

Fitokemijska karakterizacija bioaktivnih polifenolnih spojeva endemične vrste *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae)

Jurišić Grubešić, Renata; Domitrović, Iva; Ruščić, Mirko; Vuković Rodriguez, Jadranka; Kremer, Dario

Source / Izvornik: *Farmaceutski glasnik*, 2016, 72, 569 - 584

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:469218>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Fitokemijska karakterizacija bioaktivnih polifenolnih spojeva endemične vrste *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae)

RENATA JURIŠIĆ GRUBEŠIĆ¹, IVA DOMITROVIĆ¹, MIRKO RUŠIĆ²,
JADRANKA VUKOVIĆ RODRÍGUEZ¹, DARIO KREMER³

¹ Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

² Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Odjel za biologiju, Teslina 12, 21 000 Split

³ Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku botaniku, Farmaceutski botanički vrt »Fran Kušan«,
Schrottova 39, 10 000 Zagreb

Phytochemical characterization of bioactive polyphenolic compounds from endemic species *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae)

A b s t r a c t – *Phytochemical characterization of the Croatian endemic species *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae) was carried out. The presence of polyphenols in above ground plant parts was proven by using chemical reactions of developing colored products and precipitates. The thin layer chromatography showed the presence of quercetin, rutin, and chlorogenic acid in the methanolic extract of *C. ragusina*. Quantitative analysis of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) was carried out using three different spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds were as follows: $3.04 \pm 0.04\%$ (TP), $0.36 \pm 0.04\%$ (T), $0.25 \pm 0.00\%$ (F), and $0.38 \pm 0.01\%$ (PA). This phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of Croatian endemic species and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of *C. ragusina*, especially in relation to the content of bioactive polyphenolic substances.*

(University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia; University of Split, Faculty of Science, Department of Biology, Teslina 12, 21 000 Split, Croatia; University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Botany, Botanical garden »Fran Kušan«, Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Hrvatska se flora odlikuje velikom raznolikošću i brojnošću vrsta. Specifičan geografski položaj na razmeđi nekoliko biogeografskih regija te karakteristični ekološki, klimatski i geomorfološki uvjeti stvaraju širok raspon staništa. To rezultira velikim bogatstvom vrsta i podvrsta sa znatnim brojem endema. Endemi su svojite koje u svojem rasprostranjenju zauzimaju razmjerno mala i ograničena područja. Od ukupnog broja (oko 5000) registriranih biljnih vrsta u Republici Hrvatskoj, preko 400 čine endemične svojite. Prema odnosu biljnih vrsta i površine teritorija, Hrvatska spada među 3 najbogatije europske zemlje, uz Sloveniju i Albaniju (1, 2).

Upravo endemične biljke daju najizrazitiji pečat osebnosti hrvatske flore. Jedna od njih je i dubrovačka zečina, *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae). S ciljem produbljivanja i proširivanja znanstvenih spoznaja o toj biljnoj vrsti, te istraživanja njezina ljekovitog potencijala, u okviru ovoga rada provedena je fitokemijska karakterizacija biološki aktivnih polifenolnih tvari iz uzoraka dubrovačke zečine sa srednjodalmatinskog otoka Brusnika, a dobiveni rezultati predstavljaju polazište za daljnja istraživanja njezine farmakološke vrijednosti.

Rod zečina (*Centaurea* L.)

Rod zečina (*Centaurea*) jedan je od najvećih i najkompleksnijih rodova porodice *Asteraceae* koji obuhvaća približno 500 vrsta (3). Pripadnice roda zečina su jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, rjeđe patuljasti grmovi. Listovi su im cjeloviti ili perasto razdijeljeni. Na stabljici je prisutna jedna ili više cvjetnih glavica koje su u skupinama od dvije do tri smještene na vršnim dijelovima ogranaka stabiljke. Ovoj cvjetnih glavica cilindričan je ili okrugao, a pricvjetni listići često imaju resasti ili trnovit privjesak. Unutarnji cvjetovi glavice su dvospolni, a rubni neplodni. Vjenčić je cjevast s 5 (–8) režnjeva oboda. Plodovi zečine najčešće imaju kunadru koja u većine vrsta ostane na biljci, dok u manjeg broja vrsta otpadne. Kunadru čine dva ili više redova grubih do perastih dlaka ili ljusaka koje mogu biti jajaste do linearne. Red koji se nalazi u samoj unutrašnjosti je najkraći pa su ljuške ili dlake koje ga tvore često donjim dijelom međusobno srasle i obično se razlikuju oblikom i teksturom od onih koje se nalaze u vanjskim redovima. Vanjski redovi dlaka (ljusaka) preklapaju jedan drugoga (4).

Dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.)

Dubrovačka zečina je endemična biljna vrsta, zaštićena od 1969. godine na svim svojim staništima. Prvi je put znanstveno opisana krajem 17. stoljeća, kada je francuski botaničar Joseph Pitton de Tournefort na svojoj ekspediciji po Sredozemlju ubrao biljku u okolici Cavtata i nazvao je »*Jacea epidaurica candidissima tomentosa*« (»bijela dlakava zečina iz Cavtata«). Epidaurus je antički naziv za Cavtat, koji je tijekom srednjeg vijeka nazvan Ragusa Vecchia, pa je zato nova biljna vrsta dobila naziv *Centaurea ragusina* – dubrovačka zečina, iako ona ne raste u samom Dubrovniku i njegovoj užoj okolici (5).

Dubrovačka zečina raste u pukotinama karbonatnih stijena koje se okomito izdižu iznad mora, ali i na eruptivima otočića Brusnika. Hazmofitska je, heliofilna i halofitska vrsta. Raste na brdu Marjan kod Splita, na otocima Šolti, Čiovu, Hvaru, Sv. Andriji, Brusniku, Biševu, Visu, Sušcu, Palagruži, Mljetu, na poluotoku Pelješcu te u okolici Cavtata. Višegodišnja je bijelo pustenasta biljka. Stabljike su joj uspravne ili pridignute, jednostavne, uglate, visine 30–60 cm, pri vrhu s 1–3 (–4) cvatne glavice, pri dnu odrvenjele i bijelo vunaste. Prizemni listovi su na dugoj peteljci, brojni, perasto razdijeljeni, sa svake strane s (4–) 5–7 (–8) segmenata. Cvatne glavice su okruglaste, promjera 20–25 mm. Ovojne ljuske su blijedozelene do bijelo pustenaste, pri vrhu sa smeđecrnim, trokutastim, češljasto-trepavičastim privjeskom, koji završava oko 4 mm dugim trnom koji je svinut prema natrag. Roška je 4–5 mm duga i oko 1,5 mm široka. Valjkasta je, pri dnu blago sužena, sivkasta, prekrivena poleglim, blago stršećim, svilenkastim dlačicama. Kunadra je iste dužine kao i roška, sastavljena od bijelih, stršećih i ukočenih dlaka (6).



Slika 1. Dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.) (Foto: D. Kremer)

Pregled istraživanja dubrovačke zečine (*Centaurea ragusina* L.)

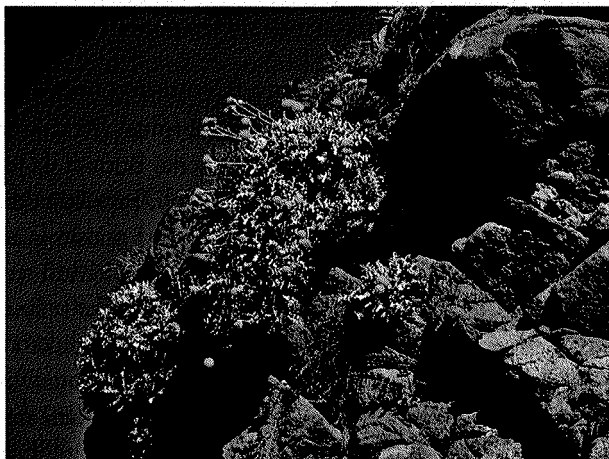
Znanstvene studije na dubrovačkoj zečini nisu brojne. Istraženi su citogenetički učinci osmotskog stresa na meristemske stanice korijena. Budući da je stanište dubrovačke zečine suho, a izložena je velikim količinama soli, razvila je kseromorfne značajke (7). Nadalje, istraživan je utjecaj natrijeva klorida i manitola na peroksidaznu aktivnost i lipidnu peroksidaciju dubrovačke zečine (8). Ispitivani su također fitokemijski profili hlapljivih sastavnica listova i cvjetova dubrovačke zečine te njihov antimikrobni učinak. Seskviterpeni su se u tom istraživanju pokazali kao najobilnija skupina spojeva te su hlapljiva ulja pokazala velik antibakterijski potencijal (9). U studiji objavljenoj 2013. godine ispitala se tolerancija dubrovačke zečine na visoke koncentracije soli koja je povezana s učinkovitom osmotskom prilagodbom i povećanim antioksidativnim kapacitetom (10). Unutar roda *Centaurea*, na više je vrsta određivan

sadržaj ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina. Većina takvih istraživanja provedena je u Turskoj, u kojoj raste velik broj pripadnica roda *Centaurea*, od kojih su mnoge endemične. Provedeno je određivanje sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida u pet pripadnica roda *Centaurea*: *C. kurdica*, *C. rigida*, *C. amanicola*, *C. cheirolopha* i *C. ptosimopappoides*. Količina fenolnih spojeva određena je Folin-Ciocalteuovom metodom i izražena u ekvivalentima galne kiseline. Dobiveni rezultati su bili u rasponu od 82 mg do 135 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu ekstrakta. Sadržaj flavonoida određen je kolorimetrijskom metodom s aluminijevim kloridom. Rezultati su izraženi u ekvivalentima rutina, a bili su u rasponu od 76 mg do 245 mg ekvivalenata rutina po gramu ekstrakta. Istraživanje je pokazalo da vrste roda *Centaurea* sadrže znatne količine polifenolnih spojeva i flavonoida što upućuje na potencijalnu antioksidativnu aktivnost (11). Ukupni polifenoli analizirani su Folin-Ciocalteuovom metodom i u vrstama *Centaurea patula*, *C. pulchella* te *C. tchihatcheffii*. Sadržaj ukupnih polifenola bio je u rasponu od 22 mg do 55 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu ekstrakta, što svrstava analizirane biljne vrste u dobre izvore prirodnih antioksidansa (12).

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Biljni materijal za fitokemijske analize prikupljen je tijekom lipnja 2012. godine na srednjodalmatinskom otoku Brusniku. Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu »Fran Kušan« Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (4, 6, 13). Analizirani su osušeni praškasti nadzemni dijelovi dubrovačke zečine.



Slika 2. Dubrovačka zečina s otoka Brusnika (Foto: D. Kremer)

Aparati i kemikalije

Za spektrofotometrijska je određivanja korišten UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453, uz PC-HP 845x UV-Visible System te kvarcna kiveta od 1 cm (Agilent, Njemačka).

U kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi korištene su sljedeće kemikalije: aceton (Claro-Prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska); aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb); β -etilaminoester difenilborne kiseline (Fluka, Buchs, Švicarska); etanol (Badel, Zagreb); etil acetat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska); ferulična kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); Folin-Ciocalteuov fenolni reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka); formaldehid (T.T.T., Sveta Nedjelja); heksametilentetramin (Zorka, Šabac, Srbija); izokvercitrin (Roth, Karlsruhe, Njemačka); kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb); kavena kiselina (Roth, Karlsruhe); kazein (Calbiochem, Darmstadt); klorogenska kiselina (Fluka, Buchs); klorovodična kiselina (Carlo Erba, Rodano, Italija); kvercetin (Roth, Karlsruhe); metanol (Kemika, Zagreb); naringenin (Sigma-Aldrich, St. Louis); naringin (Sigma-Aldrich, St. Louis); mravlja kiselina (TTT, Sveta Nedjelja); natrijev acetat trihidrat (Kemika, Zagreb); natrijev citrat (Gradska ljekarna Zagreb, Zagreb); natrijev karbonat dekahidrat (Poch, Gliwice, Poljska); natrijev molibdat (Kemika, Zagreb); natrijev nitrit (Kemika, Zagreb); octena kiselina, led. (Alkaloid, Skopje, Makedonija); olovov acetat (Kiedel-de Haën ag. Seelze, Hanover, Njemačka); polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs); rutin (Roth, Karlsruhe); ružmarinska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis); vanilin (Sigma-Aldrich, St. Louis); želatina (Sigma-Aldrich, St. Louis); željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje); željezov(III) klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis).

Fitokemijska analiza polifenola

Studija je obuhvatila kvalitativnu i kvantitativnu analizu biološki aktivnih polifenolnih spojeva u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine.

Trjeslovine su ispitane općim reakcijama s metalnim solima i želatinom (14, 15), kao i razlučnom reakcijom između kondenziranih trjeslovina i onih koje hidroliziraju (16), dok je kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina provedena metodom tankoslojne kromatografije (17). Prevalidiranim spektrofotometrijskim metodama određen je sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina (18) te ukupnih flavonoida (19), dok je udio fenolnih kiselina dobiven primjenom metode Europske farmakopeje (20).

Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama

Ekstrakcija: 0,2 g praškastog biljnog materijala ekstrahira se 10 minuta s 20 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakt se filtrira.

Opće reakcije s metalnim solima i želatinom

1. U 2 mL filtrata dodaju se dvije kapi 5 %-tne otopine željezova(III) klorida.

2. U 2 mL filtrata dodaju se 2–3 kapi 1 %-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata.
3. U 5 mL filtrata doda se 0,5 mL 10 %-tne otopine olovova acetata.
4. U 2 mL filtrata doda se 2 mL 1 %-tne otopine želatine (14, 15).

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 3 mL ekstrakta dodaju se 2 kapi otopine formaldehida i 3 kapi 10 %-tne klorovodične kiseline. Sadržaj se ugrije do vrenja, ohladi, te zatim profiltrira. Potom se filtar papir ispere s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filtar papiru koji je netopljiv u toploj 5 %-tnoj otopini kalijeva hidroksida (16).

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu koji se dobije u prethodnoj reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom, doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata (bez protresivanja epruvete), a zatim 1 mL 1 %-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju, javlja se ljubičast prsten na mjestu prikladnog pH (16).

Dodatan dokaz prisutnosti trjeslovina predstavlja pozitivan vanilinski test. U 1 mL ekstrakta doda se 2 mL 1 %-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini, a pozitivnu reakciju predstavlja nastanak crvenog obojenja (16).

Tankoslojna kromatografija (TLC) flavonoida i fenolnih kiselina

Ekstrakcija: 0,2 g praškastog biljnog materijala ekstrahira se s 5 mL metanola, 10 minuta na vodenoj kupelji (60 °C).

Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina u pripremljenom ekstraktu provodi se na tankom sloju Kieselgla 60 F₂₅₄ (staklene TLC ploče, 20×20 cm), uz razvijanje: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Nakon prskanja NST/PEG reagensom (Naturstoff-reagens, NST: 1 %-tna metanolna otopina β-etilaminoestera difenilborne kiseline i 5 %-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000, PEG), kromatogrami se promatraju pod UV lampom na 365 nm (17).

Za dobivanje referentnih kromatograma, pripremljene su metanolne otopine standarda (1 mg/mL) sljedećih flavonoida i fenolnih kiselina: izokvercitrina, kvercetrina, naringenina, naringina, rutina, te ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske kiseline.

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih polifenola u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine određena je spektrofotometrijski (18).

Ekstrakcija. Fino usitnjeni nadzemni biljni dijelovi dubrovačke zečine (0,25 g) ekstrahiraju se s 80 mL 30 %-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta. Iscrpina se nakon hlađenja profiltrira u odmjernu tikvicu od 100,0 mL, nadopuni do oznake 30 %-tnim metanolom te upotrijebi za daljnju analizu.

Priprema otopina za analizu. *Otopina 1:* 2,0 mL filtrata iz prethodne ekstrakcije pomiješa se s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješa se i nadopuni destiliranom vodom do 100,0 mL). *Otopina 2:* 10,0 mL *otopine 1* mučka se 45 minuta (mućkalica) s 50 mg kazeina te potom profiltrira.

Po 1,0 mL *otopine 1* i *otopine 2* pomiješa se odvojeno u odmjernim tikvicama od 10,0 mL s po 0,5 mL Folin-Ciocalteuova fenolnog reagensa i nadopuni do oznake s 33 %-tnom otopinom natrijeva karbonata dekahidrata. Apsorbancije dobivenih plavih otopina mjere se na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepi pokus, a izraze u odnosu na tanin. Vrijednost koju daje *otopina 1* odgovara količini ukupnih polifenola, dok razlika vrijednosti dobivenih za *otopinu 1* i *otopinu 2* odgovara količini trjeslovina vezanih na kazein.

Za izražavanje sadržaja ukupnih polifenola (UP), odnosno trjeslovina (T) u 100,0 g suhog biljnog materijala, vrijedi izraz (iz kalibracijskog pravca za tanin):

$$\% \text{ polifenola} = 40A$$

A = izmjerena apsorbancija otopine 1 (za sadržaj UP), odnosno razlika apsorbancija otopine 1 i otopine 2 (za sadržaj T).

Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine određena je spektrofotometrijskom metodom (19).

Ekstrakcija. Praškasto usitnjeni biljni dijelovi (0,2 g) ekstrahiraju se 30 minuta s 20 mL acetona, 2 mL 25 %-tne klorovodične kiseline i 1 mL 0,5 %-tne otopine heksametilentetramina, zagrijavanjem do vrenja na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Hidrolizat se propusti kroz vatu, a ostatci droge na vati ponovo se ekstrahiraju s 20 mL acetona, grijanjem do vrenja 10 minuta, ekstrakt propusti kroz vatu te na isti način još dva puta ponovi ekstrakcija. Sjedinjeni filtrati dopune se acetonom do 100,0 mL i upotrijebe za daljnju analizu.

Priprema otopina za analizu. Pomiješa se 20,0 mL prethodno dobivenog hidrolizata s 20 mL vode te ekstrahira u lijevku za odjeljivanje najprije s 15 mL, a zatim tri puta s po 10 mL etil acetata. Sjedinjene etilacetatne faze isperu se dva puta s po 40 mL vode, propuste kroz vatu i dopune etil acetatom do 50,0 mL.

Po 10,0 mL etilacetatnog ekstrakta prenese se u dvije odmjerne tikvice od 25,0 mL. U svaku se tikvicu doda 0,5 mL 0,5 %-tne otopine natrijeva citrata. U jednu se

tikvicu još doda i 2 mL otopine aluminijeva klorida (2 %-tna otopina AlCl_3 , $6\text{H}_2\text{O}$ u 5 %-tnoj metanolnoj otopini octene kiseline). Potom se obje tikvice dopune do 25,0 mL 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta izmjere se apsorbancije otopina s aluminijevim kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus predstavlja prethodno pripremljena otopina bez AlCl_3 .

Maseni udio flavonoida izračuna se kao kvercetin, prema izrazu:

$$\% = A \times 0,772 / b$$

A = izmjerena apsorbancija; b = masa biljnog materijala izražena u g

Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina

Količina fenolnih kiselina (derivati hidroksicimetne kiseline) u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine određena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium iz Europske farmakopeje (20):

Ekstrakcija. 0,200 g praškasto usitnjenih nadzemnih biljnih dijelova ekstrahira se s 80 mL 50 %-tnog etanola (V/V) u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Nakon hlađenja se ekstrakt profiltrira u odmjernu tikvicu od 100,0 mL, koja se potom nadopuni do oznake 50 %-tnim etanolom.

Ispitivana otopina. 1,0 mL dobivenog ekstrakta prenese se u odmjernu tikvicu od 10,0 mL te se dodaju redom sljedeći reagensi: 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline, zatim 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa (10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata otopi se u 100,0 mL destilirane vode) te 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijeva hidroksida. Sadržaj tikvice se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Kompezacijska otopina. 1,0 mL ekstrakta razrijedi se destiliranom vodom u odmjernoj tikvici do 10,0 mL.

Maseni udio ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline, izražen kao ružmarinska kiselina, izračuna se prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ hidroksicimetnih derivata} = A \times 2,5 / m$$

A = izmjerena apsorbancija na 505 nm; m = masa biljnog materijala (g)

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

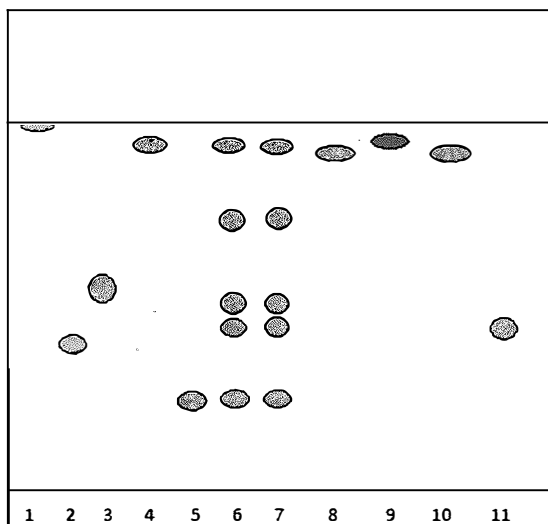
Potvrđena je prisutnost polifenola i trjeslovina u vodenim ekstraktima dubrovačke začine, primjenom kemijskih reakcija stvaranja obojenih produkata i/ili taloga: sa željezovim(III) kloridom i željezovim(III) amonijevim sulfatom nastalo je vrlo intenzivno zelenoplavo obojenje, s olovovim acetatom razvilo se intenzivno pahuljasto zamućenje narančastosmeđe boje, a sa želatinom je dobiveno nježno blijedožuto zamućenje. Reakcijom s natrijevim acetatom i željezovim(III) amonijevim sulfatom u ekstraktima dubrovačke zečine dokazane su trjeslovine koje hidroliziraju (ljubičasti

prsten u području prikladnog pH), dok je prisutnost kondenziranih trjeslovina potvrđena razlučnom reakcijom (formaldehid i 10 %-tna klorovodična kiselina; talog netopljiv u toploj 5 %-tnom kalijevu hidroksidu). Dodatan pozitivan test na trjeslovine dobiven je s 1 %-tnom otopinom vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini (crveno obojenje).

Rezultati tankoslojne kromatografije flavonoida i fenolnih kiselina

Na tanki sloj Kieselgela 60 F₂₅₄ nanasene su standardne otopine flavonoida (naringenina, naringina, izokvercitrina, kvercetina i rutina) te fenolnih kiselina (kavana, ferulična, ružmarinska i klorogenska), kao i metanolni ekstrakt droge. Analiza se provodila uz dva različita razvijaa: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Detekcija je provedena prskanjem s NST/PEG reagensom, nakon čega su kromatogrami vizualizirani na UV-365 nm.

Na kromatogramima su uočene narančaste fluorescirajuće zone karakteristične za flavonoide kvercetinog aglikona i plavozelene zone fenolnih kiselina. Uočeno je pet kromatografskih zona, a na temelju njihove boje i R_f vrijednosti, te usporedbom s primijenjenim standardnim tvarima, sa sigurnošću je potvrđena prisutnost kvercetina, rutina i klorogenske kiselina u metanolnom ekstraktu dubrovačke zečine. Od dviju primijenjenih mobilnih faza, nešto bolje odjeljivanje postignuto je u razvijaaču etil acetat – mravlja kiselina – voda, 8:1:1 (slika 3.).



Slika 3. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i fenolnih kiselina te metanolnog ekstrakta dubrovačke zečine u razvijaaču etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V).

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄; Detekcija: NST/PEG i UV-365 nm.

Legenda: 1 – naringenin, 2 – naringin, 3 – izokvercitrin, 4 – kvercetin, 5 – rutin, 6 i 7 – metanolni ekstrakt droge, 8 – kavana kiselina, 9 – ferulična kiselina, 10 – ružmarinska kiselina, 11 – klorogenska kiselina

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u nadzemnim dijelovima biljne vrste *Centaurea ragusina* provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na reakciji polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR), kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom (18). Nakon dodatka FCR, izmjerene su apsorbancije dobivenih plavih otopina na 720 nm, uz destiliranu vodu (slijepi pokus).

Napravljene su dvije ekstrakcije prema spomenutom propisu (18) te su od svakog ekstrakta uzeta po dva uzorka za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina. Za svaki od uzoraka tri je puta izmjerena apsorbancija.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina prikazani su tablicama 1. i 2., a primjer spektra dobivenog mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova dubrovačke zečine donosi slika 4. Sadržaj ukupnih polifenola iznosio je $3,04 \pm 0,04$ %, a sadržaj trjeslovina $0,36 \pm 0,04$ %.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+} (19). Tvorbi kompleksa prethodi kisela hidroliza flavonoidnih heterozida kako bi se omogućilo oslobađanje aglikona.

Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

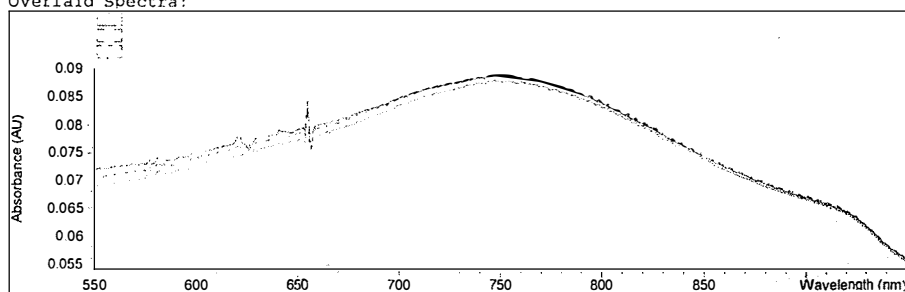
	Ukupni polifenoli		Sadržaj ukupnih polifenola		
	$A_{720 \text{ nm}}$ otopine 1	Srednja vrijednost $A_{720 \text{ nm}}$ ot. 1 \pm sd	%	Srednja vrijednost % \pm sd	
Ekstrakt 1	0,073		2,92		
	uzorak 1	0,070	0,071 \pm 0,001	2,80	2,84 \pm 0,05
		0,070		2,80	
		0,075		3,00	
	uzorak 2	0,072	0,073 \pm 0,002	2,88	2,91 \pm 0,06
Ekstrakt 2		0,071		2,84	
		0,074		2,96	
	uzorak 1	0,072	0,073 \pm 0,001	2,88	2,93 \pm 0,04
		0,074		2,96	
		0,087		3,48	
	uzorak 2	0,086	0,087 \pm 0,000	3,44	3,47 \pm 0,02
	0,087		3,48		

Tablica 2. Sadržaj trjeslovina u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

	Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein		
	A _{720 nm} otopine	Srednja vrijednost ot.2±sd	A1–A2	Srednja vrijednost (A1–A2) ±sd	%	Srednja vrijednost %±sd	
	2	A _{720 nm}					
Ekstrakt 1		0,062	0,011		0,44		
	uzorak 1	0,064	0,062±0,001	0,006	0,009±0,002	0,24	0,35±0,07
		0,061		0,009		0,36	
		0,065		0,010		0,40	
	uzorak 2	0,065	0,065±0,000	0,007	0,008±0,002	0,28	0,31±0,06
Ekstrakt 2		0,065	0,008		0,32		
	uzorak 1	0,066	0,066±0,000	0,007	0,008±0,000	0,28	0,31±0,02
		0,066		0,008		0,32	
		0,075		0,012		0,48	
	uzorak 2	0,075	0,075±0,000	0,011	0,012±0,000	0,44	0,47±0,02
	0,075		0,012		0,48		

Method file : POLIFEN.M (modified) Last update: Date 4/29/15 Time 11:15:35 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVADOM-1\UZ20TOP1.SD Created : 4/27/15 12:08:04

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<720nm>	Abs<745nm>
1		8.6646E-2	8.8360E-2
2		8.5608E-2	8.7620E-2
3		8.6562E-2	8.8598E-2

Slika 4. Primjer spektra dobivenog mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

Apsorbancije nastalih kompleksa izmjerene su na valnoj duljini od 425 nm, a udio flavonoida je izražen kao kvercetin. Slijepe su uzorke predstavljale prethodno pripremljene otopine bez aluminijeva klorida.

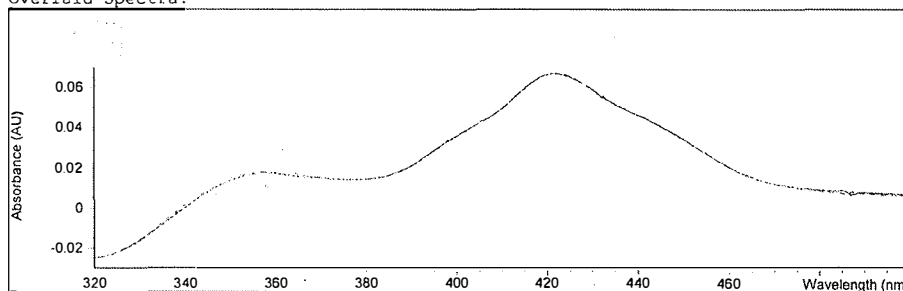
Pripremljena su dva ekstrakta te je za svaki ekstrakt po dva puta uziman uzorak za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Za svaki je uzorak po tri puta izmjerena apsorbancija. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u ekstraktima nadzemnih dijelova dubrovačke zečine prikazani su u tablici 3., a udio flavonoida

Tablica 3. Sadržaj flavonoida u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

	Masa uzorka (g)	$A_{425\text{ nm}}$	Srednja vrijednost $A_{425\text{ nm}} \pm \text{sd}$	% flavonoida	Srednja vrijednost $\% \pm \text{sd}$	
Ekstrakt 1	0,2000	0,063		0,24		
		uzorak 1	0,063	0,063±0,000	0,24	0,24±0,00
			0,062		0,24	
	uzorak 2		0,066		0,26	
		uzorak 2	0,065	0,066±0,000	0,26	0,26±0,00
			0,066		0,26	
Ekstrakt 2	0,2005	0,067		0,26		
		uzorak 1	0,067	0,067±0,000	0,26	0,26±0,00
			0,067		0,26	
	uzorak 2		0,064		0,25	
		uzorak 2	0,064	0,064±0,000	0,25	0,25±0,00
			0,063		0,24	

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 4/29/15 Time 11:03:46 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVADOM-1\FLAV2OT2.SD Created : 4/28/15 14:24:48

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<422nm>	Abs<425nm>
1		6.7398E-2	6.5711E-2
2		6.7132E-2	6.5382E-2
3		6.7385E-2	6.5981E-2

Slika 5. Primjer spektra dobivenog mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

iznosio je prosječno 0,25 %. Slika 5. donosi primjer spektra dobivenog mjerenjem apsorbanije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova dubrovačke zečine.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (20). Određivanje se temelji na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata, koja s nitrit-molibdat reagensom daje žuto obojene komplekse, a zaluzivanjem otopine boja prelazi u narančastocrvenu (21). Apsorbancija se mjeri na 505 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, izražen kao ružmarinska kiselina, izračuna se pomoću specifične apsorbanije koja za ružmarinsku kiselinu iznosi 400.

Dva je puta ponovljena ekstrakcija nadzemnih biljnih dijelova te su od svakog od dobivenih ekstrakata uzeta po dva uzorka za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina. Apsorbancija je izmjerena tri puta za svaki uzorak.

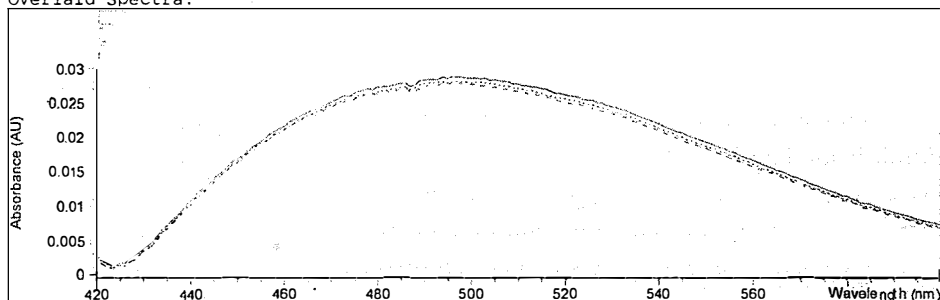
Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine prikazani su u tablici 4., a primjer spektra dobivenog mjerenjem apsorbanije fenolnih kiselina donosi slika 6. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine, izražen kao ružmarinska kiselina, iznosio je $0,38 \pm 0,01$ %.

Tablica 4. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

	Masa uzorka (g)	$A_{505\text{nm}}$	Srednja vrijednost $A_{505\text{nm}} \pm \text{sd}$	% fenolnih kiselina	Srednja vrijednost % $\pm \text{sd}$	
Ekstrakt 1	0,1999	0,031		0,39		
		uzorak 1	0,031	$0,031 \pm 0,000$	0,39	$0,39 \pm 0,01$
			0,030		0,38	
	uzorak 2		0,029		0,36	
		uzorak 2	0,029	$0,029 \pm 0,000$	0,36	$0,36 \pm 0,00$
			0,029		0,36	
Ekstrakt 2	0,1996	0,031		0,39		
		uzorak 1	0,028	$0,029 \pm 0,001$	0,35	$0,37 \pm 0,01$
			0,029		0,36	
			0,033		0,41	
		uzorak 2	0,029	$0,030 \pm 0,002$	0,36	$0,38 \pm 0,02$
		0,029		0,36		

Method file : FENKIS.M (modified) Last update: Date 4/29/15 Time 11:11:53 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVADOM-1\PAU230T3.SD Created : 4/27/15 14:35:22

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<505nm>	#	Name	Abs<505nm>
1		2.8425E-2	3		2.7305E-2
2		2.7760E-2			

Slika 6. Primjer spektra dobivenog mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

ZAKLJUČAK

U okviru ovoga rada provedena je fitokemijska karakterizacija endemične vrste *Centaurea ragusina* L. (dubrovačka zečina), koja je obuhvatila kvalitativnu i kvantitativnu analizu bioaktivnih polifenolnih spojeva. Potvrđena je prisutnost trjeslovina u ispitanim biljnim ekstraktima primjenom kemijskih reakcija stvaranja obojenih produkata i/ili taloga. Također je ispitana prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina primjenom tankoslojne kromatografije, a na temelju R_F vrijednosti i boje detektiranih kromatografskih zona potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina i klorogenske kiseline u metanolnom ekstraktu dubrovačke zečine. Količina polifenolnih spojeva u analiziranim ekstraktima nadzemnih dijelova dubrovačke zečine određena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj ukupnih polifenola iznosio je $3,04 \pm 0,04$ %, udio trjeslovina je bio $0,36 \pm 0,04$ %, flavonoidi su određeni u količini od $0,25 \pm 0,00$ %, dok je kvantitativna analiza fenolnih kiselina pokazala da je njihov sadržaj u ispitanim ekstraktima iznosio $0,38 \pm 0,01$ %. Unatoč tome što izmjerene količine polifenolnih tvari u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine nisu visoke kao u trjeslovinskim droga (primjerice, turičina zelen – *Agrimoniae herba*, s 4–10 % trjeslovina), niti kao u flavonoidnih droga (npr. glogov list i cvijet – *Crategi folium cum flore*, s 1–2 % flavonoida kvercetinskog aglikona) (22), provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja znatan prilog znanstvenom istraživanju hrvatskih endema i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu dubrovačke zečine, posebice u odnosu na sadržaj fenolnih tvari dokazanih bioloških učinaka.

1. Nikolić T, Milović M, Bogdanović S, Jasprica N. Endemi u hrvatskoj flori. Zagreb: Alfa, 2015.
2. Nikolić T (ur.). Flora Croatica Database. Zavod za botaniku, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; <http://hirc.botanic.hr/fcd>, datum pristupa: 2.3.2016.
3. Erhardt W, Götz E, Bödeker N, Seybold S. Zander-Handwörterbuch der Pflanzenamen. 17. Aufl. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH und Co., 2002.
4. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europaea, Vol. 4, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae). Cambridge-London-New York-Melbourne: Cambridge University Press, 1976.
5. <http://www.opcinakonavle.hr/index.php/arhiva/306-botanike-zanimljivosti-u-konavlima>, datum pristupa: 2.3.2016.
6. Šilić Č. Endemične biljke. Sarajevo: Svjetlost, 1990.
7. Radić S, Prolić M, Pavlica M, Pevalek-Kozlina B. Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L. Environ Exp Bot. 2005; 54:213–218.
8. Radić S, Radić-Stojković M, Pevalek-Kozlina B. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. J Plant Physiol. 2005; 163:1284–1292.
9. Politeo O, Skocibusic M, Carev I, Burcul F, Jerkovic I, Sarolic M, Milos M. Phytochemical profiles of volatile constituents from *Centaurea ragusina* leaves and flowers and their antimicrobial effects. Nat Prod Commun. 2012; 7:1087–1090.
10. Radić S, Peharec Štefanić P, Lepeduš H, Roje V, Pevalek-Kozlina B. Salt tolerance of *Centaurea ragusina* L. is associated with efficient osmotic adjustment and increased antioxidative capacity. Environ Exp Bot. 2013; 87:39–48.
11. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. Food Chem Toxicol. 2011; 49:2914–2920.
12. Zengin G, Cakmak YS, Guler GO, Aktumsek A. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. Food Chem Toxicol. 2010; 48:2638–2641.
13. Domac R. Flora Hrvatske. Zagreb: Školska knjiga, 1994.
14. Fischer R, Kartnig Th. Drogenanalyse. Wien-New York: Springer Verlag, 1978.
15. Luckner M. Prüfung von Drogen. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1966.
16. Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije 1, Interna skripta. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmakognoziju, 2008.
17. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1983.
18. Jurišić Grubešić R, Vuković J., Kremer D., Vladimir-Knežević S. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: prevalidation and application on *Plantago* L. species. J Pharm Biomed Anal. 2005; 39:837–842.
19. Jurišić Grubešić R, Vuković J., Kremer D., Vladimir-Knežević S. Flavonoid content assay: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. Acta Chim Slov. 2007; 54:397–406.
20. European Pharmacopoeia, Sixth Edition, Vol. 2, Strasbourg: Council of Europe, 2007.

21. Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-bioke-mijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008.
22. Kuštrak D. Farmakognozija – Fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005.

Primljeno 7. ožujka 2016.