Utjecaj perioda branja na fenolni sastav i antioksidacijska svojstva petrovca

Mihajlovski, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:763097

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UTJECAJ PERIODA BRANJA NA FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA PETROVCA

ZAVRŠNI RAD

MARIJA MIHAJLOVSKI
Matični broj: 1052

Split, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
SMJER: KEMIJSKO INŽENJERSTVO

UTJECAJ PERIODA BRANJA NA FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA PETROVCA

ZAVRŠNI RAD

MARIJA MIHAJLOVSKI
Matični broj: 1052

Split, rujan 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
ORIENTATION: CHEMICAL ENGINEERING

HARVEST TIME INFLUENCE ON PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SEA FENNEL

BACHELOR THESIS

MARIJA MIHAJLOVSKI
Parent number: 1052

Split, September 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemijske tehnologije; smjer Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
Pomoć pri izradi:: Doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov

UTJECAJ PERIODA BRANJA NA FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA PETROVCA

Marija Mihajlovski, 1052

Sažetak:
Petrovac (*Crithmum maritimum* L.) se od davnina koristi u tradicionalnoj medicini i kulinarstvu, a posljednjih godina je ponovno otkriven i postao je zvijezda priobalne gastronomije. Iako je ova biljka predmet velikog broja istraživanja, ona su uglavnom usmjerena na ispitivanja eteričnog ulja, dok su istraživanja polarnih komponenti znatno rjeđa. U ovom radu su istraženi kemijski sastav i antioksidacijska aktivnost polarnih ekstrakata petrovca ubranog u različitim periodima vegetacije (veljača, travanj, lipanj, kolovoz, listopad i prosinac). Fenolni spojevi u ekstraktima određeni su HPLC tehnikom, dok su za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene ORAC i Briggs-Rauscher. Dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima prethodnih istraživanja koja su uključivala određivanje ukupnih fenola metodom flavonoida i neflavonoida, klorogenske kiseline te biološke aktivnosti uzoraka metodama FRAP i DPPH. Iz dobivenih rezultata izvedeni su zaključci o promjenama u sastavu i svojstvima petrovca u različitim periodima vegetacije.

Ključne riječi: petrovac, etanolni ekstrakt, fenoli, HPLC, ORAC, Briggs-Rauscher metoda

Rad sadrži: 31 stranicu, 5 slika, 7 tablica, 46 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. Dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur. - član
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - član-mentor

Datum obrane: 27. rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate study of Chemical Technology; Orientation: Chemical Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.
Mentor: Assistant professor Ivana Generalić Mekinić
Technical assistance: Assistant professor Ivica Ljubenkov

HARVEST TIME INFLUENCE ON PHENOLIC COMPOSITION AND ANIOXIDANT PROPERTIES OF SEA FENNEL

Marija Mihajlovski, 1052

Abstract:
Since ancient times sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) has been used in folk medicine and culinary, and in last few years this plant has been rediscovered, and became the star of coastal cuisine. Numerous studies investigated this plant, but they were usually focused on its essential oil, while researches on its polar components were scarce. In this work, chemical composition and antioxidant activity of polar extracts of sea fennel collected in different vegetation periods (February, April, June, August, October, and December) were investigated. Phenolic compounds were detected by HPLC, while for antioxidant activity testing, ORAC and Briggs-Rauscher methods were used. The obtained data were compared with those from previous studies which included determination of total phenols, flavonoids and nonflavonoids, chlorogenic acid, and also biological activity by FRAP and DPPH methods. The obtained results were used to create conclusions about changes in composition and properties of sea fennel during a one-year period.

Keywords: sea fennel, ethanolic extracts, phenolics, HPLC, ORAC, Briggs-Rauscher method

Thesis contains: 31 pages, 5 figures, 7 tables, 46 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivica Blažević, PhD, assistant prof. — chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD — member
3. Ivana Generalić Mekinić, PhD, assistant prof — supervisor

Defence date: September 27th, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić, u razdoblju od ožujka do rujna 2016. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na ukazanom povjerenju, vodstvu i pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Ivici Ljubenkovu za pomoć pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Također, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na nesebičnoj podršci tijekom školovanja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada je bio istražiti fenolni sastav ekstrakata petrovca ubranog u različitim periodima vegetacije korištenjem visoko-djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) te njihovu antioksidacijsku aktivnost korištenjem metoda ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) i Briggs-Raucher oksidacijskom reakcijom (BR).

Dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima istraživanja Mihajlovski (2015) i Lončar (2015) u cilju određivanja utjecaja različitih perioda vegetacije biljke na njen sastav i svojstva.

SADRŽAJ

UVOD **1**

1. OPĆI DIO **2**

1.1. HALOFITI 2

1.2. PETROVAC 3

1.2.1. Kemijski sastav petrovca *4*

1.2.2. Znanstvena istraživanja petrovca *4*

1.3. SLOBODNI RADIKALI, OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDANSI 8

1.3.1. Metode određivanja antioksidacijske sposobnosti *9*

1.3.1.1. ORAC metoda 10

1.3.1.2. Briggs-Raucher metoda 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO **12**

3.1. KEMIKALIJE I UREĐAJI 12

3.2. HPLC ANALIZA 13

3.3. ORAC METODA 15

3.4. BRIGGS-RAUSCHER OSCILACIJSKA METODA 17

3.5. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA 18

4. REZULTATI I RASPRAVA **19**

5. ZAKLJUČAK **26**

6. LITERATURA **27**

UVOD

Petrovac (*Chritmum maritimum* L.) pripada biljkama iz reda *Apiales*, porodici štitarki (*Apiaceae*) i rodu *Crithmum*, a u narodu je poznatiji pod nazivima motar, matar, šćulac ili biljka Sv. Petra. Petrovac je tradicionalna, samonikla, jestiva mediteranska biljka čija je upotreba u tradicionalnoj medicini i kulinarstvu poznata od davnina. Ukiseljena u vinskom octu koristila se u prehrani ljudi te za prevenciju bolesti (skorbuta, dijareje, urinarnih tegoba i sl.), a za vrijeme ratova i neimaštine se svakodnevno nalazila na jelovnicima priobalnog stanovništva. Iako je uporaba petrovca u kulinarske svrhe poznata još od davnina, ova biljka je jedno vrijeme bila u potpunosti zaboravljena, a danas ponovno uživa u tituli "zvijezde" priobalne gastronomije.

Dosadašnja istraživanja na biljci petrovac bila su uglavnom usmjerena na istraživanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava eteričnog ulja petrovca s različitih lokaliteta u Turskoj, Portugalu, Italiji, Francuskoj, Španjolskoj i Hrvatskoj te su bile vođene hipotezom da nekoliko različitih kemotipova ove biljke raste na području Mediterana. Eterično ulje petrovca je relativno dobro istraženo. S druge strane, iako je poznato da je dominantan spoj u ovoj biljci klorogenska kiselina podaci o polarnim spojevima su znatno rjeđi.

Kako je poznato je da različiti abiotski i biotski čimbenici, kao što su lokacija s koje je biljka ubrana, dio biljke, vrijeme berbe, klimatske prilike, ampelotehničke mjere uzgoja, utjecaj sunčevog zračenja, itd, imaju značajan utjecaj na kemijski sastav pojedine biljke, u ovom su radu istraženi i uspoređeni kemijski sastav i antioksidacijska svojstva biljke petrovac, ubrane u različitim periodima vegetacije tijekom jednogodišnjeg ciklusa.

1. OPĆI DIO

1.1. HALOFITI

Halofiti (slanjače) su biljke prilagođene životu na staništima bogatim lako topljivim solima (natrijev klorid, sulfat i karbonat). Halofiti, osim u moru te uz obalu mora i slanih jezera, rastu i na kopnu u stepskim i pustinjskim područjima gdje dolazi do tzv. „iscvjetavanja“ soli iz podzemnih voda na površinu za vrijeme sušnih razdoblja. Stoga, prema tipu staništa razlikujemo kopnene (*terestričke*), močvarne (*higrohalofite*) i vodene (*hidrohalofite*) halofitne vrste.

Za razliku od većine ostalih biljka, halofiti su se prilagodili životu na slanim staništima pa nagomilavajući sol u svojim stanicama postižu veće osmotske vrijednosti od onih u tlu ili slanoj vodi. Prema načinu kako ove biljke reguliraju sadržaj soli u svojim stanicama, razlikujemo:

(1) *Sukulentne halofite* - nakupljaju velike količine vode - tzv. solna sukulencija

(2) *Nesukulentne halofite* - izlučuju suvišnu sol iz tijela ili na površinu listova

(3) *Euhalofiti* - nakupljaju soli tijekom cijelog vremena rasta.

U Hrvatskoj, osim u moru, halofiti rastu na morskoj obali u pojasu prskanja mora, a mjestimice i podalje od mora, gdje je za snažnih vjetrova izražena posolica pa je tlo zaslanjeno. (*1*)

Na grebenastoj obali Dalmacije, halofitna vegetacija ne broji veliki broj biljnih vrsta, a biljka petrovac, koja je pak predmet istraživanja u ovom radu je jedna od najrasprostranjenijih.

1.2. PETROVAC

Petrovac (*Crithimum maritimum* L.) je halofitna trajnica koja pripada porodici štitarki (Apiaceae). Petrovac samoniklo raste na priobalnim područjima u neposrednoj blizini mora gdje je izložen posolici, ali nikad u području gdje doseže plima, stoga se nerijetko kaže da petrovac raste na staništima "od bure". Sol na lišću biljke širi pore i tako omogućava bolji prodor vlage i jutarnje rose dok kod nižih temperatura sprječava smrzavanje biljke. (*2,3*)

Petrovac je trajnica, a izgledom je zeljasti grm koji može narasti i do 50 cm. Donji dijelovi biljke su najčešće drvenasti, dok se na višegodišnjoj stabljici nalaze plavo-zeleni listovi s vertikalno položenim lapovima. Listovi petrovca su obično dugi do 5 cm, a široki oko 6 mm. U kolovozu i rujnu biljka cvjeta tako da se na vrhu razvijaju štitasti cvatovi s zeleno-žutim cvjetovima koji sadrže pet latica. Cvjetovi petrovca su dvospolni pa je biljka samooplodna. Plod je duguljast i rebrast, žućkaste ili purpurne boje, a izgledom podsjeća na ječam. Petrovac najčešće nastanjuje plaže ili stijene duž obale pa je nerijetko nazivaju "cvijetom iz kamena". (*3,4*)

Petrovac je raširen po cijelom obalnom pojasu Europe, od Britanije prema jugu, duž obale Mediterana i Crnog mora. (*5,6*) Na našem priobalju raste u neposrednoj blizini mora, gdje ga u izobilju možemo pronaći između stijena (vapnenaca koje krase obalu) i pijeska. Petrovac, iako halofitna biljka koja uglavnom svoje stanište ne nalazi na mjestima udaljenima od mora, je zapravo vrlo prilagodljiva na različite vrste tla, čak i na ona siromašna hranjivim tvarima. Preživljava čak i na alkalnim tlima, ali mu ne odgovaraju mjesta zaklonjena od sunca. (*2,3,7*)



Slika 1. Petrovac (*Chritmum maritimum L.*) (*8*)

1.2.1. Kemijski sastav petrovca

Petrovac je poznata aromatična i ljekovita biljka. Izvrstan je izvor vitamina C pa su pomorci u prošlosti ukiseljene listove petrovca nosili na plovidbe kao lijek protiv skorbuta. Petrovac obiluje i mineralnim solima, ω-3 i ω-6 masnim kiselinama, jodom, karotenoidima, organskim kiselinama i fenolima. (*3,4,9,10*)

Mladi izboji i plodovi petrovca su bogati i hlapljivim spojevima, od kojih su najznačajniji limonen, sabinen, dilapiol, *α*-pinen, *γ*-terpinen, *p*-cimol, apiol, *cis-ß*-ocimen, timol i terpinen-4-ol, *α*-tujon, kamfen, limonen, cineol, *trans-ß*-ocimen, terpinolen, linalol, *trans-p*-menten-1-ol, i miristicin. (*6,11-16*)

Sadržaj eteričnog ulja u petrovcu značajno varira u različitim dijelovima biljke, u lišću se kreće oko 0,5 %, u stabljici je znatno niži, dok udio ulja u cvijetu može prijeći čak 2 %. (*3,6*)

1.2.2. Znanstvena istraživanja petrovca

Pateira i sur. (*11*) su istraživali fizikalna svojstva (relativnu gustoću, refrakcijski indeks, optičku rotaciju i sposobnost miješanja s etanolom) i kemijski sastav (plinskom kromatografijom s masenom spektofotometrijom, engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) eteričnog ulja petrovca ubranog s različitih lokaliteta u Portugalu (ukupno 44 uzorka). Također, biljke su ubrane u tri različita vegetacijska perioda (u vegetativnom stanju, tijekom cvjetanja i kada se razvio plod) te su analizirana eterična ulja dobivena iz različitih dijelova biljke (nadzemnog dijela, cvata, lišća i peteljki). Iako su postojale razlike u sastavu i svojstvima istraživanih ulja, općenito najzastupljeniji spojevi su bili dilapiol, sabinen, *γ*-terpinen i timol metil eter, a dobiveni rezultati su pokazali kako u Portugalu postoje dva različita kemotipa ove biljke.

Baser i sur. (*17*) su istraživali kemijski sastav eteričnog ulja petrovca s različitih lokaliteta u Turskoj i rezultati njihove studije pokazuju kako su glavni sastojci ulja bili sabinen (26,9 %), limonen (24,2 %), *γ*-terpinen (19,3 %) i terpinen-4-ol (9,0 %).

Eterično ulje petrovca istraživali su i Ruberto i sur. (*12*) koji su ispitivali i njegova antioksidacijska i antibakterijska svojstva. Za testiranje antioksidacijske aktivnosti u ovom istraživanju korištene su dvije metode koje uključuju lipidne medije, i to metoda TBARS (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Species*) i spektrofotometijska metoda određivanja hidroksiperoksil-diena. Rezultati istraživanja pokazuju da je ulje petrovca pokazalo antioksidacijski kapacitet koji se u nekim slučajevima mogao usporediti sa učinkom poznatog sintetskog antioksidansa, butil hidroksitoluena (BHT). Antimikrobna svojstva su ispitana na dvadeset pet bakterijskih vrsta, uključujući životinjske i biljne patogene, bakterije koje uzrokuju trovanje hranom i njeno kvarenje.

Senatore i sur. (*13*) su istraživali eterična ulja izolirana iz nadzemnih dijelova petrovca koji raste na području Antalije i Mersina (Turska). Kemijski sastav ulja je analiziran GC i GC-MS tehnikom, a udio ulja se kretao od 0,17-0,19 %. Identificirano je 20 različitih spojeva; jedan uzorak je bio bogat *β*-felandrenom (30 %) i timol etil eterom (25 %), dok je drugi sadržavao velike količine *γ*-terpinena (24 %) i dilapiola (21 %). Procjena antibakterijske aktivnosti je pokazala da ulja pokazuju vrlo dobru aktivnost, uglavnom prema gram-pozitivnim bakterijskim vrstama.

Özcan i sur. (*14*) su istraživali sastav eteričnog ulja petrovca sakupljenog s različitih lokaliteta u Turskoj. Analizirani uzorci su klasificirani u tri grupe obzirom na glavne komponente u ulju; prva grupa sabinen, *γ*- terpinen, metil-timol, terpinen-4-ol; dilapiol i sabinen; druga grupa *γ*-terpien, metil-timol i limonen te treća grupa *p*-cimen, metil-timol i *γ*-terpinen. Pokazalo se da su uzorci koji su brani ranije imali veće količine *p*-cimena te da zamrzavanje uzoraka nije imalo značajniji utjecaj na sastav ulja.

Maleš i sur. (*15*) su istraživali sadržaj flavonoida, tanina i ukupnih polifenola u uzorcima petrovca, sakupljenih na tri različita, geografski odvojena lokaliteta duž Jadranske obale te u različitim periodima rasta biljke. Sadržaj flavonoida bio je 0,08-0,42 %, a najveći je bio u periodu prije cvjetanja. Sadržaj tanina bio je od 0,10-2,7 %, dok je sadržaj ukupnih polifenola varirao od 4,7-9,5 %. Najveći sadržaj tanina i ukupnih polifenola bio je u uzorcima prije i na samom početku perioda cvjetanja.

Özcan i sur. (*18*) su istraživali ulja izolirana hidrodestilacijom iz svježih nadzemnih dijelova petrovca. Uzorkovani su mladi listovi i stabljike petrovca, sakupljeni na dvije različite lokacije u Turskoj te su analizirani GC-MS tehnikom. Identificirane su 23 komponente, a ulja su sadržavala uglavnom monoterpene (89-99 %), i to *γ*-terpinen (36 % i 32 %), *β*-felandren (21 % i 22 %) i sabinen (13 % i 9 %).

Meot-Duros i sur. (*19*) su istraživali polarne spojeve u uzorcima petrovca, i to u dvije populacije koje rastu na različitim staništima: pješčanom, brdovitom i stjenovitom području. Autori su dokazali da su u najvećoj količini u biljci prisutni ugljikohidrati (saharoza, glukoza), zatim organske kiseline i fenolni spojevi, od kojih je najzastupljenija klorogenska kiselina. Ukupni fenoli i klorogenska kiselina su praćeni tijekom jedne godine, kao i antioksidacijska aktivnost. Prema dobivenim je rezultatima vidljivo da postoje razlike između istraživanih populacija; biljke koje rastu na pjeskovito-brdovitom području sadrže više klorogenske kiseline od onih koje rastu na liticama. Osim toga, prva populacija je pokazala bolju antiradikalnu aktivnost.

Meot-Duros i sur. (*20*) su po prvi puta istovremeno pratili antioksidacijska i antimikrobna svojstva različitih halofita među kojima je bio i petrovac. Antimikrobna svojstva su testirana na dvanaest bakterijskih vrsta i kvasaca. Sve ispitivane halofitne vrste su imale visoku antioksidacijsku aktivnost što omogućava potencijalnu primjenu tih biljaka u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Meot-Duros i sur. (*21*) su frakcionirali kloroformski ekstrakt lišća petrovca i iz njega izolirali spojeve falkarindiol i poliacetilen koji su prisutni u biljkama iz obitelji Apiaceae. Strukture spojeva su potvrđene pomoću nuklearne magnetne rezonance (NMR). Dokazano je da falkarindiol snažno inhibira rast *Micrococcus luteus* i *Bacillus cereus*, uz minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) od 50 μg/mL, a ovaj spoj je pokazao i citotoksična svojstva. Rezultati istraživanja ukazuju na to da bi se petrovac osim u prehrambenim proizvodima i kozmetici, mogao koristiti i kao biopesticid ili pri kreiranju novih antibiotika.

Kulišić-Bilušić i sur. (*16*) su također istraživali eterično ulje petrovca ubranog u Dalmaciji primjenom GC-MS tehnike. Glavni sastojci ulja bili su limonen (58,4 %) , sabinen (26,5 %), terpinen-4-ol (5,6 %) i *γ*-terpinen (2,8 %). Testirana eterična ulja nisu pokazivala antiradikalna svojstva testirana 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) metodom, dok su pokazali antioksidacijsko djelovanje primjenom metoda *β*-karoten i TBARS.

Siracusa i sur. (*22*) su istraživali sastav fenola i antioksidacijsku aktivnost vodenih infuzija petrovca prije i nakon dvofaznog *in vitro* probavnog procesa. U uzorcima je identificirana klorogenska kiselina i njeni optički izomeri kao glavni spojevi. Ekstrakti su pokazali dobro antioksidacijsko djelovanje prije *in vitro* probavnog procesa, a testirani su DPPH metodom, metodom izbjeljivanja β-karotena i bakar-

induciranom oksidacijom nisko-molekularnog lipoproteina (engl. *Low-Density Lipoprotein,* LDL). Sadržaj ukupnih fenola značajno se smanjio kod probavljenih uzoraka, a oslabilo je i njihovo antioksidacijsko djelovanje, što pokazuje da određeni fenolni spojevi nisu stabilni pod simuliranim uvjetima probave.

Houta i sur. (*23*) su istraživali sadržaj fenola, antibakterijsko i antimikrobno djelovanje različitih dijelova biljke petrovac (sjemena, stabljike, lišća i cvijeća) koja raste na jugoistočnom području Tunisa. Analizirani dijelovi biljke pokazali su različiti sadržaj ukupnih fenola (9,4-17,1 mg ekvivalenata galne kiseline (engl. *Galic Acid Equivalents*; GAE/g), flavonoida (3,7-7,1 mg ekvivalenata epikatehina (engl. *Epicatechnin Equivalents*) EC/g) i tanina (0,8-5,2 mg ekvivalenata katehina (engl. *Catechnin Equivalents*) CE/g). Ekstrakt sjemenki je pokazao najbolju aktivnost prema DPPH, najbolju antibakterijsku aktivnost prema gram-negativnim bakterijama je pokazao ekstrakt stabljike, dok je prema gram-pozitivnim bakterijama bio najučinkovitiji ekstrakt sjemenki petrovca.

Jallali i sur. (*24*) su istraživali sastav petrovca, i to fenole i eterična ulja te antioksidacijski i antibakterijski potencijal tih metabolita. U sastavu ulja dominirali su oksidirani monoterpeni, koji imaju slabo antioksidacijsko djelovanje u odnosu na ekstrakte, ali im je antimikrobna aktivnost bolja.

Mihajlovski (*7*) je u završnom radu ispitivala fenolni profil petrovca kroz različite periode vegetacije. Dobiveni rezultati pokazuju da najviše ukupnih fenola sadrži lišće biljke ubrane u travnju (2215 mg GAE/L), a najmanje lišće iz kolovoza (1240 mg GAE/L). U svim uzorcima dominirali su neflavonoidi (94-97 %) u odnosu na flavonoide. Rezultati određivanja udjela klorogenske kiseline potvrđuju dominaciju ovog neflavonoidnog spoja u ekstraktima (564-1628 mg/L). Najbogatije klorogenskom kiselinom je bilo lišće petrovca ubrano u travnju i listopadu, a najsiromašnije lišće iz kolovoza.

Lončar (*25*) je ispitivala biološku aktivnost ekstrakta petrovca u različitim periodima vegetacije. Metodom FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Properties*) se odredila redukcijska aktivnost uzoraka, a najbolje djelovanje je imao ekstrakt lista petrovca iz travnja, dok je ekstrakt iz kolovoza imao najslabije djelovanje. Metodom DPPH se odredio antiradikalni kapacitet ekstrakta te se pratila kinetika reakcije tijekom 60 minuta. Najveći postotak inhibicije DPPH radikala imali su ekstrakt lista petrovca iz travnja (53 %) i lipnja (58 %), dok su ostali ekstrakti postigli inhibiciju od oko 45 %.

Generalić Mekinić i sur. (*6*) su istraživali kemijski profil i biološki potencijal ekstrakata i eteričnog ulja petrovca. Utvrđeno je da su dominantni spojevi eteričnog ulja i etanolnog ekstrakta, limonen (57,5-74,2 %) i klorogenska kiselina (0,7-8,1 mg/g). Dobivenim uzorcima i njihovim glavnim komponentama su određene antioksidacijska, kolinesteraza inhibicijska i vazodilatacijska aktivnost. Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja je bila iznimno niska u usporedbi s ekstraktima. Ekstrakt cvijeta i klorogenska kiselina je pokazala jače vazodilatacijsko svojstvo u odnosu na eterično ulje i limonen. Dobiveni rezultati ukazuju na utjecaj količine dominantnih spojeva u ulju i ekstraktima na biološka svojstva petrovca.

1.3. SLOBODNI RADIKALI, OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDANSI

Slobodni radikal je nestabilna kemijska čestica, atom, molekula ili dio molekule, koja je sposobna samostalno postojati, a koja posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona. (*26,27*) U živom se organizmu slobodni radikali proizvode pri normalnim fiziološkim procesima te imaju važnu ulogu u odvijanju brojnih staničnih funkcija. Kada se slobodni radikali u stanici nađu u suvišku, oni narušavaju stabilnost drugih molekula u okolini da bi postigli vlastitu ravnotežu tako da pokreću nepoželjne lančane reakcije koje dovode do ***oksidacijskog stresa***. Uslijed ove pojave dolazi do oštećenja biomolekula, tkiva, smrti stanica i razvoja različitih bolesti. (*28-31*) Oksidacijski stres uzrokuju reaktivni kisikovi oblici (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i reaktivni dušikovi oblici (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS). ROS su metaboliti molekularnog kisika koji imaju višu reaktivnost od molekularnog kisika i generirani su kao nusprodukti normalnog aerobnog organizma. Do oksidacijskog stresa dolazi onda kad je stanica izložena ROS više no što može trenutno primiti. U većoj mjeri ROS se proizvode u patološkim uvjetima i tijekom izloženosti stresu, ali mogu se unijeti u organizam i iz vanjskog okruženja (nepravilna prehrana, pušenje, konzumacija alkohola, UV zračenje, zagađenje okoliša, itd.). Glavna posljedica oksidacijskog stresa je oštećenje na bazama nukleinskih kiselina, masti i proteina što može ozbiljno naštetiti funkciji stanice i njenoj održivosti. Oksidacijski stres se može javiti i kao rezultat različitih degenerativnih bolesti ili može biti uzročni čimbenik u njihovom razvoju. Stanični enzimi (katalaza, glutation peroksidaza i superoksid dismutaza) štite stanice od

oksidacijskog stresa. (*32*) Ipak, obrana tijela protiv slobodnih radikala osim endogenog (enzimatskog ili neenzimatskog), može biti i egzogenog (prehrambenog) podrijetla (karotenoidi, vitamini…). (*28,31*)

Radikali se obično stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim radikalom pri čemu postaju neaktivni i lančane reakcije se prekidaju. (*28*) ***Antioksidansi*** su tvari koje pri malim koncentracijama sprječavaju ili usporavaju oksidaciju lako oksidirajućih molekula. Tvari koje imaju sposobnost djelovanja kao antioksidansi su već spomenuti enzimi (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza i dr.), velike molekule (albumin, ceruloplazmin, feritin te drugi proteini), male molekule (askorbinska kiselina, glutation, urična kiselina, tokoferol, karotenoidi, polifenoli i dr.) te neki hormoni (estrogen, angiotesin, melatonin i dr.). Prema topljivosti, antioksidanse dijelimo na hidrofilne (npr. vitamin C, neki fenolni spojevi i sl.) i hidrofobne (npr. vitamin E, karotenoidi, i sl.). (*32*)

Antioksidansi najčešće neutraliziraju slobodne radikale donirajući im svoj elektron te na taj način prekidaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprječavaju njihovo daljnje štetno djelovanje. Donirajući svoj elektron, antioksidansi ne postaju nestabilni. Osim što sprječavaju neželjene procese oksidacije, antioksidansi mogu doprinijeti smanjenju oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala. (*32,33*)

1.3.1. Metode određivanja antioksidacijske sposobnosti

Antioksidansi sprječavaju lančane reakcije slobodnih radikala preko dva glavna mehanizma: SET (engl. *Single Electron Transfer*) i HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) pa se upravo na temelju toga razlikuju metode određivanja antioksidacijskih svojstava i dijele se na: (*6,30,34,35*)

1) Metode koje se temelje na mehanizmu prijenosa elektrona (SET)
2) Metode koje se temelje na mehanizmu prijenosa atoma vodika (HAT)
3) Ostale metode koje se zasnivaju na nekom drugom mehanizmu ili kombinaciji ovih dvaju navedenih.

Metode koje spadaju u prvu skupinu tj. SET metode su: FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*); CUPRAC (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*); DPPH (prema nazivu radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil); ABTS (prema nazivu radikala 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonske kiseline); FC (Folin-Ciocalteu metoda određivanja fenolnih spojeva), itd.

Metode koje se temelje na mehanizmu prijenosa atoma vodika (HAT) su metoda ORAC (engl. *Oxygen Radical Apsorbance Capacity*), TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*), *ß*-karoten (metoda izbjeljivanja *ß*-karotena), SASA (engl. *Scavenging Activity of Superoxide Anion*), dok u stale metode spadaju metoda TOSC (engl. *Total Oxidant Scavenging Capacity*), BR (inhibicija Briggs-Rauscher oscilacijske reakcije), kelatiranje (sposobnost stvaranja kelata s ionima metala), CL (kemilumiscencija), PCL (fotokemiluminiscenija), itd.

SET metode opisuju sposobnost potencijalnog antioksidansa da prijenosom jednog elektrona reducira neku tvar uključujući metale, karbonile i radikale. Kod ovih metoda uključene su dvije komponente u reakciji i to antioksidans i oksidans, a reakcija neutralizacije oksidansa se opisuje sljedećim izrazom:

Oksidans + e^- (iz antioksidansa) → reducirani oksidans + oksidirani antioksidans

Izdvajanje elektrona iz molekule antioksidansa najčešće uzrokuje promjenu boje otopine koja je proporcionalna koncentraciji antioksidansa u reakcijskoj smjesi. (*29*)

HAT metode mjere sposobnost antioksidansa (AH) da spari nespareni elektron slobodnog radikala ($X^{\cdot}$) donirajući mu proton (H), što se može prikazati reakcijom: (*30,34,36*)

$$X^{\cdot} + AH \rightarrow XH + A^{\cdot}$$

1.3.1.1. ORAC metoda

ORAC (engl. *Oxygen Radical Apsorbance Capacity*) metoda je naširoko korištena metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti sprječavanjem lančanih reakcija radikala. Ova metoda spada u HAT skupinu antioksidacijskih metoda i njom se mjeri sposobnost antioksidansa da inhibira peroksil radikale. Kao izvor radikala se najčešće koristi spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid) koji se pri temperaturi od 37°C raspada stalnom brzinom. (*30*)

Kod ORAC metode, antioksidansi djeluju na način da doniraju proton radikalu, a nastali radikal AAPH reagira s fluoresceinom pri čemu dolazi do pada fluorescencije. (*37-40*)

Ukoliko u smjesi nema antioksidansa slobodni radikali će brzo "ugasiti" flourescenciju medija jer antioksidans štiti fluorescentnu molekulu od razgradnje i na taj način održava intenzitet flourescencije. Antioksidacijska aktivnost se određuje iz razlike površina ispod krivulje koja prati pad flourescencije reakcijske smjese u vremenu za uzorak (antioksidans) i krivulje dobivene za slijepu probu, a ORAC vrijednosti se najčešće izražava preko Trolox ekvivalenta. (*30,37-41*)

ORAC metoda je vrlo jednostavna, osjetljiva, pouzdana, ima u potpunosti definirani mehanizam i finalnu točku mjerenja te su moguća ispitivanja hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa, međutim zahtjeva posebne uređaje sa sposobnošću mjerenja fluourescencije.

1.3.1.2. Briggs-Raucher metoda

Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom (BR) se mjeri antioksidacijska aktivnost uzorka tako što se prati vrijeme inhibicije oscilacija u sustavu tijekom reakcije antioksidansa s hidroperoksil radikalom (HOO˙). (*6,42*) Oscilacijski BR sustav sastoji se od zakiseljenog jodata, vodikovog peroksida, manganovih iona i malonske kiseline. Smjesa ovih reagensa mijenja boju naizmjence iz bezbojne u žutu te u plavu (u prisustvu škroba), a dodatkom antioksidansa oscilacije se zaustavljaju. Smatra se da je uzrok zaustavljanja oscilacija reakcija između antioksidansa i hidroperoksil radikala (HOO˙). (*6,36,42-44*)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE I UREĐAJI

Kemikalije:

- Fosfatna kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Metanol (HPLC), Fluka, Buchs, Švicarska
- Acetonitril (HPLC) Fluka, Buchs, Švicarska
- Vanilinska kiselina, Merck, Darmstat, Njemačka
- Kafeinska kiselina, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Cimetna kiselina, Merck, Darmstat, Njemačka
- Klorogenska kiselina Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Natrijev fosfat dihidrat, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Flourescein R.G., p.a., Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidin) dihidroklorid granularni, 97 %; Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Trolox, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Malonska kiselina, Merck, Darmstad, Njemačka
- Kalij-jodat, p.a. Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Mangan(II) sulfat monohidrat, p.a. Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Sulfatna kiselina, Merck, Darmstad, Njemačka
- Vodikov peroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Škrob, Kemika, Zagreb, Hrvatska.

Uređaji:

- HPLC Perkin Elmer Series 200, s UV-Vis detektorom
- Analitička Vaga Kern Model ALS 120-4, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Mikrotitarski čitač pločica, Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., Bad Friedrichshall, Njemačka).

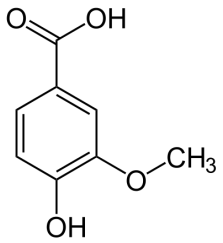
3.2. HPLC analiza

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih spojeva provedena je primjenom HPLC tehnike. HPLC sustav na kojem je provedena analiza je Perkin Elmer Series 200 opremljen UV-Vis detektorom. (*7*) Uređajem se upravlja preko programske podrške TotalChrom Workstation preko kojeg se radi i obrada kromatograma.

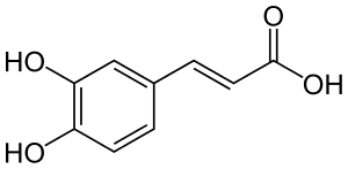
Reagensi:

Otapala korištena za određivanje spojeva u ekstraktima primjenom HPLC tehnike, fosfatna kiselina, metanol i acetonitril su odgovarajuće HPLC čistoće.

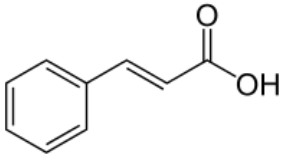
Opisanom HPLC metodom identificirane su i kvantificirane sljedeće fenolne kiseline u uzrocima petrovca: vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, cimetna kiselina i klorogenska kiselina. Strukture istraživanih spojeva prikazane su na slici 2.



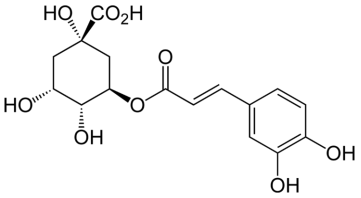
vanilinska kiselina



kafeinska kiselina



cimetna kiselina



klorogenska kiselina

Slika 2. Strukture istraživanih fenolnih kiselina *(45,46)*

Tablica 1. Glavne karakteristike HPLC metode korištene za identifikaciju i kvantifikaciju klorogenske kiseline. (*7*)

Kolona	Ultra Aqueous C_{18} 5µm, Restek		
Duljina kolone × unutarnji promjer	250 × 4.6		
Protok	0,8 mL/min		
Temperatura kolone	30°C		
Volumen injektiranja	20 µL		
Eluenti	otapalo A (0,2 % fosfatna kiselina, v/v) otapalo B (metanol/acetonitril, 50:50, v/v)		
Program gradijentne eluacije	Vrijeme (minute)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
	0,5	96	4
	40,0	50	50
	45,0	40	60
	60,0	0	100
	68,0	0	100
	70,0	96	4
	80,0	96	4
Valna duljina detekcije	280 nm		

3.3. ORAC METODA

Ovom se metodom određuje antioksidacijski kapacitet uzorka praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog radikala 2,2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorida (AAPH) na fluorescentni spoj fluorescein. (*38*)

Reagensi:

a) Fosfatni pufer, pH 7, c = 0,2 M

Odvaže se 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$) i otopi u 200 mL destilirane vode. U drugoj tikvici se u istoj količini vode otopi 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4). U novoj tikvici od 200 mL se pomiješa 61 mL 0,2 M otopine Na_2HPO_4 i 39 mL 0,2 M otopine $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

b) Fosfatni pufer, pH 7, c = 0,075 M

U odmjernu tikvicu od 100 mL se doda 37,5 mL 0,2 M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. Svaki dan se pripravlja svježa otopina.

c) Fluorescein

Otopina 1: 15 mg fluoresceina se otopi u 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera.

Otopina 2: Od otopine 1 se uzme 100 µL te se nadopuni s 10 mL 0,075 M fosfatnog pufera.

Otopina 3: Od otopine 2 se uzme 50 µL te se nadopuni s 50 mL fosfatnog pufera.

Svaki dan se pripravljaju svježa razrjeđenja otopina flouresceina.

d) AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid)

Otopi se 0,207 g AAPH u 5 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens.

e) Otopina standarda - Troloxa

Stock otopina Troloxa, početne koncentracije 0,5 mM se pripravi otapanjem 6,26 mg Troloxa u 50 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Iz pripremljene 0,5 mM otopine Troloxa pripremi se 6 razrjeđenja (0-25 µM).

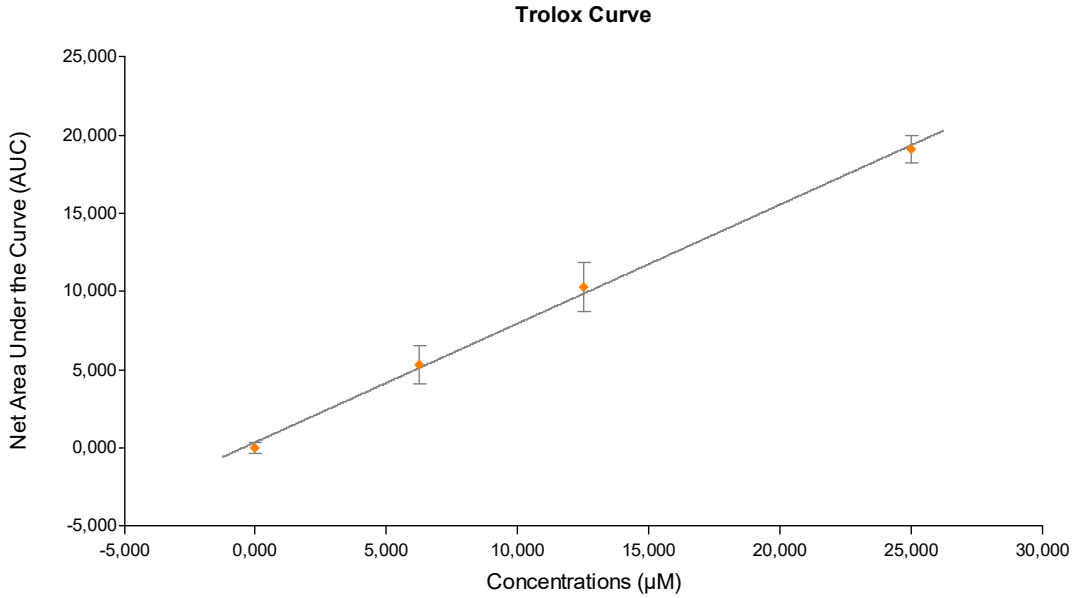
Postupak određivanja:

Mjerenja se provode na spektrofluorimetru pri λ_{eks} =485 nm i λ_{em} =520 nm, a uređaj se prije mjerenja termostatira na temperaturu 37°C.

U poru mikrotitarske pločice se doda 225 µL fluoresceina i 37,5 µL uzorka (0,075 M fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda Troloxa za izradu baždarnog pravca). Pripremljene otopine se inkubiraju 30 minuta pri 37°C. Nakon inkubacije se dodaje 0,375 mL AAPH te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca se testiraju otopine Troloxa različitih koncentracija, od 0-25 µM.



Slika 3. Baždarni pravac za ORAC metodu za otopine standarda (Troloxa)

3.4. BRIGGS-RAUSCHER OSCILACIJSKA METODA

Ovom se oscilacijskom metodom mjeri antioksidacijska aktivnost uzorka praćenjem vremena njegove inhibicije oscilacija u BR sustavu djelovanjem reakcije antioksidansa s hidroperoksil radikalom. (*6,42-44*)

Reagensi:

a) **Otopina 1:** Otopi se 4,28 g kalijeva jodata u 50 mL destilirane vode i 0,45 mL H_2SO_4, w (H_2SO_4) = 96 %. Nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

b) **Otopina 2:** U 50 mL destilirane vode otopi se 1,561 g malonske kiseline i 0,338 g manganovog sulfata. 0,03 g škroba otopi se u vodi uz kuhanje i zatim prelije u tikvicu s otopinom kiseline i sulfata te nadopuni do 100 mL vodom.

c) **Otopina vodikova peroksida w (H_2O_2):** 15 % vodikov peroksid i destilirana voda se pomiješaju u omjeru 1:1.

Postupak određivanja:

U otvor mikrotitarske pločice se prenese po 100 µL otopine 1 i 2. Oscilacijska reakcija se pokrene kad dodamo 100 µL otopine vodikova peroksida nakon čega dolazi do promijene boje iz bezbojne preko žute u modru. Takva smjesa predstavlja BR oscilacijski sustav bez dodatka antioksidansa. Kako bi se odredila antioksidacijska oscilacijska aktivnost, prije nego se doda otopina peroksida, doda se 10 µL otopine uzorka te se nakon toga mjeri apsorbancija pri 620 nm. Dodatkom antioksidansa oscilacije prestaju, otopina se obezboji te se mjeri vrijeme do ponovne pojave oscilacija. Vrijeme od trenutka kad je dodan ispitivani uzorak antioksidansa do vremena kad su se ponovno pojavile oscilacije, se naziva vrijeme inhibicije BR oscilacijske reakcije i predstavlja mjeru antioksidacijske snage uzorka.

3.5. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Za statističku obradu eksperimentalnih podataka korišteni su paketi Graph Pad Instat3 (GraphPad Software Inc., San Diego California, SAD), a za izradu grafova korišten je Microsoft Office Excel 2007. Odnos između pojedinih parametara je ispitan i opisan Pearsonovim korelacijskim koeficijentom "r". Razlike kod kojih je $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ideja završnog rada je bila nastaviti istraživanja na ekstraktima biljke petrovac ubrane u različitim vegetacijskim periodima na lokalitetu Seget Donji. Biljka je brana svaka dva mjeseca (veljača, travanj, lipanj, kolovoz, listopad, prosinac) tijekom jednogodišnjeg ciklusa 2014. godine.

Zadatak je bio istražiti sastav fenolnih kiselina u uzorcima petrovca ubranog u različitim periodima vegetacije primjenom HPLC tehnike te istražiti njihovu antioksidacijsku aktivnost primjenom ORAC i BR metode.

Prvi dio rada je bio ispitati prisutnost i kvantificirati spojeve iz grupe fenolnih kiselina u istraživanim ekstraktima. Poznato da je klorogenska kiselina dominantna u petrovcu te je ista istražena u radu Mihajlovski (*7*). U ovom istraživanju je ispitana prisutnost i ostalih fenolnih kiselina, i to spojeva iz grupe derivata cimetne i benzojeve kiseline. Iako je testiran veći broj spojeva, u ekstraktima su identificirane samo sljedeće: vanilinska, kafeinska, cimetna i klorogenska kiselina. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem prikazani su u tablici 2, a zbog lakše usporedbe rezultata izraženi su u mg spoja po 1 g suhe biljke (mg/g).

Tablica 2. Rezultati određivanja fenolnih kiselina u uzorcima primjenom HPLC tehnike

Period vegetacije	**Vanilinska kiselina**	**Kafeinska kiselina**	**Cimetna kiselina**	**Klorogenska kiselina**
Veljača	0,1235 ± 0,0120	0,0706 ± 0,0272	3,7495 ± 0,0026	7,4760 ± 0,1745
Travanj	0,1242 ± 0,0032	0,2002 ± 0,0025	0,0188 ± 0,0001	16,2839 ± 0,1501
Lipanj	0,1065 ± 0,0149	0,1609 ± 0,0052	0,0175 ± 0,0023	6,6398 ± 0,7167
Kolovoz	0,1180 ± 0,0090	0,0950 ± 0,0045	0,0137 ± 0,0010	5,6465 ± 0,1558
Listopad	0,1066 ± 0,0033	0,1077 ± 0,0817	0,0100 ± 0,0012	5,9252 ± 0,0766
Prosinac	0,1726 ± 0,1726	0,1170 ± 0,1170	0,0163 ± 0,0163	7,0073 ± 7,0073

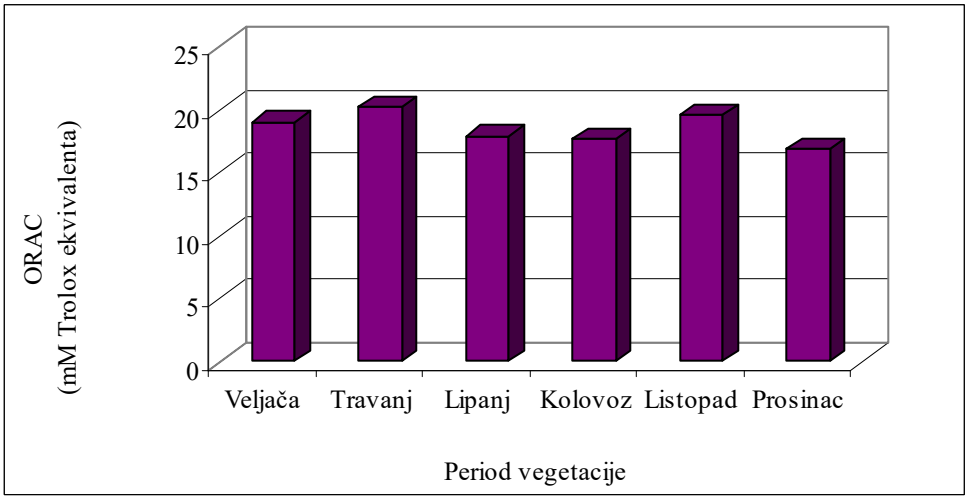
Prema prikazanim rezultatima u tablici 2 vidljivo je da je najveća koncentracija vanilinske kiseline (0,1242 ± 0,0032 mg/g), kafeinske (0,2002 ± 0,0025 mg/g) i klorogenske kiseline (16,2839 ± 0,1501 mg/g) pronađena u uzorcima petrovca koji su brani u travnju, dok je cimetnom kiselinom bio najbogatiji uzorak iz veljače (3,7495 ± 0,0026 mg/g).

Metoda ORAC je prva metoda u ovom istraživanju kojom je testirana antioksidacijska aktivnost ekstrakata petrovca. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 3 i na slici 3. Testirani su uzorci razrijeđeni čak 500 puta, s tim da je razrjeđenje uzeto u obzir kod računanja ORAC vrijednosti ekstrakata.

Tablica 3. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata petrovca ORAC metodom

Period vegetacije	**ORAC vrijednost (mM TE)**
Veljača	19,06 ± 0,72
Travanj	20,24 ± 0,73
Lipanj	17,91 ± 1,53
Kolovoz	17,67 ± 0,97
Listopad	19,57 ± 0,40
Prosinac	16,85 ± 0,28

* TE- Trolox ekvivalenti

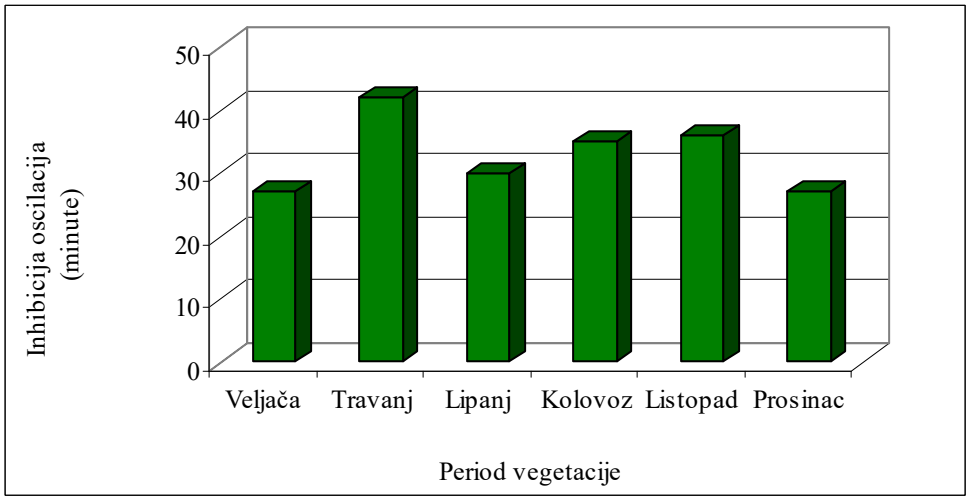


Slika 4. Usporedni prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti ekstrakata petrovca iz različitih vegetacijskih perioda primjenom ORAC metode

U ovom je radu Briggs-Raucher metodom mjerena antioksidacijska aktivnost uzoraka praćenjem vremena inhibicije oscilacije u BR sustavu djelovanjem antioksidansa s hidroperoksil radikalom. Testirani su uzorci prethodno razrijeđeni 10 puta, a iz dobivenih rezultata vidljivo je da je najveću inhibiciju pokazao uzorak iz travnja (42 min), a najmanju uzorci iz veljače i prosinca (27 min) (tablica 4, slika 5).

Tablica 4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata petrovca Briggs-Rauscher metodom

Period vegetacije	**Inhibicija oscilacija (minute)**
Veljača	27
Travanj	42
Lipanj	30
Kolovoz	35
Listopad	36
Prosinac	27



Slika 5. Usporedni prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti ekstrakata petrovca iz različitih vegetacijskih perioda primjenom Briggs-Rauscher metode

Drugi dio rada je usmjeren na usporedbu dobivenih rezultata s rezultatima dobivenim u istraživanjima Mihajlovski (*7*) i Lončar (*25*), pošto je riječ o istim biljnim ekstraktima.

U radu Mihajlovski (*7*) je istražen sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, neflavonoida i klorogenske kiseline. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da najviše ukupnih fenola sadrži lišće biljke ubrane u travnju, a gotovo dvostruko manje lišće iz kolovoza. U svim uzorcima dominirali su neflavonoidi (94-97 %), a najveće koncentracije klorogenske kiseline su pronađene u uzorcima iz travnja i listopada.

Rezultati za ukupne fenolne spojeve te za glavne podgrupe (flavonoidnu i neflavonoidnu frakciju) dobiveni u radu Mihajlovski (*7*) su izraženi u mg po 1 g suhe biljke i prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida u ekstraktima petrovca izraženi na jediničnu masu suhog biljnog materijala

	Ukupni fenoli	**Flavonoidi**	**Udio (%)**	**Neflavonoidi**	**Udio (%)**
Veljača	13,99 ± 0,25	0,70	5,1	13,29 ± 0,15	94,9
Travanj	22,15 ± 0,21	1,23	5,6	20,92 ± 0,25	94,4
Lipanj	14,12 ± 0,43	0,39	2,8	13,73 ± 0,15	97,2
Kolovoz	12,47 ± 0,51	0,31	2,7	12,16 ± 0,20	97,3
Listopad	15,49 ± 0,51	0,55	3,6	14,94 ± 0,32	96,4
Prosinac	14,03 ± 0,27	0,82	5,8	13,21 ± 0,50	94,2

* mg GAE/g - miligrami ekvivalenata galne kiseline po 1 gramu suhog biljnog materijala

Maleš i sur (*15*) su istraživali nadzemne dijelove biljke petrovac ubrane s različitih lokaliteta (Zadar, Punat, Korčula) u različitim stadijima razvoja biljke; prije cvjetanja, na početku cvjetanja, u punom cvatu i u fazi razvoja ploda. U tom istraživanju je vidljivo da biljka ima najniži udio ukupnih fenola i flavonoida (ali i tanina) u fazi razvoja ploda.

Udio ukupnih fenola je najveći prije samog početka procesa cvjetanja te kada je biljka u punom cvatu, dok je udio flavonoida u uzrocima branim prije početka cvjetanja bio znatno veći nego li u ostalim. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je najmanje fenola i flavonoida prisutno u uzorcima iz kolovoza. U rezultatima koji su dobiveni u istraživanju Meot Duros i Magné (*5*) također je vidljivo da period branja biljke, uz također utjecaj lokacije rasta iste, ima značajan utjecaj na njen sastav i svojstva. Iz rezultata njihovog istraživanja je vidljivo da je udio ukupnih fenola najveći u biljci ubranoj u ljetnim mjesecima, a znatno niži kod uzoraka branih zimi. Također, udio fenola u uzorcima branim u jesen je imao značajniju razliku između uzoraka biljke koji rastu na stjenovitim i pješčanim staništima (veći kod uzoraka s pješčanih staništa), dok je u ostalim periodima branja ta razlika bila drastično manja. Velike su razlike također primijećene kod određivanja klorogenske kiseline gdje su uzorci biljke s pješčanih staništa u proljetnom, ljetnom i jesenskom periodu bili znatno bogatiji ovim spojem (2-6 puta), dok je u zimskom periodu znatno veća koncentracija pronađena u uzorcima sa stjenovitih staništa. Ipak, najveći udio klorogenske kiseline je pronađen kod uzoraka iz ljetnog branja biljke, dok rezultati našeg istraživanja pokazuju upravo suprotno; ti uzorci (lipanj, kolovoz, listopad) sadrže najniže količine klorogenske kiseline dok su njom najbogatiji uzorci iz travnja.

Drugo istraživanje, Lončar (*25*), za zadatak je imalo istražiti antioksidacijsko djelovanje ekstrakta i to primjenom metoda FRAP i DPPH. Dobiveni rezultati su ukazali na to da je najjaču redukcijsku snagu pokazao ekstrakt iz travnja, a najmanju onaj iz kolovoza, što je obzirom na fenolni sastav tih uzoraka bilo i za očekivati. Drugom metodom, najveći postotak inhibicije DPPH radikala je postignut dodatkom ekstrakta petrovca iz travnja i lipnja. Jedino je kod ova dva uzoraka postignuta 50 %-tna inhibicija molekula radikala, dok je kod ostalih ista bila nešto niža (47,1-49,0 %). Iz rezultata istraživanja Meot Duros i Magné (*5*) je vidljivo da antioksidacijska aktivnost uzoraka s različitih staništa također pokazuje značajne razlike. Najbolja antiradikalna aktivnost uzoraka s pješčanih staništa je zabilježena za uzorke iz jeseni (studeni), dok je kod uzoraka biljke sa stjenovitih staništa najbolja aktivnost, i to do 6 puta, dokazana za uzorke ubrane u ljetnim mjesecima (kolovoz). Važno je napomenuti da nisu samo lokacija i period branja ključni čimbenik kod određivanja sastava i svojstava neke biljke, već na to utječu i brojni drugi čimbenici kao što su dio biljke koji se analizira, klimatski uvjeti kojima je biljka bila izložena (temperatura, svjetlo, oborine, vjetar, itd.), razvojni stadij biljke, starost biljke, postupak priprave ekstrakata, itd.

Tablica 6. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata petrovca određene metodom FRAP i DPPH (*25*)

	FRAP (μM TE)	**Inhibicija DPPH (%)**
Veljača	20962 ± 1124	45,5
Travanj	35128 ±765	50,1
Lipanj	21795 ± 521	46,4
Kolovoz	19864 ± 327	44,5
Listopad	23187 ± 819	46,3
Prosinac	19933 ± 282	44,7

* Uzorci kod DPPH metode koji su bili testirani prethodno razrijeđeni 2 puta

Rezultati ovog, ali i prijašnjih istraživanja ekstrakata petrovca (*7, 25*) su statistički obrađeni korištenjem Graph Pad Instat3 programskog paketa. Dobiveni rezultati (korelacijski odnosi) prikazani su u tablici 7.

Rezultati očekivano ukazuju na izrazito ili vrlo značajnu korelaciju između sadržaja fenola i neflavonoida, odnosno klorogenske kiseline, pošto je dokazano da na klorogensku kiselinu i njene derivate otpada glavnina sadržaja fenola u petrovcu (*6,22*). Također se može primijetiti da ukupni fenoli, neflavonoidna frakcija te sadržaj dominantne klorogenske kiseline uglavnom direktno utječu na antioksidacijska svojstva uzoraka testirana metodom FRAP i DPPH, odnosno na redukcijski kapacitet ekstrakata i sposobnost hvatanja molekula slobodnog DPPH radikala, dok u niti jednom slučaju ne utječu na svojstva dokazana metodom BR i ORAC. Razlog tome se može kriti u činjenici da se antioksidacijska aktivnost kod ove dvije metode temelji na sposobnosti antioksidansa da reagira (stabilizira) molekule hidrogenperoksil radikala te da antioksidansi odnosno spojevi u istraživanim ekstraktima zaista nemaju sposobnost hvatanja molekula tih radikala.

Tablica 7. Prikaz korelacijskih odnosa između dobivenih rezultata istraživanja

	Ukupni fenoli	**Flavonoidi**	**Neflavonoidi**	**Klorogenska kiselina**	**FRAP**	**DPPH**	**BR**	**ORAC**
Ukupni fenoli	X	r = 0,8589 p= 0,0284 značajno	r= 0,9985 p= < 0,0001 izrazito značajno	r=0,9541 p=0,0031 vrlo značajno	r=0,9889 p=0,0002 izrazito značajno	r=0,9666 p=0,0017 vrlo značajno	r=0,2729 p=0,6569 nije značajno	r=0,7449 p=0,0893 ne tako značajno
Flavonoidi	X	X	r=0,8296 p=0,0411 značajno	r=0,8926 p=0,0167 značajno	r=0,7995 p=0,0563 ne tako značajno	r=0,7329 p=0,0975 ne tako značajno	r=0,3896 p=0,4452 nije značajno	r=0,5117 p=0,2995 nije značajno
Neflavonoidi	X	X	X	r=0,9455 p=0,0044 vrlo značajno	r=0,9931 p=< 0,0001 izrazito značajno	r=0,9755 p=0,0009 izrazito značajno	r=0,7668 p=0,0753 ne tako značajno	r=0,7578 p=0,0809 nije tako značajno
Klorogenska kiselina	X	X	X	X	r=0,9566 p=0,0028 vrlo značajno	r=0,9129 p=0,0110 značajno	r=0,6451 p=0,1666 nije značajno	r=0,6276 p=0,3938 nije značajno
FRAP	X	X	X	X	X	r=0,9768 p=0,0008 izrazito značajno	r=0,8000 p=0,0560 ne tako značajno	r=0,7577 p=0,0809 ne tako značajno
DPPH	X	X	X	X	X	X	r=0,7391 p=0,0932 ne tako značajno	r=0,7823 p=0,0659 ne tako značajno
BR	X	X	X	X	X	X	X	r=0,6741 p=0,1420 nije značajno
ORAC	X	X	X	X	X	X	X	X

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu, ali i onih dobivenih u prijašnjim istraživanjima može se zaključiti da vrijeme branja biljke petrovac ima značajan utjecaj na kemijski sastav ekstrakata, a samim time i na njihovu antioksidacijsku aktivnost. Kako je ovo istraživanje obuhvaćalo uzorke prikupljene na istoj lokaciji tijekom jednogodišnjeg ciklusa biljke, iz dobivenih rezultata je vidljivo da je fenolima najbogatiji bio uzorak iz travnja. Upravo je taj uzorak, koji je najbogatiji i klorogenskom kiselinom, pokazao i najbolja antioksidacijska svojstva i to primjenom svih korištenih metoda. Smatra se da bi petrovac zbog bogatog fenolnog sastava i pozitivnih bioloških svojstava zasigurno mogao pronaći još kakvu primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

6. LITERATURA

1. Leksikografski zavod Miroslav Krleža: Halofiti, http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=24203 (Pristupljeno 20.06.2015.)
2. Plants for a future, http://www.pfaf.org/user/Default.aspx (Pristupljeno 07.08.2016.)
3. Generalić Mekinić, I. Motar ili trava sv. Petra, Maslina- časopis za maslinarstvo i uljarstvo. 2016,69:80-84
4. Ljekovito bilje, Motar, http://www.koval.hr/blogeky/ljekovite%20biljke/motar.html (Pristupljeno 07.08.2016.)
5. Meot-Duros L, Magne C. Antioxidant activity and phenol content of *Chritmum maritimum* L. leaves. Plant Physiol Biochem. 2009;47:37-41
6. Generalic Mekinić I, Blažević I, Mudnić I, Burčul F, Grga M, Skroza D, Jerčić I, Ljubenkov I, Boban M, Miloš M, Katalinić V. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): Phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. J Food Sci Tech. 2016 (doi:10.1007/s13197-016-2283-z)
7. Mihajlovski M. Fenolni profil petrovca (*Chritmum maritimum* L.) kroz različite periode vegetacije [završni rad], Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2015 (na hrvatskom jeziku).
8. Priroda i biljke, http://www.plantea.com.hr/motar/ (Pristupljeno 07.08.2016.)
9. Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N, Garcia JM, Villar H. Fully automated liquid culture system compared with Löwenstein-Jensen solid medium for rapid recovery of mycobacteria from clinical samples, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999;18:265-273.
10. Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. Arh Hig Rada Toksikol. 2008;59:205-212.

11. Pateira L, Nogueira T, Antunes A, Venancio F, Tavares R, Capelo J. Two chemotypes of *Chritmum maritimum* L. from Portugal, Flavour Frag J. 1999;14:333-343.

12. Ruberto G, Tiziana Baratta M, Stanley G, Damien Dorman HJ. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Chritmum maritimum* essential oils, Planta Med. 2000;66:687-693.

13. Senatore F, Napolitano F, Ozcan M. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Chritmum maritimum* L (Apiaceae) growing wild in Turkey, Flavour Frag J. 2000;15:186-189.

14. Ozcan M, Akgul A, Bascr KHC, Ozck T, Tabanca N. Essential oil composition of sea fennel (*Chritmum maritimum*) from Turkey, Nahrung/ Food. 2001,45:353-356.

15. Maleš Ž, Žuntar I, Nigović B, Plazibat M, Bilušić Vundar V. Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire- *Chritmum maritimum* L., Acta Pharm. 2003;53:139-144.

16. Kulišić-Bilušić T, Blažević I, Dejanović B, Miloš M, Pifat G. Evaluation of the antioxidant activity of essential oil from caper (*Capparis spinosa*) and sea fennel (*Chritmum maritimum*) by different methods, J Food Biochem. 2009;34:286-302.

17. Baser KHC, Ozek T, Demirci B, Saritas Y. Essential oil of *Chritmum maritimum* L. from Turkey. J Essent Oil Res. 2000;12:424-426.

18. Özcan Musa M, Pedro LG, Figueiredo CA, Barroso JG. Constituents of the essential oil of sea fennel (*Chritmum maritimum* L.) growing wild in Turkey. J Med Food. 2006;9:128-130

19. Meot-Duros L, Le Floch G, Magne C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. J Ethnopharmacol. 2008;116:258-262.

20. Meot-Duros L, Magne C. Antioxidant activity and phenol content of *Chritmum maritimum* L. leaves. Plant Physiol Bioch. 2009;47:37-41.

21. Meot-Duros L, Cenrantola S, Talarmin H, Le Meur C, Le Floch G, Magne C. New antibacterial and cytotoxic activities of falcarindiol isolated in *Chritmum maritimum* L. leaf extract. Food Chem Toxicol. 2010;48:553-557.

22. Siracusa L, Kulišić Bilušić T, Politeo O, Krause I, Dejanovic B, Ruberto G. Phenolic composition and antioxidant activity of aqueos infusions from *Capparis spinosa* L. and *Chritmum maritimum* L. before and after submission to a two-step *in vitro* digestion model, J Agric Food Chem. 2011;59:12453-12459.

23. Houta O, Akrout A, Neffati M, Amri H. Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial potentials of *Chritmum maritimum* L. cultivated in Tunisia Arid Zones, JBAPN. 2011;1:138-143.

24. Jallali I, Zaouali Y, Missaoui I, Smeoui A, Abdelly C, Ksouri R. Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Chritmum maritimum* L. and *Inula Chritmoides* L., Food Chem. 2014;145:1031-1038.

25. Lončar R. Biološka aktivnost ekstrakata petrovca (*Chritmum maritimum* L.) u različitim periodima vegetacije, [završni rad], Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2015 (na hrvatskom jeziku)

26. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health, and disease, Oxford University Press, New York, USA 1996;7-30,90-96

27. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija. Medicina. 2007;43:84-93.

28. Shahidi F, Naczk M. Food phenolics: Sources, chemistry, effects and application, 1995 Technomic Publishing Company, Inc., Landcaster, Pennsylvania, SAD.

29. Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. Review: natural antioxidans: fascinanting or mythical biomolecules? Molecules. 2010;15:6905-6930.

30. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290-4302.

31. Pulido R, Bravo L, Saura-Calisto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determinated by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. J Agric Food Chem. 2000;48:2296-3402.

32. Gutteridge JMC, Halliwell B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. Method Enzymol. 1990;186:1-85.

33. Medicinske zanimljivosti, http://mediko.sveznadar.info/20Lijekovi/20Vitamini/Radikali.html (Pristupljeno: 12.07.2016.)

34. Huang D, Ou B, Prior R. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem. 2005;53:1841-1856.

35. Badarinath AV, Mallikarjuna RAK, Madhu Sudhana Chetty C, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K. A Review on *in-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. Inter J Pharm Tech Research. 2010;2:1276-1285.

36. Generalić I. Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranoga ljekovitoga bilja mediteranskoga podneblja [doktorska disertacija], Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2011 (na hrvatskom jeziku).

37. Cronin JR. The Biochemistry of Alternative Medicine: Comparing Antioxidant Values with the ORAC Method. Altern. Complement. Ther. 2004;10:167-170.

38. Bursać-Kovačević D. Utjecaj sorte, uzgoja i prerade na stabilnost polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet jagode [doktorska disertacija], Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2010 (na hrvatskom jeziku)

39. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities, Food Anal Method. 2009,2:41-60.

40. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. Free Rad Res. 2015;49:633-649.

41. Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer EK, Prior RL, Huang D. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. J Agric Food Chem. 2002;50:2772-2777.

42. Cervellati R, Höner K, Furrow SD, Neddens C, Costa S. The Briggs-Rauscher as a test to measure the activity of antioxidants. Helv Chim Acta. 2001;84:3533-3547.

43. Furrow D, Honer K, Cervellati R. Inhibitory effects by ascorbic acid on the oscillations of the Briggs-Rausher reaction. Helv Chim Acta. 2004;87:735-741.

44. Skroza D. Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveratrola u binarnim fenolnim smjesama [doktorska disertacija],

Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2015 (na hrvatskom jeziku).

45. MP Biomedicals - Product catalog, https://www.mpbio.com/ (Pristupljeno 23.08.2016.)

46. Brunning A. (2015) Why is Coffee Bitter? – The Chemistry of Coffee, http://www.compoundchem.com/2014/01/30/why-is-coffee-bitter-the-chemistry-of-coffee/ (Pristupljeno 23.08.2016.)