

Kvalitativna fitokemijska karakterizacija crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.) i lovorastog likovca (*D. laureola* L.)

Jurišić Grubešić, Renata; Teklić, Marina; Kursar, Sanja; Kremer, Dario; Vuković Rodriquez, Jadranka; Randić, Marko

Source / Izvornik: *Farmaceutski glasnik*, 2013, 69, 229 - 248

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:596282>

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](#)



Kvalitativna fitokemijska karakterizacija crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.) i lovorastog likovca (*D. laureola* L.)

RENATA JURIŠIĆ GRUBEŠIĆ¹, MARINA TEKLIĆ¹, SANJA KURSAR¹,
DARIO KREMER¹, JADRANKA VUKOVIĆ RODRÍGUEZ¹, MARKO RANDIĆ²

¹Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 10000 Zagreb, Hrvatska

²Javna ustanova »Priroda«, Grivica 4, 51000 Rijeka, Hrvatska

Qualitative phytochemical characterization of garland flower (*Daphne cneorum* L.) and spurge laurel (*D. laureola* L.)

Abstract – Qualitative analysis of some bioactive compounds of garland flower (*Daphne cneorum* L.) and spurge laurel (*D. laureola* L.) from Thymelaeaceae family was conducted. Flavonoids, coumarins, phenolic acids, saponins, sterols, triterpenes, and triterpenic acids were detected using thin-layer chromatography procedures (TLC) in methanolic extracts of leaves, stems, and roots. The presence of tannins was proved by using reactions of developing coloured products and precipitates.

(Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, HR-10000 Zagreb and Public institution »Priroda«, HR-51000 Rijeka, Croatia)

UVOD

Od davnine su se lijekovi dobivali iz prirodnih izvora: iz mineralnog, životinjskog i biljnog svijeta. Biljke su vjerojatno najstariji izvori ljekovitih tvari, a primjenjuju se cijele biljke, njihovi pojedini dijelovi, izlučevine ili ekstrakti biljnih tvari, kako za čuvanje i održavanje zdravlja, tako i za liječenje različitih poremećaja i oboljenja. Razvojem znanosti te suvremenih istraživačkih tehnika i analitičkih metoda, omogućeni su različiti postupci izolacije, određivanja strukture i sadržaja djelatnih tvari u biljci, što stvara preduvjet za upoznavanje mehanizama djelovanja biološki aktivnih tvari, a time i temelj otkrivanja i uvođenja novih biljnih lijekova. Suvremena je medicina sve većom uporabom gotovih lijekova zanemarila ljekovitu vrijednost mnogih biljaka. No, interes za »prirodno« danas ponovo raste pa je i fitofarmacija opet sve zastupljenija, kako u popularnoj, tako i u znanstvenoj literaturi.

S namjerom istraživanja ljekovitog potencijala slabo istraženih vrsta roda likovac (*Daphne* L.), u ovom je radu provedena kvalitativna analiza biološki aktivnih spojeva lista, stabljike i korijena dviju zanimljivih biljnih vrsta iz bogate i raznolike riznice hrvatske flore: crvenog i lovorastog likovca (*Daphne cneorum* L. i *D. laureola* L., *Thymelaeaceae*).

Daphne cneorum L. (sinonimi: *Daphne julia* Koso-Pol., *Thymelaea cneorum* (L.) P. Gaertn., B. Mey. et Scherb.), hrvatskog imena crveni likovac, a javlja se i pod nazivima: crveni uskolisni likovac, telovčica, brijačica, crveni jeremičak i cmilje (1), vazdazeleni je grm visine 10–40 cm, a širine barem dva puta veće od visine (slika 1.). Ima ravne ili uzdižuće grane koje su prilično duge, katkad malo svijene, tanke i glatke, u mladosti mekano-dlakave i sivkaste, a kasnije crvenkastosmeđe. Listovi (slika 2.) su sjedeći, naizmjenični, kožasti i kruti, duljine 10–25 mm i širine 2–6 mm, obično 3–4 puta dulji nego širi. S gornje su strane tamnozeleni, glatki i sjajni, dok su s donje strane zelenkastoplavi. Oblikom su obrnutojajasti, duguljasti ili duguljasto suličasti, zaobljena ili izrubljena vrha, koji završava malim, tankim često unatrag svinutim šiljkom. Biljka cvate od travnja do svibnja, ponekad i do rujna. Na vrhovima grančica nalazi se 5–10 cvjetova združenih u glavičaste cvatove. Cvjetovi su dvospolni, pravilni, gotovo sjedeći, najčešće svijetlo do tamno ružičaste, rjeđe bijele boje i ugodnog mirisa. Obavijeni su tupim, mekanodlakavim pricvjetnim listovima nalik na prave listove. Ocvijeće je građeno od 6–10 mm dugog, uskog, valjkastog, obojenog cvjetišta koje završava s 4 lapa čaške. Latica nema. U cvijetu se nalazi osam prašnika poredanih u dva kruga, od kojih su četiri prirasla na gornjem rubu cvjetišta, a četiri malo niže. Prašničke niti su kratke. Plod je koštunica nalik na bobu, više-manje eliptičnog oblika, suhokožičasta, u početku žutosmeđe, a po dozrijevanju crvenosmeđe boje. Sjemenke ostaju zatvorene unutar cvjetišta sve do zrelosti, a u njihovu rasprostiranje pomažu mravi. Klijanje sjemenaka je moguće samo ako su prethodno bile izložene mrazu. Sjemenke su otrovne, posebice za sisavce (2).



Slika 1. *Daphne cneorum* L. (3).



Slika 2. *Daphne cneorum* L. – listovi (4).

Svi biljni dijelovi vrste *D. cneorum* su otrovni za ljude i ostale sisavce. Kontakt s biljnim sokom može izazvati iritaciju kože i bol. Posebice je opasna ingestija plodova (slika 3.). Ako dođe do trovanja, simptomi su sljedeći: iritacija i jaka bol u ustima i grlu, oticanje sluznice usne šupljine, osjećaj žeđi, bolovi u području abdomena, krvavi proljev, povraćanje, otežano disanje, oštećenje i bolovi u bubrezima, neurološka slabost te moguća koma i smrt. Ne postoji specifični protuotrov, već se liječe simptomi (5, 6).



Slika 3. *Daphne cneorum* L. – plodovi (7).

Daphne laureola L. (slika 4.) (lovorasti, vazdazeleni, lovorolisni, lovorolisti likovac) javlja se i pod nazivima: lovorčica, ljupčac, ljubčec, ljubčac vazdazelen, misečno zelje, strupac, uho vučje, ušatak, ušatak, maslinica, divlja lovorika i ličac (1), dok se u stranoj literaturi nalaze nazivi: *Daphne laurel*, *Spurge laurel* ili *Dwarf bay* (engleski);

Immergrüner seidelbast, Lorbeerseidelbast (njemački); Adelfilla, Laureola macho (španjolski); Auréole (francuski) (8).



Slika 4. *Daphne laureola* L. (autorska fotografija, dr. sc. Dario Kremer).

D. laureola var. *philippii* i *D. laureola* var. *laureola* su dvije registrirane podvrste te biljne vrste.

D. laureola je vazdazeleni grm visine 0,5–1,5 m, a može živjeti dulje od 40 godina. Mlade biljke obično imaju jednu okomitu stabljiku s nekoliko bočnih grana, pri čemu je vertikalni rast karakterističan u prvih 10 do 15 godina. Starije biljke imaju veći broj grana koje bujaju iz stare stabljike, tako da rast može biti zakrivljen na bazi, uz širenje prema gore. Kora stabljike i grana je tanka, u neodrvjenjale stabljike zelena, a u odrvenjele žuto-siva. Listovi su spiralno raspoređeni, suličastog oblika, duljine 4–13 cm i širine 1–3 cm. S gornje strane su tamnozeleni, glatki i sjajni, dok su s donje strane



Slika 5. *Daphne laureola* u cvatu (11).

svjetliji. Biljka cvate od ožujka do svibnja, pri čemu se razvija slabije uočljivo žuto-zeleno cvijeće, obično skriveno bazama listova. Cvjetovi su mirisavi, a miris sličan mirisu meda. Grozdasti cvatovi, sastavljeni od 5 do 10 cvjetova, sjedeći su ili na kratkim stapkama (slika 5.). Svaki cvijet je oko 9 mm dug, jednostavnog ocvijeća bez latica, sastavljenog od četiri lapa. Cvjetovi su dvospolni (hermafroditni), a sadrže mali tučak i osam prašnika poredanih u dva koncentrična kruga. Oprašivanje obavljaju pčele, leptiri i moljci (entomofilna vrsta). Plod je plavo-crna koštunica, jajastog oblika, duljine 8–13 mm, otrovna za čovjeka, ali ne i za ptice, a dozrijeva krajem ljeta (slika 6.). Svaka koštunica sadrži po jednu sjemenku (9, 10).



Slika 6. *Daphne laureola* – plodovi (autorska fotografija, dr. sc. Dario Kremer).

Lovorasti likovac može tolerirati niske razine svjetlosti, u rasponu od djelomične pa sve do duboke sjene. Grm preferira srednja (ilovasta) i teška (glinasta), neutralna do blago kisela, propusna tla, ali se isto tako često može naći i na karbonatnim tlima, kao i uz obale mora u Engleskoj. U mediteranskim krajevima najčešće se pronalazi u sjenovitim planinskim šumama.

Vrsta *D. laureola* je rasprostranjena u Velikoj Britaniji, Belgiji, Njemačkoj, Švicarskoj, Austriji, Mađarskoj, Sloveniji, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Srbiji, Rumunjskoj, sjevernoj Turskoj, Albaniji, Makedoniji, Bugarskoj, Grčkoj, Italiji (uključujući Siciliju), Francuskoj (uključujući Korziku), Španjolskoj, te u Alžiru i Maroku. Na svim prirodnim nalazištima u Hrvatskoj zaštićena je Zakonom o zaštiti prirode od 1952. godine. Danas je još rasprostranjena u gorskom području istočne, sjeverne i zapadne Hrvatske: Požeška kotlina, Kalnik, Ravna gora, Ivanščica, Strahinščica, Medvednica, Samoborsko gorje, Klek, Učka te Velebit. Stanište su joj mezofilne gorske bukove šume, ali zalazi i u termofilno područje crnog i bijelog graba te u termofilne listopadne šume (12, 13).

Lovorasti likovac u nekim zemljama ima sposobnost brzog osvajanja novog životnog prostora, zbog čega može postati i invazivni korov, čije je širenje teško kontrolirati. Pri tome mijenja kemiju tla i prirodnu floru. S druge strane, zbog sjajnog, zimzelenog lišća i mirisnih cvjetova, biljka se koristi kao ukrasna vrsta (14).

Iako su svi dijelovi toga grma otrovni, neki od toksičnih spojeva su proučavani kao mogući lijek za liječenje leukemije. U narodnoj su se medicini listovi lovorastog likovca koristili kao emenagog, dok u ranim stadijima trudnoće listovi i kora biljke djeluju kao abortiv, zbog čega se ona često zloupotrebljavala. Listovi također pokazuju purgativno djelovanje, a mogu poslužiti i kao emetik. Poznata je primjena lovorastog likovca i u liječenju reume te kožnih bolesti (5).

Pripadnici roda *Daphne* sadržavaju iritanse, kao što su diterpeni (mezerein i dafnetoksin), triciklički dafnin, te drugi kumarinski glikozidi koji mogu pridonijeti toksičnosti. Osim navedenih spojeva, iz vrsta roda *Daphne* također su izolirane sljedeće tvari: vezikulozin, izovezikulozin, gniditrin, gnidicin, ekškoekariatoksin (diterpenska struktura); umbeliferon, acetilumbeliferon, dafnoretin, dafneticin, izodafneticin, dafnetin, triumbelin, 7,8-dihidroksi-kromen-2-on i 7-hidroksi-8-metoksikumarin (kumarinski spojevi); luteolin, orijentin, izoorijentin, apigenin-7- β -glukozid, genkvanin, 5- β -D-primeverozil genkvanine, 2,5,7,4'-tetrahidroksiizoflavanol i hesperidin (flavonoidi), te β -sitosterol (steroidni spoj) (15–19). Mnoge od tih tvari imaju različite terapijske učinke: antimalarijski, analgetički, protuupalni (20, 21), antimikrobni (19), antioksidativni i antinociceptivni (22, 23), kao i potencijalno terapeutsko djelovanje na karcinome dojke i pluća (24, 25). Posljednjih desetljeća fenolne tvari privlače veliku pozornost javnosti i bude znatan interes svjetske znanosti zbog svojih povoljnih zdravstvenih učinaka kao antioksidansa. Osobito se velika važnost pridaje istraživanju flavonoida radi potencijalnih profilaktičkih i terapeutskih učinaka na različite bolesti, s posebnim naglaskom na njihovom antioksidativnom, antimikrobnom, antiviralnom, antiangiogeničkom, imunomodulatornom, protuupalnom i antitumorskom djelovanju (26–34).

U okviru ovoga rada provedena je kvalitativna analiza biološki aktivnih spojeva (flavonoida, trjeslovina, kumarina, saponina, triterpenskih spojeva i sterola) u vodeno-alkoholnim ekstraktima lista, stabljike i korijena crvenog i lovorastog likovca, kao doprinos fitokemijskim istraživanjima roda likovca.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Istraživanju su podvrgnuti na zraku osušeni uzorci lista, stabljike i korijena crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.) i lovorastog likovca (*D. laureola* L.), skupljeni u rujnu 2009. godine na području Oštrca u Samoborskom gorju, odnosno Gornjeg Jelenja. Identifikacija biljnog materijala i utvrđivanje morfoloških obilježja provedeni su na Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, usporedbom s dostupnim literaturnim podacima (35, 36).

Kvalitativna analiza flavonoida

Kvalitativna analiza flavonoida provedena je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC). U radu su primijenjene staklene kromatografske ploče veličine 20 cm × 20 cm, s tankim slojem Kieselgela 60 F₂₅₄. Biljni su uzorci pripremljeni pojedinačnom ekstrakcijom 0,1 g praškaste droge (list, stabljika i korijen) s po 2 mL metanola, tijekom 10 minuta na vodenoj kupelji zagrijanoj na 60 °C. Ispitivanje prisutnosti flavonoida provedeno je u mobilnoj fazi sastavljenoj od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5 %-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami su promatrani pod UV zračenjem na valnoj duljini od 365 nm (37, 38). Za dobivanje referentnih kromatograma pripremljene su metanolne otopine standarda (1 mg/mL) sljedećih flavonoida i fenolnih kiselina: kvercetin, kvercitrin, hiperozid, rutina, naringenin, naringin te klorogenske i kavene kiseline.

Kvalitativna analiza kumarina

Dokazivanje kumarina provedeno je kemijskom reakcijom s 1 M natrijevim hidroksidom i metodom tankoslojne kromatografije (TLC). Za kemijsku reakciju dokazivanja kumarina pojedinačno se ekstrahira po 0,2 g pulveriziranih listova, stabljika i korijena crvenog i lovorastog likovca s 5 mL 70 %-tnog metanola te filtrira. Filtrati se potom zaluže s nekoliko kapi 1 M natrijeva hidroksida i promatraju pod UV zračenjem na valnoj duljini od 365 nm. Žutozelena fluorescencija ukazuje na prisutnost kumarinskih spojeva. TLC analiza kumarina provedena je u prethodno opisanom kromatografskom sustavu za dokazivanje flavonoida, uz detekciju na UV-254 nm i UV-365 nm (38).

Kvalitativna analiza saponina i triterpena

Dokazivanje saponina i triterpena provedeno je metodom tankoslojne kromatografije (TLC). U radu su korištene staklene kromatografske ploče veličine 10 cm × 20 cm, s tankim slojem Kieselgela 60 F₂₅₄. Metanolni ekstrakti pripreme se pojedinačnom ekstrakcijom 1 g pulveriziranih listova, stabljika i korijena analiziranih biljnih vrsta s po 10 mL 70 %-tnog metanola na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo, u trajanju od 30 minuta. Bistri se filtrati upare do suha, a ostatak otopi u malo metanola. Po 20 µL metanolne otopine nanese se na tanki sloj adsorbensa. TLC-odjeljivanje pojedinačnih tvari postiže se primjenom mobilne faze u sastavu: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V), a njihova se detekcija provodi prskanjem kromatograma reagensom (smjesa 5 mL klorosulfonske kiseline i 10 mL ledene octene kiseline, uz oprezno hlađenje), te grijanjem kromatograma nekoliko minuta na 105 °C (38).

Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina

Metanolni ekstrakti lista, stabljike i korijena crvenog i lovorastog likovca, pripremljeni prethodno opisanim postupkom ekstrakcije saponina, podvrgnu se TLC-odjeljivanju. U radu su korištene staklene kromatografske ploče veličine 10 cm × 20 cm.

Kao stacionarna faza primijenjen je adsorbens Kieselgel 60 F₂₅₄, a kao mobilna faza benzen i aceton u omjeru 9:1 (V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provodi se prskanjem kromatograma klorosulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C (38).

Kvalitativna analiza trjeslovina

Priprava ekstrakta

U prah se samelje po 0,5 g listova, stabljika i korijena vrsta *Daphne cneorum* i *D. laureola* te pojedinačno ekstrahira 15 minuta s 50 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakti se profiltriraju i primijene u sljedećim ispitivanjima.

Opće reakcije s metalnim solima i želatinom

1. Dvije kapi 5 %-tne otopine željezova(III) klorida dodaju se u 2 mL filtrata.
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 uliju se 2 mL 1 %-tne otopine želatine.

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 6 mL pojedinog biljnog ekstrakta doda se po 3 kapi otopine formaldehida i 6 kapi 10 %-tne klorovodične kiseline. Sadržaj se ugrije do vrenja, ohladi i profiltrira, a 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.

Dodatni dokaz prisutnosti kondenziranih trjeslovina predstavlja pozitivni 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 (37).

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

U 5 mL filtrata, dobivenog u prethodnoj reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom, doda se 1 g natrijeva acetata (bez potresivanja epruvete), a zatim 1 mL 1 %-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju javlja se ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH (39, 40).

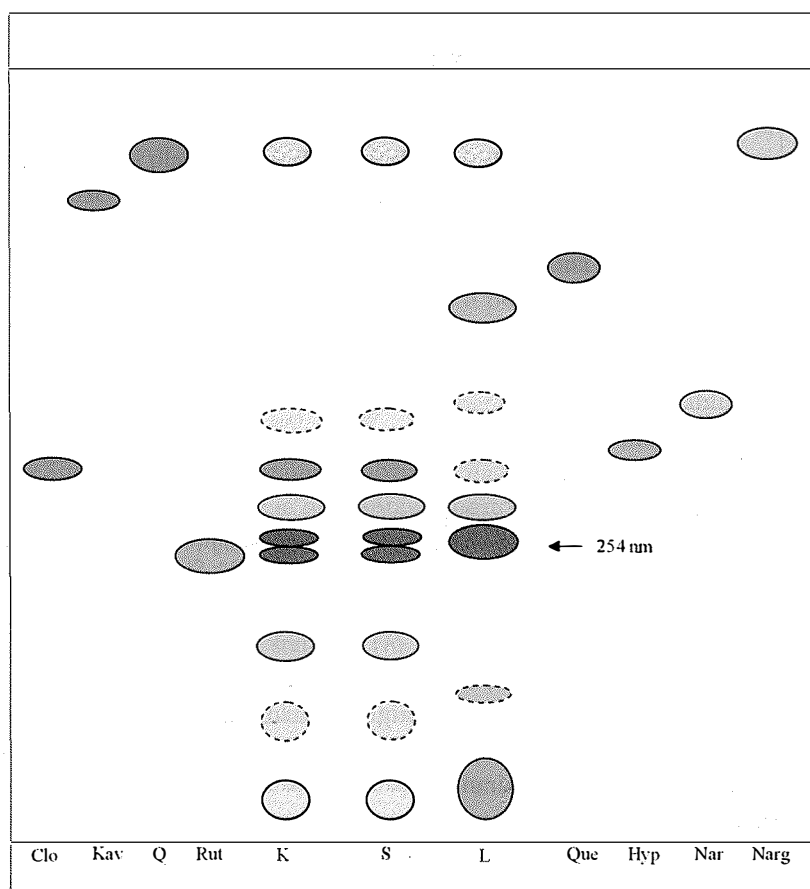
REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati kvalitativne analize flavonoida i kumarina

Otopine standarda (kvercetin, kvercitrin, rutin, hiperozid, naringenin, naringin, klorogenska i kavena kiselina) te ispitivani metanolni ekstrakti listova, stabljike i

korijena crvenog i lovorastog likovca analizirani su primjenom kromatografske metode na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz razvijatelj etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V). Detekcija je provedena prskanjem NST/PEG reagensom, nakon čega su kromatogrami vizualizirani pod UV zračenjem na 254 nm i 365 nm.

Prema boji fluorescencije i odgovarajućim R_F vrijednostima, može se pretpostaviti da narančaste zone pripadaju flavonoidnim spojevima, a plave zone spojevima kumarinske strukture i fenolnim kiselinama. Dobiveni kromatogrami flavonoidnih i srodnih tvari iz crvenog i lovorastog likovca prikazani su na slici 7a. i 7b., a pripadajuće R_F vrijednosti kromatografskih mrlja donosi tablica 1.



Slika 7a. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima korijena (K), stabljike (S) i lista (L) crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.). Poredbene tvari: Clo – klorogenska kiselina; Kav – kavena kiselina; Q – kvercetin, Rut – rutin; Que – kvercitrin; Hyp – hiperozid; Nar – naringin; Narg – naringenin; Mobilna faza: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V); Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄; Detekcija: NST/PEG i UV-365 nm/254 nm.



Slika 7b. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima korijena (K), stabljike (S) i lista (L) lovorastog likovca (*Daphne laureola* L.). Poredbene tvari: Clo – klorogenska kiselina; Kav – kavena kiselina; Q – kvercetin, Rut – rutin; Que – kvercitrin; Hyp – hiperozid; Nar – naringin; Narg – naringenin; Mobilna faza: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V); Stacionarna faza: Kieselgel 60 F254; Detekcija: NST/PEG i UV-365 nm/254 nm.

Za crveni likovac (*D. cneorum*) uočena je velika sličnost među kromatogramima ekstrakata stabljike i korijena, gdje je postignuto razdvajanje osam plavo obojenih zona različitih intenziteta, što ukazuje na raznolikost spojeva kumarinske strukture i fenolnih kiselina. Također je detektirana jedna narančasta zona ($R_F = 0,96$), koja prema boji i R_F vrijednosti odgovara aglikonu kvercetinu. Suprotno tome, na kromatogramu ekstrakta lista nisu uočene plave zone u području nižih R_F vrijednosti. U tom su ekstraktu detektirane četiri narančaste zone (R_F vrijednosti: 0,19; 0,31; 0,69 i 0,96), za koje se pretpostavlja da su flavonoidi kvercetinskog aglikona. Prema dobivenim R_F vrijednostima, tri zone nisu odgovarale primijenjenim flavonoidnim standardima, osim zone R_F vrijednosti 0,96 koja odgovara kvercetinu. S obzirom na literaturne podatke (19), u nekim je vrstama roda *Daphne* od flavonoida prisutan također luteolin

koji s NST/PEG reagensom daje narančastu boju, ali je literaturna R_F vrijednost luteolina u primijenjenom kromatografskom sustavu oko 0,54, a niti jedna narančasta zona u ispitanim biljnim uzorcima nije tome odgovarala. Jednako tako, s obzirom na nedavno objavljene rezultate o sadržaju ukupnih flavonoida (koji se izražava kao sadržaj kvercetina) u istraživanim vrstama roda *Daphne* (41), za pretpostaviti je da neidentificirane narančaste zone pripadaju flavonoidima kvercetinog aglikona. Sukladno literaturnom izvoru (42), koji za isti TLC sustav na $R_F = 0,64$ navodi klorogensku kiselinu, može se pretpostaviti da bi plavo obojene zone prisutne na kromatogramima svih ekstrakata u području oko te R_F vrijednosti ($R_F = 0,63$) mogle pripadati upravo toj fenolnoj kiselini. Srodna kavena kiselina se u istom kromatografskom sustavu detektira kao svijetloplava zona na $R_F = 0,90$, no ona nije zabilježena u ispitanim biljnim uzorcima (43, 44). S obzirom na to da su kumarinski spojevi zastupljeni u vrstama roda likovac (15, 41), kromatogram je promatran i pod UV zračenjem na 254 nm. Za sve analizirane uzorke uočeno je gašenje fluorescencije karakteristično za kumarine, a R_F vrijednosti su se kretale oko 0,5.

Na kromatogramu ekstrakata lovorastog likovca postignuto je razdvajanje većeg broja narančastih i plavo obojenih zona različitih intenziteta. Na osnovi boje i fluorescencije može se pretpostaviti da narančaste zone pripadaju flavonoidnim spojevima, a plave zone spojevima kumarinske strukture, fenilkarboksilnim kiselinama i/ili iridoidima. Uočena je izrazita sličnost između pojedinih zona detektiranih na kromatogramima ekstrakta lista i ekstrakta stabljike, što pretpostavlja da su oba dijela biljke podjednako bogata flavonoidima (narančaste zone). Jedinu razliku predstavljaju plave zone s R_F vrijednostima 0,66 i 0,73, koje su uočene na kromatogramu stabljike i korijena, a nema ih u ekstraktu lista. Na kromatogramu ekstrakta stabljike postiglo se razdvajanje najvećeg broja zona, što upućuje na najveću raznolikost spojeva u odnosu na ostale ispitivane biljne organe. S obzirom na najveći udio plavo obojenih zona različitih intenziteta, moguće je pretpostaviti postojanje široke lepeze spojeva kumarinske strukture u stabljici lovorastog likovca. Od analiziranih biljnih organa, korijen je bio najsiromašniji ispitivanim skupinama spojeva, pri čemu su dominirali oni kumarinske strukture. Na kromatogramu ekstrakta korijena uočene su identične zone kao i na kromatogramu ekstrakta stabljike (R_F vrijednosti: 0,56; 0,61; 0,66; 0,73 i 0,99), uz jedinu razliku svijetlo žute zone R_F vrijednosti 0,80, koja nije detektirana ni u listu, niti u stabljici. Nepolarnim aglikonima, kvercetin u i/ili naringenin u, odgovaraju narančastožute zone R_F vrijednosti 0,99 koje su zabilježene u sva tri ispitana ekstrakta. Zona standarda naringina ($R_F = 0,69$) poklapa se sa sličnim zonama u uzorcima ekstrakta lista i stabljike. Pretpostavlja se da bi plavo obojene mrlje prisutne na kromatogramima ekstrakata stabljike i korijena u području R_F vrijednosti 0,66 mogle pripadati poredbenoj klorogenskoj kiselini ($R_F = 0,65$). Srodna kavena kiselina ($R_F = 0,92$) nije potvrđena u analiziranim ekstraktima vrste *D. laureola*. Prisutnost kumarinskih spojeva potvrđena je za sve ispitane ekstrakte lovorastog likovca, u istom kromatografskom sustavu, karakterističnim gašenjem fluorescencije pripadajućih kromatografskih zona ($R_F = 0,56$, UV-254 nm).

Tablica 1. R_f vrijednosti kromatografskih zona flavonoida i fenolnih kiselina u ekstraktima korijena, stabljike i lista crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.) i lovorastog likovca (*D. laureola* L.), te poredbenih tvari: klorogenska kiselina (Clo), kavena kiselina (Kav), kvercetin (Q), rutin (Rut), kvercitrin (Que), hiperozid (Hyp), naringin (Nar) i naringenin (Narg), u razvijaju etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V).

<i>Daphne cneorum</i> L.											
Korijen	Stabljika	List	Clo	Kav	Q	Rut	Que	Hyp	Nar	Narg	
duljina puta mobilne faze (b) = 14,3 cm											
R_f vrijednosti											
1	0,17	0,17	–								
2	–	–	0,19								
3	0,29	0,29	–								
4	–	–	0,31								
5	0,39	0,39	–								
6	0,46	0,46	–								
	(254 nm)	(254 nm)									
7	0,51	0,51	0,50	0,63	0,90	0,96	0,46	0,86	0,67	0,69	0,99
	(254 nm)	(254 nm)	(254 nm)								
8	0,58	0,58	0,58								
9	0,63	0,63	0,63								
10	0,66	0,66	–								
11	–	–	0,69								
12	–	–	0,82								
13	0,96	0,96	0,96								

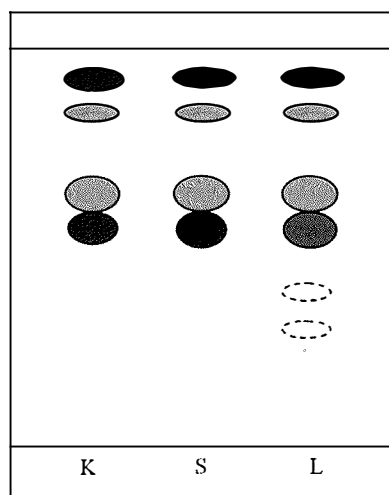
<i>Daphne laureola</i> L.											
Korijen	Stabljika	List	Clo	Kav	Q	Rut	Que	Hyp	Nar	Narg	
duljina puta mobilne faze (b) = 14,2 cm											
R_f vrijednosti											
1	–	0,11	0,11								
2	–	0,21	0,21								
3	–	0,37	0,37								
4	–	0,41	0,41								
5	–	0,47	0,47								
6	0,56	0,56	0,56								
7	–	0,58	0,58								
8	0,61	0,61	0,61	0,65	0,92	0,97	0,47	0,86	0,67	0,69	0,99
9	0,66	0,66	–								
10	–	0,69	0,69								
11	0,73	0,73	–								
12	0,80	–	–								
13	–	0,85	0,85								
14	0,99	0,99	0,99								

Dodatna potvrda prisutnosti kumarina dobivena je zaluzivanjem metanolno-vodenih ekstrakata (70:30, V/V) lista, stabljike i korijena crvenog i lovorastog likovca s 1 M natrijevim hidroksidom i promatranjem pod UV-365 nm. U svim je ekstraktima uočena intenzivna žutozelena fluorescencija, što predstavlja dokaz prisutnosti kumarinskih spojeva.

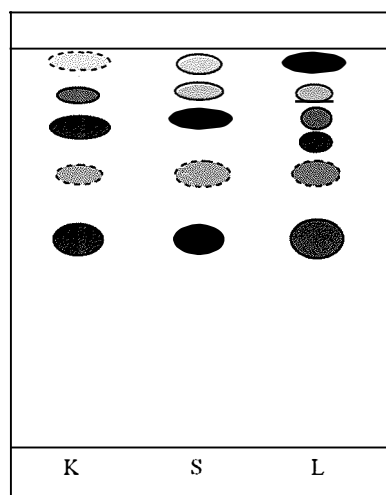
Rezultati kvalitativne analize saponina i triterpena

Metanolni ekstrakti listova, stabljike i korijena crvenog i lovorastog likovca analizirani su metodom tankoslojne kromatografije. Odjeljivanje tvari postignuto je na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄, u mobilnoj fazi: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V). Detekcija razvijenih kromatografskih zona provedena je prskanjem klorsulfonskom kiselinom i zagrijavanjem na 105 °C. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 8a. i 8b., a pripadajuće R_F vrijednosti u tablici 2.

U primijenjenom kromatografskom sustavu, nepolarni triterpeni putuju visoko pa se može pretpostaviti da im pripadaju ljubičaste i smeđe zone R_F vrijednosti 0,97 i 0,98 na kromatogramima dobivenim za crveni i lovorasti likovac. Triterpenske kiseline, oleanolna i ursolna kiselina, prema literaturnim podacima (43) u navedenom kromatografskom sustavu imaju R_F vrijednost 0,89. Dakle, može se pretpostaviti da se detektirane ljubičastosmeđe zone ($R_F = 0,91$ i $0,92$) u ekstraktima korijena, stabljike i listova vrste *D. cneorum* i *D. laureola* odnose upravo na oleanolnu i/ili ursolnu kiselinu. Identične kromatografske zone uočene su na kromatogramima ekstrakata



Slika 8a. Kromatogram saponina i triterpena u metanolnim ekstraktima korijena (K), stabljike (S) i lista (L) crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.). Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄; Mobilna faza: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V); Detekcija: klorsulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.



Slika 8b. Kromatogram saponina i triterpena u metanolnim ekstraktima korijena (K), stabljike (S) i lista (L) lovorastog likovca (*Daphne laureola* L.). Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄; Mobilna faza: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V); Detekcija: klorsulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

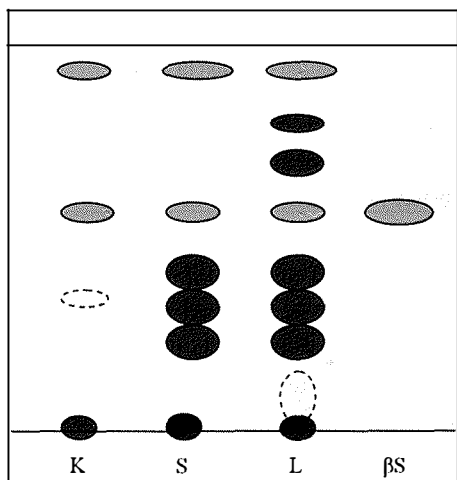
korijena i stabljike obje biljne vrste. Saponinske komponente dokazane su u svim analiziranim ekstraktima kao smeđe zone R_F vrijednosti 0,63 i 0,64. Ekstrakti listova u oba likovca bogatiji su ispitivanim spojevima, što potvrđuje detekcija dodatnih kromatografskih zona, u odnosu na ekstrakte korijena i stabljike (*D. cneorum*: R_F = 0,47 i 0,54; *D. laureola*: R_F = 0,84). Saponinski standard s literaturnom R_F vrijednošću 0,32 u primijenjenom TLC sustavu (43) nije detektiran niti u jednom analiziranom biljnom uzorku.

Tablica 2. R_F vrijednosti kromatografskih zona saponina i triterpena u ekstraktima korijena, stabljike i lista crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.) i lovorastog likovca (*D. laureola* L.) te poredbenih tvari: saponinski standard (S), oleanolna kiselina (O) i ursolna kiselina (U), u razvijaju kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V).

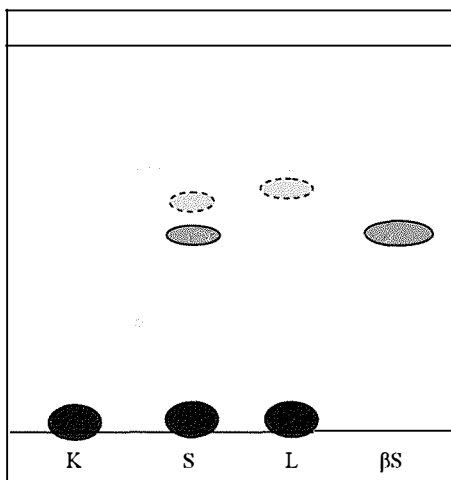
<i>Daphne cneorum</i> L.					
Korijen	Stabljika	List	S (liter.)	O (liter.)	U (liter.)
duljina puta mobilne faze (b) = 14,1 cm					
R_F vrijednosti					
1	–	–	0,47		
2	–	–	0,54		
3	0,63	0,64	0,64	0,32	0,89
4	0,70	0,71	0,70		0,89
5	0,91	0,91	0,91		
6	0,97	0,97	0,97		
<i>Daphne laureola</i> L.					
Korijen	Stabljika	List	S (liter.)	O (liter.)	U (liter.)
duljina puta mobilne faze (b) = 14,2 cm					
R_F vrijednosti					
1	0,63	0,63	0,63		
2	0,81	0,81	0,81		
3	–	–	0,84	0,32	0,89
4	0,87	0,88	0,88		0,89
5	0,92	0,92	0,91		
6	0,98	0,97	0,97		

Rezultati kvalitativne analize sterola i triterpenskih kiselina

Steroli i triterpenske kiseline u metanolnim ekstraktima listova, stabljike i korijena crvenog i lovorastog likovca analizirani su na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄ u mobilnoj fazi benzen – acetone (9:1, V/V). Detekcija je provedena prskanjem kromatograma klorosulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 9a. i 9b., a pripadajuće R_F vrijednosti u tablici 3.



Slika 9a. Kromatogram sterola i triterpenskijh kiselina u metanolnim ekstraktima korijena (K), stabljike (S) i lista (L) crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.). Poredbena tvar: bS – b-sitosterol; Stacionarna faza: Kieselgel 60 F254; Mobilna faza: benzen – aceton (9:1, V/V); Detekcija: klorosulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.



Slika 9b. Kromatogram sterola i triterpenskijh kiselina u metanolnim ekstraktima korijena (K), stabljike (S) i lista (L) lovorastog likovca (*Daphne laureola* L.). Poredbena tvar: bS – b-sitosterol; Stacionarna faza: Kieselgel 60 F254; Mobilna faza: benzen – aceton (9:1, V/V); Detekcija: klorosulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Na kromatogramu dobivenom za oba likovca ističu se hidrofilne smeđe zone koje su zaostale na startnoj liniji (vjerojatno šećerne komponente). Osim toga, kromatografiranjem ekstrakta korijena lovorastog likovca nije dokazana niti jedna druga sastavnica, dok je u ekstraktima stabljike i lista te biljne vrste detektirano još nekoliko kromatografskih zona (stabljika: $R_F = 0,46$ i $R_F = 0,53$; lista: $R_F = 0,55$). Detektirana svijetloljubičasta zona ($R_F = 0,46$) odgovara poredbenom fitosterolu, β -sitosterolu.

Na kromatogramu ekstrakta lista crvenog likovca detektirano je najviše ljubičastosmedih zona, dok je korijen bio najsiromašniji analiziranim spojevima. Uočena je sličnost kromatograma lista i stabljike crvenog likovca, osim što je za uzorak lista utvrđena prisutnost dodatne tri ljubičastosmede mrlje (R_F vrijednosti: 0,14; 0,61 i 0,86). Svijetlosmede zone detektirane u sva tri ekstrakta na položaju $R_F = 0,95$ (ekstrakt korijena) i $R_F = 0,96$ (ekstrakti stabljike i lista) predstavljaju jako lipofilne komponente. Svijetloljubičasta kromatografska zona R_F vrijednosti 0,47 u sva tri ekstrakta odgovara poredbenom β -sitosterolu.

Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

Prisutnost trjeslovina u vodenim ekstraktima listova, stabljike i korijena crvenog i lovorastog likovca dokazana je općim reakcijama s metalnim solima i želatinom.

Dodatkom željezova(III) klorida u vodene ekstrakte crvenog likovca, u uzorku korijena nastalo je smeđe obojenje, u ekstraktu stabljike maslinastozeleno, dok se u

Tablica 3. R_F vrijednosti kromatografskih zona sterola i triterpenskih kiselina u ekstraktima korijena, stabljike i lista crvenog likovca (*Daphne cneorum* L.) i lovorastog likovca (*D. laureola* L.) te poredbenih tvari: β -sitosterol (β S), oleanolna kiselina (O) i ursolna kiselina (U), u razvijaču benzen – aceton (9:1, V/V).

<i>Daphne cneorum</i> L.						
Korijen	Stabljika	List	β S	O	U	
duljina puta mobilne faze (b) = 14,4 cm						
R_F vrijednosti						
1	0,02	0,02	0,01			
2	–	–	0,14			
3	–	0,21	–			
4	0,26	0,27	0,25			
5	–	–	0,29			
6	–	0,32	–	0,47	0,26	0,26
7	–	–	0,35			
8	0,47	0,47	0,47			
9	–	–	0,61			
10	–	–	0,86			
11	0,95	0,96	0,96			

<i>Daphne laureola</i> L.						
Korijen	Stabljika	List	β S	O	U	
duljina puta mobilne faze (b) = 14,0 cm						
R_F vrijednosti						
1	0,01	0,01	0,01			
2	–	0,46	–			
3	–	0,53	–	0,46	0,26	0,26
4	–	–	0,55			

ekstraktu lista javilo tamnozeleno obojenje. U sva tri uzorka obojenje je bilo jako intenzivno i jednakog intenziteta. U reakciji sa željezovim(III) amonijevim sulfatom u ekstraktu korijena razvilo se smeđe obojenje, u ekstraktu stabljike maslinasto zeleno, a u ekstraktu lista tamnozeleno obojenje. U sva tri uzorka obojenje je bilo jednakog intenziteta. Nakon dodatka olovova acetata, u ekstraktu korijena uočeno je nastajanje narančastožutog pahuljastog taloga, a u ekstraktima stabljike i lista nastao je žut talog. Od toga je najintenzivnije obojenje i talog uočeno u ekstraktu korijena, zatim u uzorku lista, a najslabije u ekstraktu stabljike. U reakciji sa želatinom, u sva tri ekstrakta primijećeno je blijedožuto zamućenje i talog, od čega je u ekstraktu korijena ono bilo najintenzivnije, potom u ekstraktu lista, a najslabije u ekstraktu stabljike. Dodatkom formaldehida i klorovodične kiseline nastao je talog koji je netopljiv u otopini kalijeve hidroksida. Taloga je najviše bilo u ekstraktu korijena, zatim u ekstraktu stabljike, a najslabije u ekstraktu lista. Time su dokazane kondenzirane trjeslovine u svim uzorcima

crvenog likovca, potvrđene također u reakcijom s vanilinom i koncentriranom klorovodičnom kiselinom. U filtrat koji se dobio u reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom pojavio se plavi prsten u svim analiziranim uzorcima nakon dodatka natrijeva acetata i željezova(III) amonijeva sulfata. Tim reakcijama su dokazane trjeslovine koje hidroliziraju, s tim da su reakcije bile intenzivnije za ekstrakte stabljike i korijena, što ukazuje na veći udio ispitivanih tvari u tim biljnim organima vrste *D. cneorum*.

Za uzorke lovorastog likovca utvrđeno je da dodatkom željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt lista nastaje tamnozeleno obojenje, s ekstraktom stabljike zelenkastosmeđe, dok se u ekstraktu korijena javila zelenkastosmeđa boja i zamućenje. U reakciji sa željezovim(III) amonijevim sulfatom razvilo se maslinastozeleno obojenje u sva tri uzorka, a najintenzivnije je bilo ono u ekstraktu korijena. Nakon dodatka olovova acetata, u svim ekstraktima uočeno je nastajanje tamno narančastog pahuljastog taloga, koji je bio intenzivniji u ekstraktima stabljike i korijena. Vrlo blago zamućenje otopine (nešto jače u ekstraktu korijena) pojavilo se u reakciji sa želatinom. Dodatkom formaldehida i klorovodične kiseline primijećeno je zelenkasto zamućenje u vodenim ekstraktima stabljike i korijena, a plavi prsten pojavio se u svim analiziranim uzorcima nakon dodatka natrijeva acetata i željezova(III) amonijeva sulfata (dokaz trjeslovina koje hidroliziraju). Navedenim reakcijama dokazana je prisutnost trjeslovina u svim analiziranim ekstraktima lovorastog likovca, ali su reakcije bile intenzivnije za ekstrakte stabljike i korijena, što dokazuje veći udio trjeslovina u tim biljnim organima. Dodatna potvrda prisutnosti kondenziranih trjeslovina u lovorastom likovcu dobivena je samo za uzorke korijena i stabljike (pozitivni vanilinski test), dok se u uzorcima lista nije razvilo crveno obojenje.

ZAKLJUČAK

Primjenom metode tankoslojne kromatografije (TLC) dokazana je prisutnost polifenolnih i kumarinskih spojeva u metanolnim ekstraktima listova, stabljike i korijena crvenog likovca (*Daphne cneorum*) i lovorastog likovca (*D. laureola*). Uzorci korijena i stabljike crvenog likovca pokazali su veliku sličnost s obzirom na razvijene kromatografske zone, od kojih je najviše plavih zona različitog intenziteta (fenolne kiseline i kumarinski spojevi) te narančasta zona koja odgovara flavonoidnom aglikonu kvercetin. Uzorak lista crvenog likovca bio je bogatiji narančastim flavonoidnim komponentama (vjerojatno flavonoidi kvercetinskog aglikona). Za lovorasti je likovac na kromatogramu uočena znatna sličnost uzorka lista i stabljike, dok je korijen bio najsiromašniji analiziranim spojevima, pri čemu su dominirali oni kumarinske strukture. Na kromatogramu ekstrakta stabljike vrste *D. laureola* postiglo se razdvajanje najvećeg broja zona, što upućuje na najveću raznolikost spojeva u odnosu na ostale ispitivane biljne organe. S obzirom na najveći udio plavo obojenih zona različitih intenziteta, moguće je pretpostaviti postojanje široke lepeze spojeva kumarinske strukture, fenolnih kiselina i/ili iridoida u stabljici lovorastog likovca. Prisutnost kumarinskih

spojeva u obje ispitane vrste likovaca potvrđena je karakterističnim gašenjem fluorescencije pripadajućih kromatografskih zona pod UV-254 nm, te izravnim promatranjem zaluženih metanolno-vodenih ekstrakata pod UV-365 nm, uz nastanak žutozelenе fluorescencije.

Metodom tankoslojne kromatografije potvrđena je također prisutnost saponinskih i triterpenskikh tvari u obje istraživane vrste. Uzorci listova bili su bogatiji analiziranim spojevima u odnosu na stabljike i korijen oba likovca. U svim je uzorcima dokazana oleanolna i/ili ursolna kiselina.

Tankoslojnom kromatografijom odijeljeni su steroli i triterpenske kiseline, a prisutnost poredbenog fitosterola (β -sitosterola) dokazana je u svim uzorcima crvenog likovca te u stabljici lovorastog likovca.

Općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga u svim su ekstraktima crvenog i lovorastog likovca dokazane trjeslovine koje hidroliziraju, dok prisutnost kondenziranih trjeslovina nije bila potvrđena samo u uzorcima listova lovorastog likovca.

Rezultati dobiveni u okviru ovoga rada pokazali su raznolikost biološki aktivnih tvari u crvenom i lovorastom likovcu, posebice u grupi kumarinskih spojeva, a time i znatan fitoterapijski potencijal. Budući da je njima srodan obični likovac (*D. mezereum*) u prošlosti imao važno mjesto u pučkoj medicini, razvojem novih analitičkih metoda i suvremenih istraživanja u području biljnih citotoksičnih lijekova, uskoro bi se mogle očekivati nove znanstvene spoznaje o bioaktivnim tvarima i biološkim učincima srodnih biljnih vrsta iz zanimljivog i kompleksnog roda *Daphne* L.

Literatura – References

1. <http://hirc.botanic.hr/fcd/>, datum pristupa: 6.3.2013.
2. http://ag.udel.edu/udbg/broadleaf_evergreen/d_cneorum.html, datum pristupa: 6.3.2013.
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Daphne_cneorum, datum pristupa: 6.3.2013.
4. <http://www.hort.uconn.edu/Plants/d/dapcnc/dapcnc1.html>, datum pristupa: 6.3.2013.
5. Frohne D, Pfander HJ. Poisonous Plants: A Handbook for Doctors, Pharmacists, Toxicologists, Biologists and Veterinarians. London: Manson Publishing, 2005.
6. Zhang Q, Ye N, Sun W-X, Zhang K-M, Jiang J-Q. Phytochemical investigation of *Daphne giraldii* Nitsche (*Thymelaeaceae*). Biochem System Ecol. 2008; 36:63–67.
7. <http://www.about-garden.com/ci/en/00280-F1-daphne/>, datum pristupa: 6.1.2013.
8. <http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Daphne.html>, datum pristupa: 6.3.2013.
9. <http://apps.rhs.org.uk/plantselector/plant?plantid=4436>, datum pristupa: 6.3.2013.
10. http://pozega.hr/summary/Uprava/biocenoze/grmovi/opis/lov_lik.htm, datum pristupa: 6.3.2013.
11. http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0504+0314, datum pristupa: 6.3.2013.
12. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Daphne+lauricola>, datum pristupa: 6.3.2013.

13. <http://www.cvijet.hr/content.aspx?GID=2&id=37>, datum pristupa 6.3.2013.
14. <http://www.evergreen.ca/docs/res/invasives/Invasive-Plant-Profile-Spurge-Laurel.pdf>, datum pristupa: 6.3.2013.
15. Jurišić Grubešić R, Maltar A, Galović L, Kremer D. Obični likovac (*Daphne mezereum* L.) i planinski likovac (*D. alpina* L.): kvalitativna fitokemijska karakterizacija. Farm Glas. 2010; 66:1–16.
16. Ullah N. Phytochemical investigation of *Daphne oleoides*. Doctoral dissertation. Karachi: University of Karachi, 1999.
17. Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb: Poljoprivredni nakladni zavod, 1956.
18. Pan L, Zhang XF, Deng Y, Zhou Y, Wang H, Ding LS. Chemical constituents investigation of *Daphne tangutica*. Fitoterapia. 2010; 81: 38–41.
19. Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris C, Caus M, Pompei R, Bonsignore L. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. Phytomedicine. 2001; 8:302–305.
20. Hoult JRS, Forder RA, Heras B, Lobo IB, Payá M. Inhibitory activity of a series of coumarins on leukocyte eicosanoid generation. Agents Actions. 1994; 42:44–49.
21. Yang Y-Z, Ranz A, Pan H-Z, Zhang Z-N, Lin X-B, Meshnick SR. Daphnetin: a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity. Am J Trop Med Hyg. 1992; 46:15–20.
22. Kupeli E, Tosun A, Yesilada E. Assessment of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Daphne pontica* L. (*Thymelaeaceae*). J Ethnopharmacol. 2007; 113:332–337.
23. Deiana M, Rosa A, Casu V, Cottiglia F, Bonsignore L, Dessì MA. Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. J Am Oil Chem Soc. 2003; 80:65–70.
24. Chaouki W, Leger DY, Liagre B, Cherrah Y, Beneytout JL, Hmamouchi M. Roots of *Daphne gnidium* L. inhibit cell proliferation and induce apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. Pharmazie. 2009; 64:542–546.
25. Hong JY, Nam JW, Seo EK, Lee SK. Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa*. Chem Pharm Bull. 2010; 58:234–237.
26. Farkas O, Jakus J, Héberger K. Quantitative structure – antioxidant activity relationships of flavonoid compounds. Molecules. 2004; 9:1079–1088.
27. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Ag. 2005; 26:343–356.
28. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 2000; 52:673–751.
29. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Therapeut. 2002; 96:67–202.
30. Gordon MH. Significance of dietary antioxidants for health. Int J Mol Sci. 2012; 13:173–179.
31. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. Int J Food Sci Tech. 2001; 36:703–725.
32. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. Proc Nutr Soc. 2010; 69:273–278.
33. Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol in Vitro. 2006; 20:187–210.

34. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Bio Med.* 2004; 36:838–849.
35. Šilić Č. Atlas dendroflоре (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine. Široki Brijeg: Matica hrvatska Čitluk, 2005.
36. Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb: Školska knjiga, 1990.
37. Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije 1, Interna skripta. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmakognoziju, 2008.
38. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1983.
39. Luckner M. Prüfung von Drogen. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1966.
40. Fischer R, Kartnig Th. Drogenanalyse. Wien-New York: Springer Verlag, 1978.
41. Jurišić Grubešić R, Kremer D, Zovko Končić M, Vuković Rodríguez J, Randić M. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne* L. species. *Cent Eur J Biol.* 2012; 7:1092–1100.
42. Četković GS, Đilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Tumbas VT. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts. *Acta Period Technolog.* 2003; 34: 93–102. G. S. Četković, S. M. Đilas, J. M. Čanadanović-Brunet, V. Tumbas, *Acta Period Technol. APTEFF.* 2003; 34:93–102.
43. Jurišić R. Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L. Doktor-ski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, 2003.
44. Prabhu K, Karar PK, Hemalatha S, Ponnudurai K. A preliminary chromatographic detection of phenolic compounds from ethanolic stem extracts of *Viburnum* Linn. species by TLC and PC. *Pharm Sin.* 2011; 2:74–80.

Primljeno 26. veljače 2013.