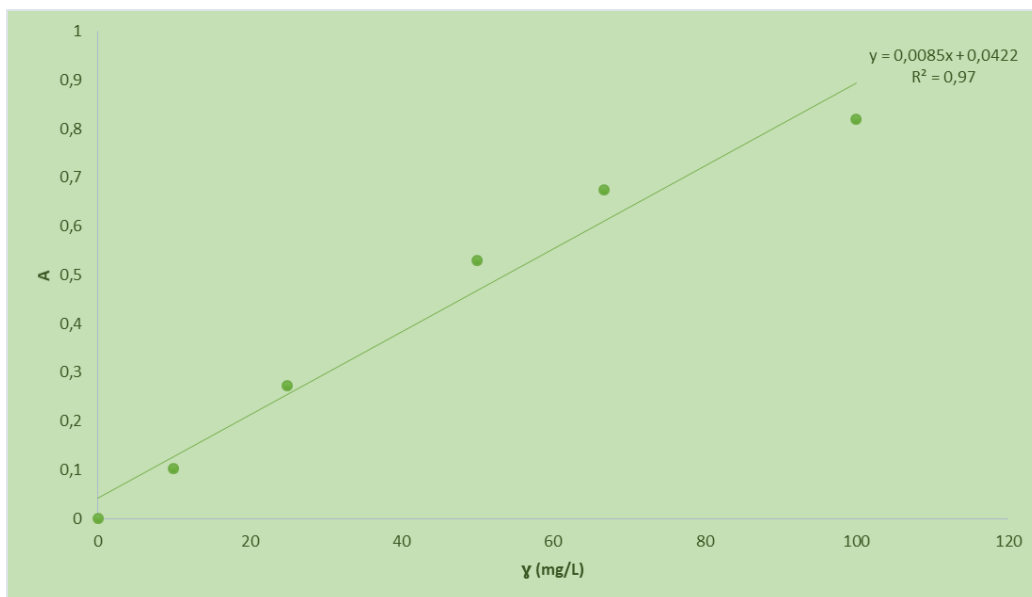
Kod ekstrakcije flavonoida iz lista motar primjena čistog ekstrakcijskog otapala metanola pokazuje najveći ekstrakcijski kapacitet dok kod primjene drugih otapala (etanol, aceton) se dodatkom vode u ekstrakcijsko otapalo postiže veći ekstrakcijski učinak u odnosu na čisto otapalo.

4.3 Hidroksicimetne kiseline

U tablici 5 su prikazane vrijednosti masenih koncentracija kafeinske kiseline s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 15). Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija hidroksicimetnih kiselina u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina izraženi su kao mg kafeinske kiseline na g suhog lista motar (Tablica 6).

Tablica 5. Masene koncentracije standardnih otopina kafeinske kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 320 nm

STANDARDNA OTOPINA	$\gamma / (\text{mg L}^{-1})$	A
0	0	0
1	10	0,103
2	25	0,272
3	50	0,529
4	66,7	0,675
5	100	0,820



Slika 15. Baždarni dijagram kafeinske kiseline

Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih kiselina lista motar. Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina su izraženi kao mg kafeinske kiseline (CAE)/g suhog lista motar.

OTAPALA		w (mg CAE/g)±SD
REFLUKSIRANI EKSTRAKTI	voda	41,39±5,48
	etanol (96%)	31,18±0,07
	etanol-voda (1:1)	53,49±6,29
	acetone (100%)	7,65±0,33
	acetone-voda (1:1)	53,41±1,22
	metanol (100%)	32,36±0,27
	metanol-voda (1:1)	49,55±2,24
	etanol-acetone-metanol (1:1:1)	23,89±1,83
	etanol-metanol-acetone-voda (1:1:1:1)	49,41±4,20

Iz dobivenih rezultata vidimo da se maseni udio hidroksicimetnih kiselina kreće od 7,65 mg CAE g⁻¹ do 53,49 mg CAE g⁻¹. Najveći maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina dobiveni su primjenom vodenih otopina etanola i acetona, a primjenom vodene otopine metanola i etanol-metanol-acetone-voda je nešto niži, dok je primjenom vode kao otapala izolirano 41,39

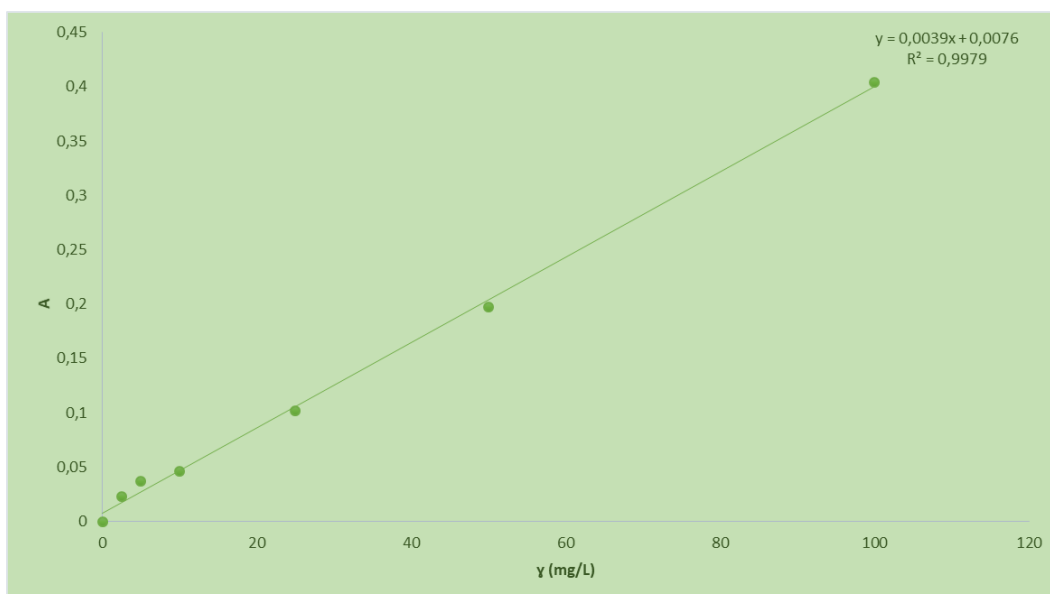
mg CAE g⁻¹ hidroksicimetnih kiselina lista motar. Možemo zaključiti kao i kod ukupnih fenola, dodatak vode u ekstrakcijsko otapalo povećava ekstrakcijski kapacitet izolacije hidroksicimetnih kiselina iz lista motar u odnosu na primjenu čistih otapala.

4.4 Flavonoli

U tablici 7 su prikazane vrijednosti masenih koncentracija kvercetina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 16). Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija flavonola u ekstrahiranim uzorcima. Maseni udjeli flavonola izraženi su kao mg kvercetina na g suhog lista motar (Tablica 8).

Tablica 7. Masene koncentracije standardnih otopina kvercetina i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 360 nm

STANDARDNA OTOPINA	$\gamma / (\text{mg L}^{-1})$	A
0	0	0
1	2,5	0,023
2	5	0,037
3	10	0,046
4	25	0,102
5	50	0,197
6	100	0,404



Slika 16. Baždarni dijagram kvercetina

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonola lista motar. Maseni udjeli flavonola su izraženi kao mg kvercetina (QE)/g suhog lista motar.

OTAPALA		w (mg QE/g)±SD
REFLUKSIRANI EKSTRAKTI	voda	26,98±3,74
	etanol (96%)	30,67±0,54
	etanol-voda (1:1)	38,24±4,81
	acetona (100%)	8,74±0,83
	acetona-voda (1:1)	37,60±0,12
	metanol (100%)	30,17±0,77
	metanol-voda (1:1)	33,54±2,08
	etanol-acetona-metanol (1:1:1)	24,91±1,07
	etanol-metanol-acetona-voda (1:1:1:1)	37,64±2,46

Dobiveni rezultati pokazuju da se maseni udio flavonola kreće od 8,74 mg QE g⁻¹ do 38,24 mg QE g⁻¹. Najveći maseni udjeli flavonola dobiveni su primjenom vodenih otapala etanola, acetona i etanol-metanol-acetona-voda, a primjenom vode izolirano je 26,98 mg QE g⁻¹ flavonola iz lista motar. Primjenom čistih otapala (etanol, metanol, acetona) su dobiveni

samo nešto niži maseni udjeli flavonola u odnosu na primjenu vodenih otopina istih otapala. Iz dobivenih rezultata, određenih masenih udjela flavonola iz lista motar, može se zaključiti da dodatak vode u ekstrakcijsko otapalo povećava ekstrakcijski kapacitet izolacije flavonola iz lista motar.

U provedenom istraživanju ispitivan je utjecaj različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista motar (*Crithmum maritimum* L.). Klasična ekstrakcija refluksiranjem fenolnih spojeva provedena je primjenom otapala različite polarnosti: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1). Općenito, svi dobiveni ekstrakti bogat su izvor fenolnih spojeva, ali njihov maseni udio značajno ovisi o uvjetima ekstrakcije, odnosno o primjenjenom otapalu i njegovoj polarnosti, što su potvrdili i drugi autori (Pereira i sur., 2017; Jallali i sur., 2012; Meot-Duros i Magne, 2009; Nabet i sur., 2016). Također, prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala ima značajnu ulogu, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Provedenim istraživanjem je utvrđeno da je najveći maseni udio ukupnih fenola, u iznosu od 77,05 mg GAE g⁻¹, dobiven upravo postupkom ekstrakcije refluksiranjem, primjenom vodene otopine etanola, dok su primjenom vodenih otopina metanola, acetona i etanol-metanol-aceton-voda dobiveni samo nešto niži maseni udjeli ukupnih fenola. Primjenom vode kao ekstrakcijskog otapala ekstrahirani su visoki maseni udjeli ukupnih fenola iz lista motar. Također, kod ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina i flavonola su najveći maseni udjeli ekstrahirani upravo primjenom vodenih otopina etanola, metanola, acetona i etanol-metanol-aceton-voda. Primjenom čistih otapala (etanol, metanol, aceton) određeni su značajno niži maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina i flavonola. Iznimka su flavonoidi, gdje je primjenom čistog metanola ekstrahirani najveći maseni udio flavonoida, dok primjenom drugih otapala (etanol, aceton, etanol-metanol-aceton-voda) su se boljim pokazale vodene otopine otapala. Primjenom vode kao ekstrakcijskog otapala dobiveni su visoki maseni udjeli ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina iz lista motar. Naposljetku se može zaključiti da na maseni udio ekstrahiranih fenolnih spojeva veći utjecaj ima udio vode odnosno organske faze u otapalu od izbora samoga otapala, dobiveni rezultati pokazuju da se bolji ekstrakcijski kapacitet postiže primjenom binarnog sustava otapala tj. vodenih otopina etanola, metanola i acetona osim kod flavonoida. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazuju da maseni udio fenolnih spojeva značajno varira ovisno o dodatku vode u ekstrakcijsko otapalo (etanol, metanol i aceton), što je u skladu s istraživanjima drugih autora prema kojima ekstrakcijski kapacitet fenolnih spojeva u raznim

biljnim vrstama ovisi o vrsti i udjelu otapala (Aerias i sur., 2000; Meot Duros i Magne, 2009; Nabet i sur., 2016). Na temelju dobivenih rezultata masenih udjela fenolnih spojeva iz lista motar, može se zaključiti da list motar ima visoke masene udjele fenolnih spojeva, ovisno o primjenjenom ekstrakcijskom otapalu, te kao takav predstavlja nov i zanimljiv izvor fenolnih spojeva u prehrambenoj industriji.

5 ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u okviru provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakti lista motar (*Crithmum maritimum* L.) bogat su izvor fenolnih spojeva, spektrofotometrijski su određeni visoki maseni udjeli ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i flavonoida te kao takav predstavlja nov i zanimljiv izvor fenolnih spojeva u prehrambenoj industriji.

2. Najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola postignut je primjenom vodene otopine etanola, dok flavonoida primjenom čistog otapala metanol.

3. Dodatak vode u otapalo doprinosi većem ekstrakcijskom kapacitetu izolacije fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola) iz lista motar.

4. Primjenom vode kao ekstrakcijskog otapala, maseni udjeli fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima su samo nešto niži u odnosu na dobivene ekstrakte primjenom vodenih otopina etanola, metanola, acetona i etanol-metanol-aceton-voda.

6 POPIS LITERATURE

- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry, *Ultrasonics Sonochemistry* **11**: 261-265
- Areias F.M., Valentão P., Andrade P.B., Ferreres F., Seabra R.M. (2000) Flavonoids and phenolic acids of sage: influence of some agricultural factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 6081-6084
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering* **117**: 426-436
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191-203
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2004) Food Chemistry. 3.izd., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, str. 806-860
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. 1.izd., Woodhead Publishing, str. 5-13
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317-333
- Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosin-Gutierrez, I. (2007) Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 992-1002
- Cook N. C., Samman S. (1996) Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry* **7**: 66-76
- Čović, D., Bojić, M., Medić-Šarić, M. (2009) Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farmaceutski glasnik* **65**: 693-704
- d'Alessandro, L. G., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K. (2013) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification technology* **93**: 42-47

- Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina, M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J. (2007) Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition* **137**: 718S-737S
- Fennema, O.R. (1985) Food Chemistry, Marcel Dekker, Inc, New York, str. 557-564
- Grić, Lj. (2005) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 3.izd., Ex libris. str. 254
- Han, X., Shen, T., Lou, H., (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* **8**: 950–988
- He, J., Giusti, M. (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Natural Products* **1**: 163 – 187
- Howard, L. R., Clark, J. R., Brownmiller, C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growin season. *J Sci Food Agr.* **83**: 1238-1247
- Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821-1835
- Jallali, I., Megdiche, W., M'Hamdi, B., Oueslati, S., Smaoui, A., Abdelly, C., Ksouri, R. (2012) Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. With physiological stage and extraction method. *Acta Psysiologiae Plantarum* **34**: 1451-1459
- Kovačić, S., Nikolić, T., Ruščić, M., Milović, M., Stamenković, V., Mihelj, D., Jasprica, N., Bogdanović, S., Topić, J. (2008) Flora jadranske obale i otoka – 250 najčešćih vrsta, Školska knjiga. str. 246, 247
- Lafay, S. i Gil-Izquierdo, A. (2008) Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem. Rev.* **7**: 301–311
- Lakenbrink, C., Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt U.H. (2000) Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2848-2852
- Lapornik, B., Prosek, M., Golc, Wondra, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**: 214-222

- Lesinger, I. (2006) Liječenje začinskim biljem, Adamić. str. 244, 245
- Liu, Q., Cai, W., Shao, X. (2008) Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta* **77**: 679-683
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- Meot-Duros, L., Magne, C. (2009) Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 37-41
- Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Burlo, F., Hernandez, F., Carbonell-Barrachina, A. A., Madani, K., Larbat, R. (2016) Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties* **20**: 1843-1855
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., Câmara, J.S. (2007) Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry* **105**: 204-214
- Pereira, C.G., Barreira, Luí., da Rosa Neng, N., Nogueira, José.Manuel.Florê., Marques, Cá., Santos, Tamá.F., Varela, Joã., Custódio, Luí. (2017) Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: In vitro antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L. *Food and Chemical Toxicology* **107**: 581-589
- Pietta P. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**: 1035 -1042
- Putnik P., Bursać Kovačević D. B., Penić M., Fegeš M., Dragović-Uzelac V. (2016) Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian Sage Leaves for the Optimal Yield of Polyphenols: HPLC-DAD Identification and Quantification. *Food Analytical Methods* **9**: 2385- 2394
- Rapić, V. (1994) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb, str. 56 - 58
- Robards K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**: 401-436

- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1094-1117
- Schilcher, H., Imming, P., Goeters, S. (2005): Pharmacology and Toxicology. U: Franke R, Schilcher H (Ur.), Chamomile Industrial Profiles. Boca Raton: CRC Press
- Schulzki G., Nüßlein B., Sievers H. (2017) Transition rates of selected metals determined in various types of teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and herbal/fruit infusions. *Food Chemistry* **215**: 22-30
- Shahidi, F., Naczki, M. (1995) Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc, Lancaster, England.
- Shahidi, F., Naczki, M. (2004) Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects. 1. izd., CRC Press, Boca Raton
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144-158
- Sun, T., Ho, C. (2005) Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* **90**: 743-749

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Iva Devčić

Iva Devčić