

# Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta Geranium macrorrhizum L. i G. dalmaticum (Beck) Rech. f., Geraniaceae

---

Šimunić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:913920>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-26**



Repository / Repozitorij:

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



**Marina Šimunić**

**Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola  
vrsta *Geranium macrorrhizum* L. i  
*G. dalmaticum* (Beck) Rech. f., Geraniaceae**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Analitika lijekova 2* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, u suradnji sa Zavodom za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Renate Jurišić Grubešić.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić na ukazanom trudu, strpljenju i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svim kolegama, prijateljima, a posebno svojoj obitelji na nesebičnoj podršci: tati, mami, sestri, bratu i našem anđelu!*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Botanički podaci</b> .....	2
1.1.1. Porodica Geraniaceae (igličevke, iglice) .....	2
1.1.2. Rod <i>Geranium</i> L. (iglice) .....	2
1.1.3. <i>Geranium macrorrhizum</i> L. ....	3
1.1.4. <i>Geranium dalmaticum</i> (Beck) Rech.f. ....	3
<b>1.2. Tradicionalna primjena i bioaktivne tvari vrsta <i>Geranium macrorrhizum</i> i <i>G. dalmaticum</i></b> ....	5
1.2.1. Polifenoli .....	5
1.2.2. Trjeslovine ili tanini .....	10
1.2.3. Flavonoidi .....	14
1.2.4. Fenolne kiseline .....	17
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	20
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	21
<b>3.1. Biljni materijal</b> .....	21
<b>3.2. Aparatura i kemikalije</b> .....	22
<b>3.3. Metode i postupci istraživanja</b> .....	23
3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola .....	23
3.3.2. Kvalitativna analiza trjeslovina .....	23
3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina .....	24
3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida .....	25
3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	27
<b>4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola i trjeslovina</b> .....	27
<b>4.2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina</b> .....	28
<b>4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida</b> .....	32
<b>4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina</b> .....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	37
<b>6. LITERATURA</b> .....	38
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	43

# 1. UVOD

Pripravci od ljekovitog bilja predstavljaju najstariji način liječenja različitih bolesti. Biljke su sastavni dio naše svakodnevne brige o zdravlju, unatoč napretku u znanosti i medicini. Uvriježeno je mišljenje da biljne tvari ne izazivaju neželjene reakcije te na prirodan način djeluju blagotvorno i vraćaju organizmu sklad i ravnotežu. To svakako valja prihvatiti s krajnjim oprezom, poštujući činjenicu da svaka tvar unesena u organizam, bilo da je riječ o hrani, lijeku ili biljnom pripravku, može stupati u interakcije s drugim prisutnim endogenim ili egzogenim tvarima i u određenim okolnostima izazvati i neželjene učinke. No, ukoliko se upotrebljavaju na ispravan način, neželjene reakcije biljnih pripravaka svode se na minimum, a ukupno prevladavaju njihovi blagotvorni ljekoviti učinci.

Pučka medicina od svog postanka koristi mnoge prirodne tvari u liječenju, ali je relativno mali broj njih odabran i prihvaćen u suvremenoj terapiji. U posljednje vrijeme znatno raste interes medicine i farmacije za znanstvena istraživanja terapijske vrijednosti biljnih tvari. Biljne droge dokazane učinkovitosti postaju oficinalne u farmakopejama ili srodnim propisima relevantnim u zdravstvenoj regulativi te se time službeno odobrava njihova terapijska primjena. Potencijalne ljekovite biljke, dakle biljke koje se tradicionalno široko primjenjuju u narodnoj medicini ili one s dokazano ljekovitim srodnicama, podvrgavaju se opsežnim znanstvenim istraživanjima u svrhu utvrđivanja njihove ljekovitosti i, u konačnici, njihova pridruživanja skupini fitoterapeutika.

Fitoterapija je prvi oblik medicine koji je čovjek poznao i datira iz vremena prije pisane povijesti. Stoljećima je bio jedini način liječenja i ublažavanja boli. Naziv fitoterapija u znanstvenu je medicinu uveo francuski liječnik Henri Leclerc 1913. umjesto naziva "biljna medicina". To je metoda liječenja, ublažavanja te sprječavanja bolesti i tegoba upotrebom cijelih ljekovitih biljaka ili njihovih dijelova (cvjetova, listova, korijena, itd.) te upotrebom sastojaka (eteričnih ulja, ekstrakata i drugih izolata), kao i gotovih pripravaka (čajeva, tinktura, masti, kapsula). Suvremena fitoterapija nije „alternativna medicina“, već dio znanstvene medicine. Danas je uglavnom poznat kemijski sastav glavne djelatne tvari, a samu primjenu ljekovitog bilja treba racionalizirati i prepustiti stručnjacima, što je posebice važno pri kombinacijama ljekovitog bilja te njihova uzimanja s drugim lijekovima.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih tvari dokazanog biološkog učinka vrsta *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f. i *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) u svrhu njihove fitokemijske karakterizacije te spoznavanja ljekovitog potencijala.

## 1.1. Botanički podatci

### 1.1.1. Porodica Geraniaceae Juss. 1789. (igličevke, iglice)

Porodica iglice iz reda Geraniales uključuje oko 680 vrsta svrstanih u pet rodova i rasprostranjenih po cijelom svijetu, a najviše u područjima s tropskom i subtropskom klimom (Grdinić i Kremer, 2009).

Porodica igličevke obuhvaća zeljaste biljke, katkad male grmove s nasuprotnim ili izmjeničnim, jednostavnim, (cjelovitim ili razdijeljenim), ponekad više ili manje sastavljenim listovima s palistićima. Cvjetovi su dvospolni, aktinomorfni ili ponekad slabije zigomorfni, s ocvijećem sastavljenim od po pet slobodnih listića čaške i vjenčića. U cvijetu se nalazi jedan tučak i deset obdiplostemonskih prašnika raspoređenih u dva kruga (po pet prašnika u svakom krugu). Pet prašnika vanjskog kruga ponekad je zakržljalo. Plodnica tučka je nadržala, sastavljena od pet plodničkih listova, peteropretinčana, s 1-2 sjemena zametka u svakom pretincu te s pet vratova koji su većinom skupljeni u dugi kljun. Cvjetovi su skupljeni u račvaste, štitaste ili grozdaste cvatove, a katkad mogu biti i pojedinačni. Plod je kalavac koji se raspada na (3 -) 5 (- 8), većinom jednosjemenih merikarpija od kojih svaki ima dugi kljunasti nastavak (Grdinić i Kremer, 2009).

### 1.1.2. Rod *Geranium* L. (iglice)

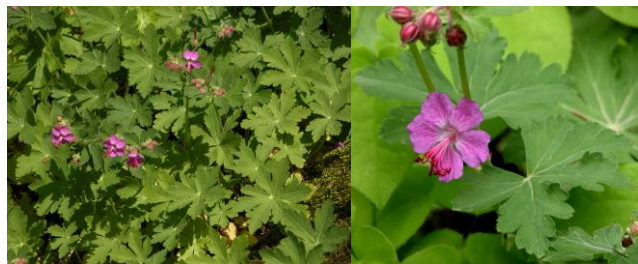
Rod iglica obuhvaća oko 300 biljnih vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu, a posebno u umjerenom pojasu i tropskim planinskim područjima (Webb i Ferguson, 1978). Ukupno je 39 vrsta roda *Geranium* opisano u Europi, dok u Hrvatskoj raste 21 vrsta (Marković, 2000).

Listovi su više ili manje okruglasti, cjeloviti ili razdijeljeni, a svi su, ili mnogi od njih, prizemni. Listovi stabljike (ako postoje) nasuprotni su ili smješteni pri dnu stabljike, odnosno na cvatnim stapkama, često izmjenično poredani. Palistići (ako su prisutni) smješteni su u blizini baze stabljike, a u cvatu se često izmjenjuju. U cvatu je krajnja cvatna stapka obično s dva cvijeta. Cvjetovi su aktinomorfni, a prašnici svi plodni ili je ponekad 3-5 prašnika reducirano u sterilne prašnike. Njuške (stigme) tučka su vlaknaste, a ima ih pet. Plod je kalavac. Merikarpiji se većinom međusobno odvajaju od osnovice prema gore, zadržavajući vanjski dio u obliku dugog kljuna, čiji vrh ostaje neko vrijeme priključen na središnju os koju čine koherentni unutarnji dijelovi svih pet vratova tučka (Webb i Ferguson, 1978).

### 1.1.3. *Geranium macrorrhizum* L.

*Geranium macrorrhizum* L. (stjenjarska iglica) višegodišnja je biljka visoka do 50 cm, s ljubičasto-crvenim cvjetovima. Raste u planinskim i sjenovitim mjestima na karbonatnim tlima u Francuskoj, Italiji, Austriji, na Balkanskom poluotoku, u Rumunjskoj i na zapadu Rusije (Erhardt, Götz, Bödeker i Seybold, 2002).

Stjenjarska iglica je trajnica s jakim, horizontalnim podankom. Stabljika je duljine 20-50 cm, uspravna, s jednim parom palistića ili bez njih. Listovi su 4-10 cm široki, mirisni, razdijeljeni u 5-7 jajolikih režnjeva, koji sa svake strane imaju po 3-4 segmenta. Cvat je s 2-3 ogranka poduprta s dva listića koji su nalik prizemnim (bazalnim) listovima. Bočni ogranci nose 4-9 cvjetova okupljenih u gustoj gronji ili štitastom cvatu. Lapovi su uspravni, crvenkasti, a latice duge 15 mm, grimiznocrvene. Prašnici su dugi 18-22 mm, a prašničke niti zakrivljene. Gornja polovina vrata tučka nije zadebljana i otpada prije nego plod dozrije. Merikarpij je gol.  $2n = 46$ . Zanimljivo je da su patuljaste planinske biljke iz Grčke često gotovo gole i s vrlo malim listićima, slične vrsti *G. dalmaticum*, ali se razlikuju po obliku listova, odnosno lisnih režnjeva (Webb i Ferguson, 1978).

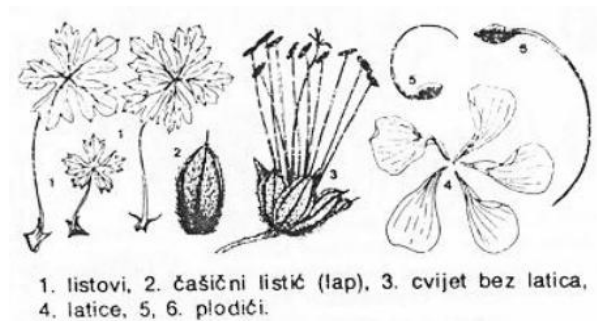


Slika 1. *Geranium macrorrhizum* L. (Foto: D. Kremer).

### 1.1.4. *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f.

*Geranium dalmaticum*, dalmatinska iglica, endemična je vrsta ilirsko-balkanskog područja (*G. macrorrhizum* subsp. *microrrhizon* Freyn ili *G. macrorrhizum* var. *dalmaticum* G. Beck). *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f. raste u pukotinama vapnenačkih stijena i na rubovima kršnih dolina. U Hrvatskoj raste na planini Sv. Ilija na poluotoku Pelješcu, na sjevernim obroncima od 350 metara nadmorske visine na više te na južnim padinama između 300 i 900 metara nadmorske visine. Ima je i u Crnoj Gori (Hum Orahovski, Trijepši, Bioče) te u Albaniji na visini od 200 do 961 metra (Šilić, 1990). Odgovaraju joj kamenjari i svijetle šume dalmatinskoga crnog bora. Duga je vijeka i otporna. Cvate u lipnju i srpnju.

Dalmatinska iglica je višegodišnja biljka visine 5 do 15 cm s ljubičasto-crvenim cvjetovima. Blagog je mirisa i medonosna. Korijen je smeđesivkast, krt, valjkast, s tankim, nitastim korjenčićima. Cvjetno batvo je bez listova, dva puta dulje od listova, u suhom stanju spljošteno, purpurno nahukano. Listovi su glatki i zeleni, stariji često purpurno nahukani, pokriveni jedva primjetnim dlakama, dlanasto razdijeljeni na pet režnjeva, na 4 do 8 cm dugim peteljčkama. Plojka lista je 15-25 mm duga, dok palistića nema. Latice su duge 13 mm, a prašnici 14-18 mm. Cvjetovi su na dugim dlakavim peteljčkama, pravilni, dvospolni, građeni od 5 latica i 5 lapova. Lapovi su žljezdasto-dlakavi ili vlasasti. U cvjetovima je deset prašnika i jedan tučak koji ima nadraslu, poterogradnu plodnicu s pet vratova sraslih u dugi kljun. Plod je višeplodni nadrasli kalavac (cijepavac), koji se cijepa u 5 kljunastih plodića (Šilić, 1990).



Slika 2. Dalmatinska iglica (Šilić, 1990).



Slika 3. *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f. (Foto: D. Kremer).



## 1.2. Tradicionalna primjena i bioaktivne tvari vrsta *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum*

Vrste roda *Geranium* poznate su kao dekorativne i aromatične, sa znatnom količinom eteričnog ulja. U Turskoj se neke vrste toga roda koriste u tradicionalnoj medicini zbog antidijabetičkih, hemostatskih, antihemoroidalnih i antidijaroičnih svojstava, kao i za liječenje boli, groznice i gastrointestinalnih bolesti. Vrsta *Geranium robertianum* L. koristi se u tradicionalnoj medicini kao adstrigent, antidijaroič, za liječenje očnih infekcija, bubrežnih i žučnih kamenaca te za poboljšanje muške plodnosti. U narodnoj medicini Bosne i Hercegovine, vrsta *G. macrorrhizum* upotrebljava se za oboljenja želuca. Neke vrste roda *Geranium* pokazuju značajnu antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost (Şöhretoğlu, Ekizoğlu, Özalp, Sakar, 2008).

### 1.2.1. Polifenoli

#### *Struktura i značajke*

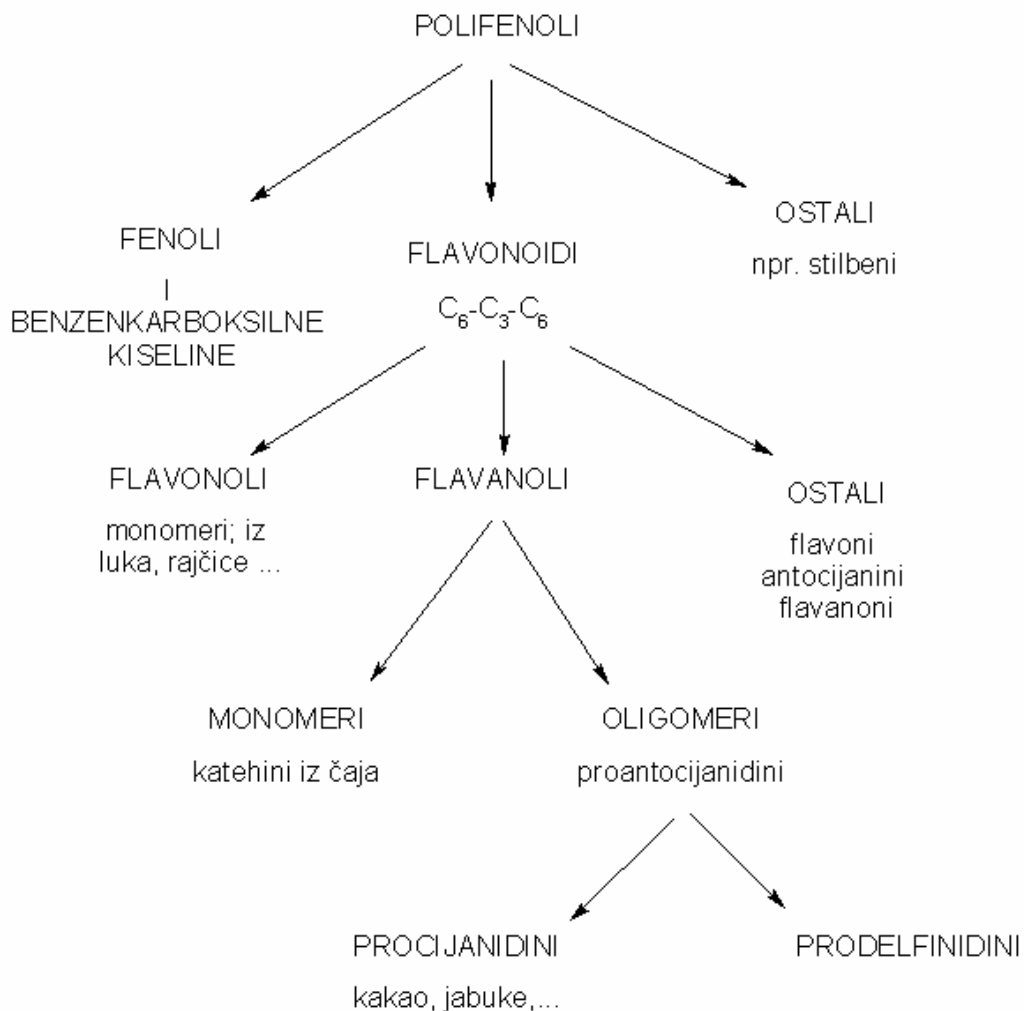
Polifenoli su jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari. U skupinu polifenola ubrajamo više od 8000 spojeva različite kemijske strukture. Osnovno je obilježje polifenola prisutnost jedne ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova (Bravo, 1998). Sekundarni su metaboliti biljnog metabolizma.

Polifenole sačinjavaju fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida, tj. flavonoidi bez vezanih molekula šećera, posjeduju strukturu tipa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Pritom su atomi ugljika raspoređeni tako da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem koji može ili ne mora formirati treći prsten. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu (Rastija i Medić-Šarić, 2009; Haslam i Cai, 1994).

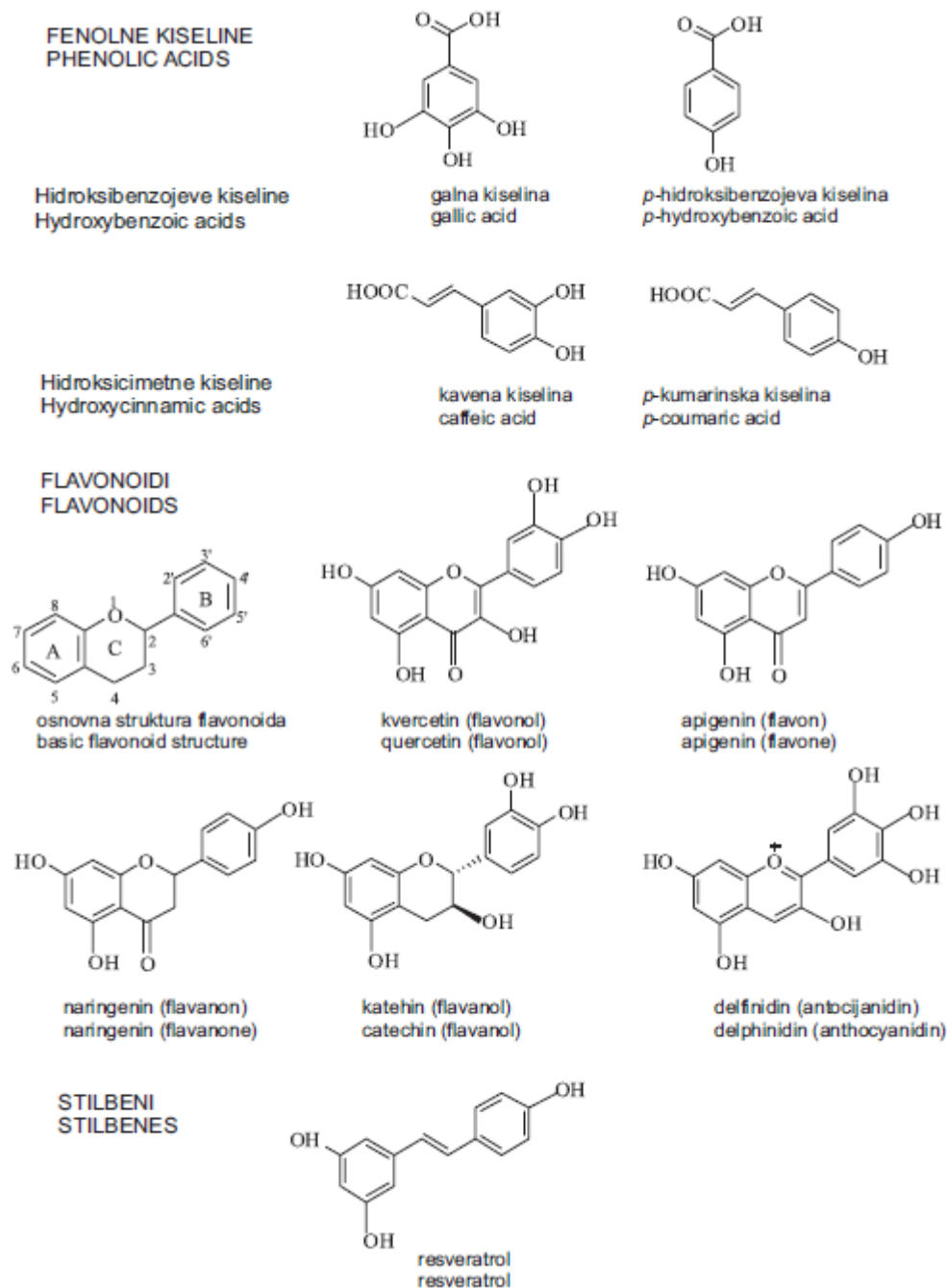
Polifenoli se sintetiziraju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je ključna tvar u nastanku aromatskih prirodnih spojeva. Univerzalni je prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) i višim biljkama, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).

U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida, a najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukuronsku te galakturonsku kiselinu. Polifenoli se mogu konjugirati i s drugim tvarima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi. Česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998).

Podjela polifenola temelji se na broju fenolnih prstenova koje sadrže i na strukturnim elementima koji te prstenove povezuju (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 4. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 5. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

### *Rasprostranjenost*

Polifenoli su česti sastojci hrane biljnog podrijetla i glavni antioksidansi u našoj prehrani. Dnevno se prehranom unese oko 1 g polifenola, što je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa. Ta je količina deset puta veća od prosječnog unosa vitamina C te sto puta veća od prosječnog unosa vitamina E i karotenoida. Glavni su izvori polifenola u prehrani voće i pića dobivena od biljaka, kao što su voćni sokovi, čaj, kava i crno vino. Tako, primjerice, grožđe, jabuke, kruške, trešnje i razno bobičasto voće sadrže 200-300 mg polifenola na 100 g svježeg voća, a čaša crnog vina, šalica čaja ili kave sadrže u prosjeku oko 100 mg polifenola (Scalbert i sur., 2005; Pandey i Rizvi, 2009).

Neki su polifenoli, poput kvercetina, prisutni u svim biljnim produktima, a neki su pak ograničeni na specifične namirnice (flavanoni u citrusnom voću, izoflavoni u soji, floridzin u jabukama). Namirnice većinom sadrže kompleksnu smjesu polifenola pa je zato za mnoge točan sastav polifenola slabo poznat. Na sastav polifenola utječu okolišni čimbenici, koji mogu biti pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina) ili agronomski (uzgoj u stakleniku ili na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci i dr.). Skladištenje također može utjecati na sadržaj polifenola ukoliko se radi o polifenolima koji su podložni oksidaciji. Reakcije oksidacije dovode do nastanka jedne ili više polimernih molekula, što dovodi do promjena u kakvoći namirnice i organoleptičkim svojstvima koje mogu biti poželjne (crni čaj) ili nepoželjne (smeđa boja narezanog voća). Priprema hrane također utječe na količinu polifenola prisutnih u namirnicama. Primjerice, guljenje voća i povrća uklonit će značajnu količinu polifenola, budući da su polifenoli često u znatno većim koncentracijama prisutni u vanjskim dijelovima voća i povrća nego u unutrašnjim. Znatan gubitak polifenola događa se i termičkom pripremom hrane (Manach i sur., 2004).

### *Biološki učinci*

Sve do sredine 1990-ih godina, najviše proučavani antioksidansi su bili antioksidativni vitamini, karotenoidi i minerali. Istraživanja na flavonoidima i ostalim polifenolima, njihovim antioksidativnim svojstvima i prevenciji bolesti počela su 1995. godine. Glavni čimbenik koji je odgađao provedbu istraživanja bila je značajna različitost i složenost kemijskih struktura (Scalbert i sur., 2005).

Pozitivna djelovanja polifenola navedena u znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično,

antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antiulkusno, analgetsko, antimalarično, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Petrik, 2008).

Trenutni dokazi jasno pokazuju doprinos polifenola prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka i osteoporoze te sugeriraju ulogu u prevenciji dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti. Tako je, primjerice, crno vino bogat izvor polifenolnih antioksidansa i smatra se uzrokom fenomena „francuski paradoks“ (označava zapanjujuće nisku pojavnost koronarnih bolesti srca u Francuskoj, unatoč konzumaciji hrane s puno masnoća, a povezana je s konzumacijom crnog vina koje sadrži visoke količine polifenolnih spojeva). Smatra se kako su upravo polifenolni antioksidansi prisutni u ekstradjevičanskom maslinovom ulju zaslužni za pozitivan učinak mediteranske prehrane na zdravlje (Castañer i sur., 2011; Scalbert i sur., 2005).

Osim navedenoga, polifenoli, kao fitokemikalije prisutne u gotovo svim namirnicama biljnog podrijetla, moduliraju aktivnost velikog broja enzima (telomeraza, ciklooksigenaza, lipooksigenaza i dr.) te staničnih receptora. Mogu stupati i u interakciju s različitim signalnim putevima i tako utjecati na transdukciju signala, a sve je više i dokaza koji govore u prilog utjecaju polifenola na regulaciju staničnog ciklusa te na funkciju trombocita (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004).

Puno dokaza o prevenciji bolesti primjenom polifenola potječe od *in vitro* istraživanja ili pokusa na životinjama, koji se često provode dozama mnogo većim od onih kojima su izloženi ljudi kroz prehranu. Očito je da polifenoli poboljšavaju status različitih biomarkera oksidativnog stresa. No, mnogo nesigurnosti i dalje postoji vezano uz značaj tih biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Također, postoje i studije s kontradiktornim rezultatima, koje govore o prooksidativnom učinku polifenola zbog kojega mogu posljedično inducirati apoptozu i inhibirati staničnu proliferaciju. Jedan od razloga kontradiktornih rezultata leži u tome što polifenolne tvari čini veliki broj različitih spojeva s različitim biološkim djelovanjem, stoga se učinak jednog polifenolnog spoja ne može generalizirati za ostale spojeve. Kako se istraživanja često provode na puno većim dozama od onih unesenih prehranom, nužno je poznavanje biorasploživosti i metabolizma različitih polifenolnih spojeva, kao i poznavanje rasprostranjenosti te sadržaja tih spojeva u hrani. Ta su znanja neophodna za razumijevanje odnosa između unosa polifenola hranom i rizika za razvoj različitih bolesti. Poznavanje biorasploživosti polifenolnih spojeva, koja značajno varira između različitih vrsta tih spojeva, iznimno je važna, budući da polifenoli najzastupljeniji u našoj prehrani ne moraju nužno imati i najbolju biorasploživost (Primorac, 2012; Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

## 1.2.2. Trjeslovine ili tanini

### *Struktura i značajke*

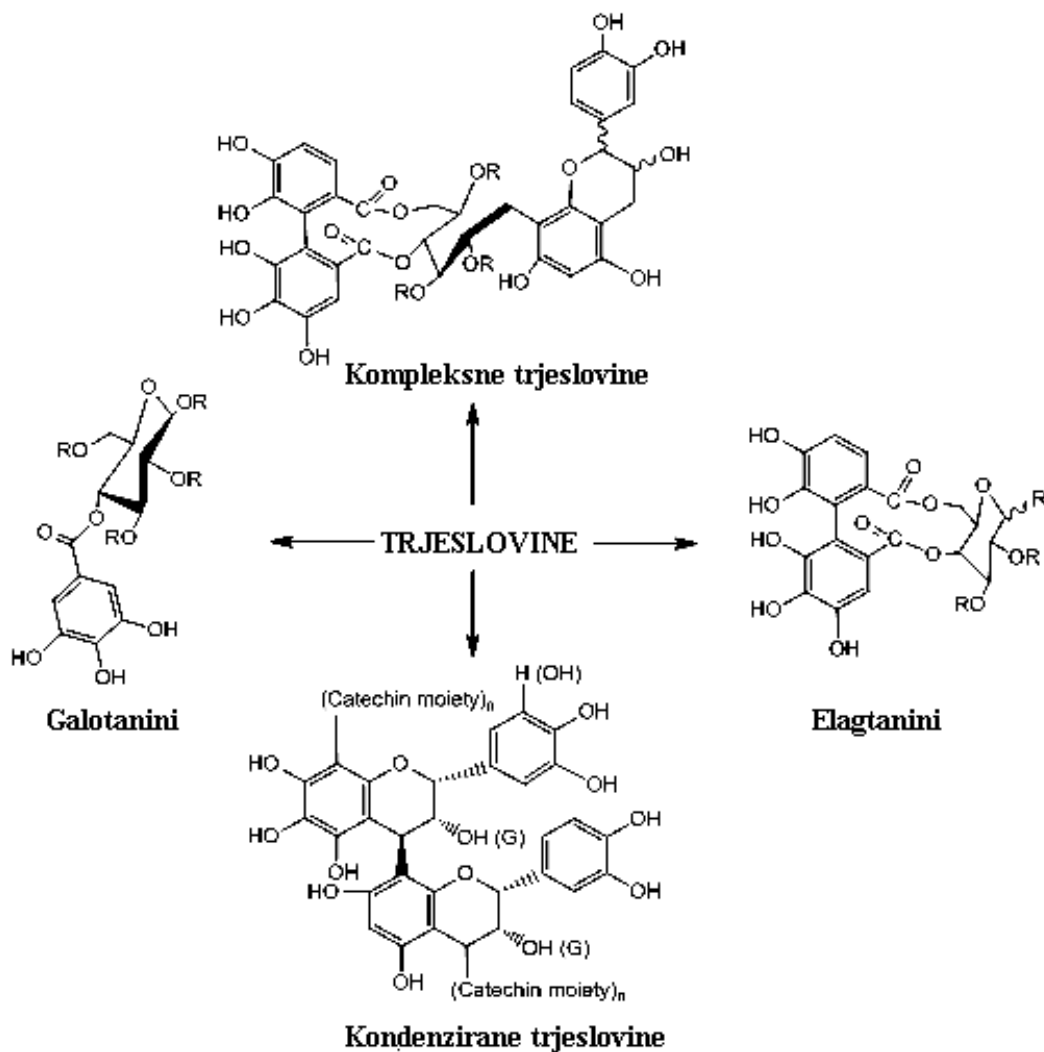
Trjeslovine su skupina fenolnih spojeva koji su značajan produkt sekundarnog metabolizma biljaka. Ime im potječe iz 1796. kada je opisana njihova sposobnost da reagiraju sa životinjskom kožom pri njenoj obradi („tanning“). Karakteristike koje razlikuju trjeslovine od ostalih vrsta biljnih polifenola načelno su: vezivanje na proteine, baze, pigmente, velike molekule i metalne ione, antioksidativno djelovanje i drugo. Te se značajke koriste za njihovo kvalitativno i kvantitativno razlikovanje pri analizi polifenola. Postoje različiti pristupi kategorizaciji trjeslovina. Jednu od podjela prikazuje Slika 6. Trjeslovine su prvotno podijeljene u dvije grupe, prema polifenolnim skupinama u svojim molekulama, na trjeslovine tipa pirogalola i trjeslovine tipa katehola (katehina). Razvojem kemije trjeslovina, došlo je do preimenovanja tih dviju grupa (Okuda i Ito, 2011; Kalodera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007) u sljedeće skupine:

- 1) trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini i elagtanini);
- 2) kondenzirane trjeslovine (katehinske trjeslovine):

Izolacija bioaktivnih stilbenoida i raznih oligomera rezveratrola, kao i florotanina iz smeđih algi, proširila je skupinu trjeslovina i povezanih polifenola i na navedene grupe spojeva. Zbog čestih nemogućnosti provjera strukture trjeslovina opisanih u istraživanjima, a što je neophodno za karakterizaciju bioloških i farmakoloških svojstava nekog spoja, došlo je do uvođenja dodatne kategorizacije trjeslovina i povezanih polifenola u dvije grupe: tip A (s konstantnom strukturom) i tip B (s promjenjivom strukturom) (Okuda i Ito, 2011).

Tablica 1. Količina trjeslovina u pojedinim biljnim drogama (Kalodera, 2010).

Droge s trjeslovinama	Hrvatski naziv	% trjeslovina
Gallae	šiške	50
Tormentillae rhizoma	podanak petoprste	15
Agrimoniae herba	zelen turice	10
Quercus cortex	hrastova kora	12
Hamamelidis folium	list hamamelisa	5,5
Myrtilli fructus	plod borovnice	1,5
Juglandis folium	orahov list	10



Slika 6. Podjela trjeslovina (Ascacio-Valdés i sur., 2011).

### Trjeslovine koje hidroliziraju

Kao što samo ime kaže, trjeslovine koje hidroliziraju su spojevi topljivi u vodi djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima kao što je tanaza. Njihova strukutra sadrži nekoliko molekula fenolnih kiselina, kao što su galna, heksahidrodifenolna ili elagna kiselina, povezanih esterskim vezama na središnju molekulu šećera, najčešće glukoze. Ovisno o fenolnim kiselinama nastalim nakon hidrolize, dalje se dijele na galotanine (sastavljene od galne kiseline) ili elagtanine (sadrže heksahidrodifenolnu kiselinu koja nakon intraesterifikacije daje elagnu kiselinu) (Vladimir-Knežević, 2008; Rangari, 2007).

### Kondenzirane trjeslovine

Kondenzirane trjeslovine, za razliku od prethodne grupe, neće hidrolizirati na jednostavnije molekule djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima. Ponekad se za njih koristi naziv proantocijanidini. Po strukturi su to polimerni flavonoidi koji mogu imati i preko 50 jedinica (a rijetko su oligomerne strukture). Flavonoidi su raznolika skupina metabolita temeljena na heterocikličnoj prstenastoj bazi nastaloj od fenilalanina u poliketidnoj biosintezi. U trjeslovinama najčešće nalazimo katehin i epikatehin koji su flavan-3-oli, dok su leukoantocijanidini flavan-3,4-diolne strukture. Ti su polifenoli često dalje povezani na ugljikohidrate ili proteine kako bi tvorili još složenije trjeslovine (Rangari, 2007). Iako se naziv kondenzirane trjeslovine i dalje koristi za opisivanje tih polifenola, kemijski pojam koji ih bolje označava, „proantocijanidini“, polako se usvaja. Proantocijanidini su spojevi koji daju antocijanidinske pigmente nakon oksidativnog cijepanja (ne hidrolize!) u vrućem alkoholu. Kada se na njih djeluje kiselinama ili enzimima, obično polimeriziraju, dajući netopljive crvene produkte poznate pod imenom flobafeni (npr. kod kininovca) (Hagerman, 2002).

### *Rasprostranjenost*

Trjeslovine su široko rasprostranjene u biljnom svijetu. Najpoznatije porodice od kojih sve vrste sadrže trjeslovine jesu: Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Burseraceae, Combretaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae (od dvosupnica) te Najadaceae i Typhaceae od jednosupnica (Mole, 1993). Vrste porodica Brassicaceae (syn. Cruciferae) i Papaveraceae ne sadrže trjeslovine (Rangari, 2007).

Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene u biljci, pri čemu ih najviše sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi, i konačno, plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine, Gallae ili sisarke (šiške). Radi se o patološkim izraslinama na listu azijskog hrasta i na listovima ruja koje su nastale razvojem ličinke ose (azijski hrast) ili jedne vrste biljnih uši (kineski ruj), a mogu sadržavati do 75% trjeslovina. Razvija se larva, a biljka zbog podražaja stvara trjeslovine. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, utvrđeno je da se trjeslovine javljaju u većoj količini u mladim dijelovima biljke (lisnim pupoljcima, mladim listovima i cvjetovima), što se objašnjava time da biljka gomila trjeslovine u onim dijelovima koji su joj najvrjedniji. Količina tanina u biljci varira ovisno o različitim okolišnim i sezonskim čimbenicima. Suša, visoka temperatura, velika izloženost svjetlu i slaba kvaliteta zemlje stvaraju uvjete koji pogoduju povećanom sadržaju trjeslovina u



biljci. Sezonska varijabilnost sadržaja ovisi o fazi rasta biljke pa je tako sinteza tanina najintenzivnija u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen njezin rast, pa su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalođera, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

### *Biološki učinci*

Fiziološko značenje trjeslovina prilično je nejasno. Smatralo se da njihov gorak i trpak okus štiti biljku od štetočina, što se kasnije pokazalo netočnim. Niti pretpostavka da su trjeslovine pričuvne tvari nije se pokazala ispravnom jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvnih tvari. No, sa sigurnošću se može ustvrditi da u nekih biljaka trjeslovine sudjeluju u izmjeni tvari stvaranjem redoks sustava. Naime, zahvaljujući brojnim hidroksilnim skupinama u strukturi, trjeslovine djeluju kao snažni antioksidansi, pri čemu one veće molekulske mase djeluju kao jači hvatači slobodnih radikala. Također je poznato da su trjeslovine kelatori metala i da talože proteine. Trjeslovine mogu same po sebi biti i djelatne tvari, a može ih se promatrati i kao pratiocice drugih aktivnih tvari, pri čemu utječu na terapijski učinak glavne aktivne komponente (Primorac, 2012; Hagerman, 2002).

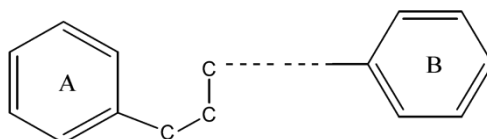
Glavna upotreba trjeslovina je povezana s njihovim adstrigenim učinkom. Djeluju protiv dijareje i antiseptički, štiteći izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Precipitirajući proteine, trjeslovine djeluju antimikrobno i antifungalno. Također imaju hemostatsko djelovanje, i mogu djelovati kao antidoti kod nekih slučajeva trovanja (teškim metalima, crnom kavom i većinom alkaloida). Interno se još mogu koristiti i kod želučanog i crijevnog katara te hiperaciditetnog gastritisa. U procesu cijeljenja rana, opekline, ozeblina i upala, trjeslovine pomažu stvaranjem zaštitnog sloja preko ozlijeđenog tkiva, omogućavajući da se ispod njega slobodno odvija cijeljenje. Istraživanja su pokazala da mnoge trjeslovine neutraliziraju slobodne radikale, a poznato je da su mnoge degenerativne bolesti (rak, multipla skleroza, ateroskleroza, proces starenja) povezane s visokim koncentracijama slobodnih radikala između stanica. Također, određeni tipovi trimernih proantocijanidina mogu štiti protiv bolesti urinarnog trakta. No, trjeslovine su raznoliki spojevi s velikom varijacijom strukture i koncentracije u biljnom svijetu. Zbog toga su biomedicinska istraživanja pozitivnih i negativnih učinaka na zdravlje pri povećanom unosu trjeslovina značajno ograničena nedostatkom metoda za brzu karakterizaciju i standardizaciju (de Jesus i sur., 2012; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

Biološki učinci trjeslovina ovise o njihovoj bioraspoloživosti. Danas se sa sigurnošću zna da se trjeslovine djelomično metaboliziraju te da se apsorbiraju na različitim mjestima duž gastrointestinalnog trakta, pri čemu je kolon glavno mjesto njihove apsorpcije. Stoga se smatra da svoj biološki učinak mogu provoditi na dva načina. Kompleksne trjeslovine, koje se ne apsorbiraju, ali mogu vezati različite tvari, pokazuju lokalni učinak u gastrointestinalnom traktu (antioksidativno, antimikrobno i antiviralno djelovanje), dok trjeslovine male molekulske mase koje se apsorbiraju, te njihovi metaboliti, nastali djelovanjem crijevne mikroflore, koji se također apsorbiraju, mogu iskazivati sistemski učinak i djelovati na različite organske sustave (Serrano i sur., 2009).

### 1.2.3. Flavonoidi

#### *Struktura i značajke*

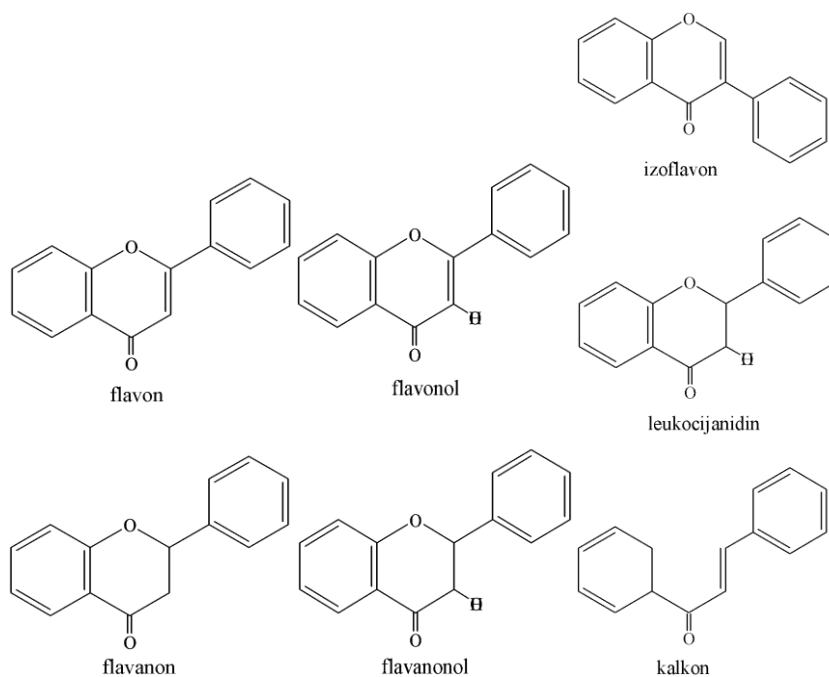
Flavonoidi su derivati 1,3-difenilpropana ( $C_6-C_3-C_6$ ). Kod većine flavonoida se tri ugljikova atoma povezuju s kisikom i tvore središnji šesteročlani heterociklički prsten. Ako su aromatski prstenovi međusobno odijeljeni jednim tročlanim mostom, onda su to pravi flavonoidi. Strukturne varijante s etilenskim mostom su izoflavonoidi, dok je kod neoflavonoida most jednočlan (Vladimir-Knežević, 2008).



Slika 7.  $C_6-C_3-C_6$  struktura flavonoida.

Raznolikost flavonoidnih spojeva uvjetovana je stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama. Flavonoidnim derivatima pripadaju: flavoni, flavonoli (3-hidroksiflavoni), flavanoni (2,3-dihidroflavoni), flavanonoli (3-hidroksi-2,3-dihidroflavoni), izoflavoni (5-fenilbenzo- $\gamma$ -pironi), antocijanidini (derivati 2-fenil-3,5,7-trihidrobenzopirilijeva hidroksida), leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli), katehini (flavan-3-oli), kalkoni (derivati benzalacetofenona) i auronii (derivati benzalkularan-3-ona) (Wagner, 1993; Maleš, 1990; Steinegger i Hänsel, 1988).

Flavonoidi se u prirodi pretežno javljaju u glikozidnom obliku, građeni iz dva dijela: aglikonske (nešećerne) i glikonske (šećerne) komponente. Aglikonski dio flavonoida je derivat 2-fenil-dihidrobenzopirana (flavana). Iako šećerni ostatak može biti vezan gotovo u bilo kojem položaju, uglavnom prevladavaju 3- i 7-heterozidi. Od monosaharida su najzastupljeniji D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, D-ksiloza i L-arabinoza, a od disaharida rutinoza (L-ramnozido-6-D-glukoza), soforoza (D-glukozido-2-D-glukoza) i sambubioza (D-ksilozido-2-D-glukoza) (Harborne, 1964).



Slika 8. Osnovne strukture flavonoida.

### *Rasprostranjenost*

U prirodi su najrasprostranjeniji flavoni i flavonoli, a zajedno s flavanonima, antocijanidima i izoflavonoidima čine više od 80% poznatih flavonoidnih spojeva. Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, od alga do kritosjemenjača. Sastavni su dio gotovo svih viših biljaka, a najviše ih ima u mladim listovima, cvjetnim pupoljcima i nezrelim plodovima. Hidrofilni flavonoidi nalaze se otopljeni u staničnom soku vakuola, dok se lipofilni flavonoidi (tetra-, penta- i heksametoksilirani) javljaju u idioplastima i ekskretornim stanicama (Vladimir, 1993).

Rutin je najpoznatiji i vrlo raširen flavonolski glikozid. Izoliran je iz rutvice (*Ruta graveolens* L., Rutaceae). Danas se najčešće dobiva (15-20% rutina) izolacijom iz cvjetnih

pupoljaka japanske sofore (*Sophora japonica* L., Fabaceae). Flavanoni su karakteristični za vrste roda *Citrus*, prvenstveno hesperitin i naringenin u obliku glikozida. Izoflavonoidi su zbog karakteristične i rijetke pregradnje molekule ograničeni na porodicu Fabaceae (Vladimir-Knežević, 2008).

### *Biološki učinci*

Postoje različite teorije o ulozi flavonoida u biljnom organizmu. Najprihvaćenija je teza da flavonoidi sudjeluju u metaboličkim redoks procesima. Neki autori ih smatraju zaštitom od ultraljubičastog zračenja, a smatra se da se sintezom flavonoida iz stanice uklanjaju štetni fenoli (Vladimir, 1993).

Dokazana su različita biološka djelovanja flavonoida: antiinflamatorno, antimikrobno, antiviralno, antifungalno, diuretičko, dijaforetičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardi tonično, antialergično, antiulkusno, analgetično, antimalarično, hipoglikemično i antioksidativno. Većina tih svojstava flavonoida zasniva se na njihovoj sposobnosti inhibicije i indukcije određenih enzima. Tako, primjerice, flavonoidi inhibiraju hijaluronidazu, aldoza-reduktazu, ksantin-oksidadazu, ciklooksigenazu, lipooksigenazu, fosfolipazu, histidin-dekarboksilazu, cAMP-fosfodiesterazu i dr. Primjeri enzima koje flavonoidi induciraju jesu arilhidrolaza i epoksid-hidrolaza. Studije na životinjama pokazale su također citotoksični i citostatični učinak flavonoida te njihovo profilaktičko djelovanje (Kim i sur., 1998; Miller, 1996; Saija i sur., 1995).

Rutin, najpoznatiji flavonolski glikozid, koristi se kao sredstvo za jačanje kapilara. Listovi i cvjetovi crvenog gloga (*Crataegus oxyacantha* L., Roseaceae) i bijelog gloga (*C. monogyna* Jacq.) sadrže flavonolske glikozide (1-2%). Među flavonolima prevladava hiperozid. Viteksin i njegovi derivati su važni predstavnici flavonskih C-glikozida. Koriste se u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih oboljenja. Oni su tonici za oslabljeno srce, pogotovo kod starijih osoba i u slučajevima kada nije preporučljivo koristiti glikozide digitalisa. Snizuju krvni tlak i poboljšavaju cirkulaciju krvi. Listovi ginka (*Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae) sadrže mono-, di- i tri-glikozide kemferola, kvercetina i izoramnetina, te neglikozidne 3' → 8 biflavonoide (amentoflavon). Primjenjuju se u prevenciji i liječenju cerebralne insuficijencije. Plodovi obične sikavice (*Silybum marianum* L. Gaertn., syn. *Cardus marianus* L., Asteraceae) sadrže 1,5-3% silimarina – smjese flavonolignana silibina, silikristina i silidianina koji imaju hepatoprotektivni i antihepatotoksični učinak. Cvijet brđanke (*Arnica*

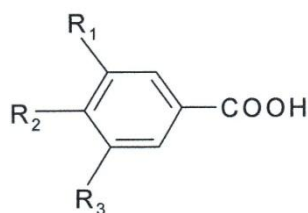
*montana* L., Asteraceae) sadrži 0,4-0,6% flavonoida koji, pripremljeni u obliku tinkture ili masti, pri eksternoj primjeni pomažu kod upala i bržeg zacjeljivanja rana. Izoflavonoidi imaju različitu primjenu. Tako medikarpin iz lucerne (*Medicago sativa* L., Fabaceae) i pisatin iz graška (*Pisum sativum* L., Fabaceae) imaju antifungalna svojstva, a neki jednostavni izoflavonoidi, kao što su daidzein i kumestrol iz lucerne i djeteline (*Trifolium* spp., Fabaceae) ili izoflavonoidi u soji (*Glycine max* L., Fabaceae) su fitoestrogeni, dok rotenon iz vrsta rodova *Derris* i *Lonchocarpus* djeluje kao insekticid. Udio antocijana u svježem plodu borovnice (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) je oko 0,5% i najčešće su namijenjeni zaštiti kapilarnog sustava (Vladimir-Knežević, 2008).

#### 1.2.4. Fenolne kiseline

##### *Struktura i značajke*

Nakon flavonoida, drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih polifenola čine fenolne kiseline. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Na temelju strukture, razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) i derivati cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (Robbins i sur., 2003).

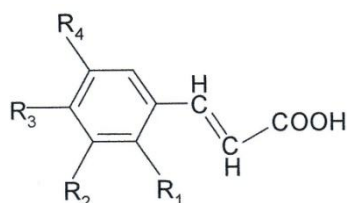
Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline mogu nastati izravno iz međuprodukata puta šikiminske kiseline. No, u biljkama češće nastaju degradacijom derivata cimetine kiseline (Russell i sur., 1999).



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

Najzastupljeniji derivati hidroksicimetine kiseline su kavena, kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina. Predstavljaju važne građevne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva te

često dolaze u obliku specifičnih estera, kao npr. klorogenska kiselina i ružmarinska kiselina (Ralph i sur., 1994; Russell i sur., 1999). Manji se broj fenolnih kiselina javlja u slobodnom obliku, dok su većinom u biljkama prisutne konjugirane (ponajviše esterifikacijom) sa strukturnim biljnim dijelovima (celulozom, proteinima i ligninom) ili s različitim molekulama, uključujući jednostavne šećere i organske kiseline (Vuković, 2013).



Slika 10. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990).

### *Rasprostranjenost*

Hidroksibenzojeve kiseline nalazimo u manjim količinama u jestivim biljkama. Iznimka su neka crvena voća, crna rotkvica i luk koji mogu sadržavati do nekoliko desetaka miligrama hidroksibenzojevih kiselina po kilogramu svježe namirnice. Čaj je važan izvor galne kiseline: listovi čajevca mogu sadržavati do 4,5 g galne kiseline po kilogramu svježeg lista čajevca. Nadalje, hidroksibenzojeve kiseline su komponente složenih struktura, kao što su trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini u mangu i elagtanini u crvenom voću: jagodama, malinama i kupinama).

Hidroksicimetne kiseline često nalazimo u raznim biljkama. Najzastupljeniji derivati su kumarinska, kavena, ferulična i sinapinska kiselina. Te kiseline rijetko nalazimo u slobodnom obliku, osim kod prerađene hrane koja je podvrgnuta smrzavanju, sterilizaciji ili fermentaciji. Vezani oblici glikozilirani su derivati ili esteri kininske ili šikiminske kiseline. Kavena i kininska kiselina zajedno tvore klorogensku kiselinu koja se nalazi u mnogim vrstama voća te u visokim koncentracijama u kavi. Jedna šalica kave može sadržavati 70-350 mg klorogenske kiseline. Borovnice, kivi, šljive, trešnje i jabuke imaju od svih vrsta voća najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina te sadrže 0,5-2 g hidroksicimetnih kiselina po kilogramu svježeg voća. Kavena kiselina, u slobodnom obliku i u obliku estera, najzastupljenija je fenolna kiselina te čini između 75% i 100% ukupnog sadržaja fenolnih kiselina kod većine voća. Hidroksicimetne kiseline se nalaze u svim dijelovima voća, ali u najvećim su koncentracijama prisutne u vanjskom dijelu zrelog voća. Ferulična kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina

u žitaricama. Njezin se sadržaj u žitaricama kreće između 0,8 g i 2 g po kilogramu suhe žitarice. U vanjskom dijelu zrna žitarice nalazi se čak 98% ukupne ferulične kiseline u zrnu (Manach i sur., 2004).

### *Biološki učinci*

Fenolne kiseline koje unosimo prehranom fiziološki su antioksidansi koji hvataju slobodne kisikove i dušikove radikale. *In vitro* studije koristile su različite sustave kako bi se oksidirao LDL te se mjerila prevencija oksidacije nakon uključivanja u sustav specifične fenolne komponente. Najviše su proučavane hidroksicimetne kiseline koje su, u modelu u kojem su se koristili  $\text{Cu}^{2+}$  ioni, pokazale snažno antioksidativno djelovanje. U studijama se pokazalo da kavena kiselina djeluje sinergistički s alfa tokoferolom, pojačavajući antioksidativni kapacitet LDL-a, reciklirajući alfa tokoferol od alfa tokoferoksil-radikala (Laranjinha i sur., 1995). U drugoj se studiji pokazalo da kavena i p-kumarinska kiselina djeluju sinergistički s askorbinskom kiselinom (Vieira i sur., 1998).

Kavena kiselina pokazuje veliku antioksidacijsku aktivnost, *in vitro* i *in vivo* hepatoprotektivno, protuvirusno, protuupalno djelovanje, a u kombinaciji s ružmarinskom kiselinom i antimikrobno djelovanje; također, kavena kiselina i njezin derivat, feniletil ester kavene kiseline, inhibiraju karcinogenezu (Ikeda i sur., 2011; Sato i sur., 2011; Chao i sur., 2009; Gülcin, 2006; Widmer i sur., 2006; Janbaz i sur., 2004; van Gadow i sur., 1997).

Objavljena su brojna istraživanja koja opisuju širok raspon bioloških aktivnosti ružmarinske kiseline. Tako, primjerice, ružmarinska kiselina pokazuje snažno antioksidativno, antimutageno, antidepresivno, hepatoprotektivno, protuvirusno, antibakterijsko i antimikotično djelovanje (Furtado i sur., 2008; Tepe, 2008; Swarup i sur., 2007; Vattam i sur., 2006; Widmer i sur., 2006; Qiao i sur., 2005; Bais i sur., 2002; Osakabe i sur., 2002; Takeda i sur., 2002). Nekoliko je istraživanja potvrdilo i protuupalni učinak ružmarinske kiseline, čime je omogućena upotreba te tvari za liječenje različitih upalnih oboljenja. Tako ružmarinska kiselina, zbog svoje antioksidacijske aktivnosti i zbog inhibicije upalnih odgovora, predstavlja vrlo učinkovitu terapiju za alergijski rinokonjuktivitis (Osakabe i sur., 2004). Osim toga, pokazuje i antiangiogeni potencijal koji također može biti povezan s njezinom antioksidacijskom aktivnošću (Huang i sur., 2006).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovoga diplomskog rada bila je fitokemijska karakterizacija polifenolnih tvari vrsta roda Geraniaceae, *Geranium macrorrhizum* L. (stjenjarska iglica) i endemične vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f. (dalmatinska iglica).

Kvalitativna analiza polifenola (trjeslovine, flavonoidi i fenolne kiseline) provedena je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga.

Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina, te ukupnih flavonoida i fenolnih kiselina određen je spektrofotometrijskim metodama.

Svrha fitokemijske karakterizacije provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima vrsta *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum*, kao i općenito, poznavanju roda *Geranium*. Radi se o preliminarnim studijama čiji bi rezultati mogli poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala biljnih pripravaka stjenjarske i dalmatinske iglice.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Biljni materijal**

Biljni materijal je prikupljen tijekom lipnja 2011. godine, i to na Velebitu (stjenjarska iglica, *Geranium macrorrhizum* L.) te za vrstu *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f. (dalmatinska iglica) na lokalitetu Sv. Ilija, poluotok Pelješac. Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 1994; Šilić, 1990; Tutin i sur., 1972). Analizirani su pulverizirani nadzemni dijelovi (stabljike, listovi i cvjetovi) stjenjarske i dalmatinske iglice.

## 3.2. Aparatura i kemikalije

### Aparati i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka); kiveta 1 cm;
- PC-HP 845x UV-Visible System (Hewlett-Packard, Njemačka);
- pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, epruvete, kapalice, filter papir;
- odmjerne tikvice; Erlenmeyerove tikvice;
- stalci i lijevci za odjeljivanje;
- povratna hladila.

### Kemikalije:

- aceton (Claro-Prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska);
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- etanol (Badel, Zagreb, Hrvatska);
- etil acetat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- Folin-Ciocalteuov fenolni reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka);
- formaldehid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- heksametilentetramin (Zorka, Šabac, Srbija);
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- kazein (Calbiochem, Darmstadt, Njemačka);
- klorovodična kiselina, konc. (Carlo Erba, Rodano, Italija);
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev acetat trihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev citrat (Gradska ljekarna Zagreb, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države);
- natrijev karbonat dekahidrat (Poch, Gliwice, Poljska);
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev nitrit (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- octena kiselina, led. (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- olovov acetat (Kiedel-de Haën ag. Seelze – Hanover, Njemačka);
- želatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države);
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- željezov(III) klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države).

### 3.3. Metode i postupci istraživanja

#### 3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola

*Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga*

##### Priprava ekstrakta

Po 0,1 g cvjetova, listova i stabljika usitnjenih u prah pojedinačno se ekstrahira s 3 mL metanola 10 minuta na vodenoj kupelji (60 °C)

##### Opće reakcije

Reakcije promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge.

#### 3.3.2. Kvalitativna analiza trjeslovina

*Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga*

##### Priprava ekstrakta

Po 0,2 g listova, stabljika i cvjetova usitnjenih u prah ekstrahira se 10 minuta s 20 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakt se profiltrira.

##### Opće reakcije

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.
5. U 1 mL filtrata doda se 2 mL 1%-tne otopine vanilina u konc. klorovodičnoj kiselini.

### 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.

### 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 ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

### **3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina**

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrsta *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (1976).

Fino usitnjeni nadzemni biljni dijelovi (0,25 g) ekstrahiraju se s 80 mL 30%-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta. Nakon hlađenja, iscrpina je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjena do oznake 30%-tnim metanolom. 2,0 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100,0 mL). Puferska otopina održava stalnu pH-vrijednost medija (pH = 5), koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10,0 mL *otopine 1* mućkano je s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta. Potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavljao *otopinu 2*.

Po 1,0 mL *otopine 1* i *otopine 2* pomiješano je odvojeno u odmjernim tikvicama od 10 mL s po 0,5 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i nadopunjeno do oznake s 33%-tnom otopinom natrijeva karbonata dekahidrata (Folin-Ciocalteuov fenolni reagens sadrži natrijev volframat, natrijev molibdat, destiliranu vodu, 85%-tnu fosfatnu kiselinu, 36%-tnu klorovodičnu kiselinu, litijev sulfat i brom). Apsorbancije dobivenih plavih otopina izmjerene su na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepi pokus. Vrijednost koju daje *otopina 1* odgovara količini

ukupnih polifenola, dok razlika vrijednosti dobivenih za *otopinu 1* i *otopinu 2* predstavlja količinu trjeslovina vezanih na kazein.

Za izračunavanje koncentracije trjeslovina izrađen je baždarni pravac. U tu je svrhu 10 mg tanina (*Acidum tannicum*) osušeno na 80 °C i otopljeno u 100,0 mL destilirane vode (osnovna otopina standarda). Radni standard pripremljen je miješanjem 5,0 mL osnovne otopine standarda i 5,0 mL puferske otopine. Koncentracijski niz, dobiven razrjeđivanjem volumena od 0,2 do 1,2 mL radnog standarda do 10,0 mL puferskom otopinom (što odgovara koncentraciji trjeslovina od 0,001 do 0,006 mg/mL), daje linearni porast apsorbancije. Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* i *2* očitaju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog dijagrama i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%).

Odnosno, za izražavanje sadržaja u gramima polifenola na 100 g droge (%), vrijedi izraz:

$$\% \text{ polifenola} = \frac{A}{0,025} = 40A$$

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Razlika sadržaja (%) ukupnih polifenola, koji je dobiven mjerenjem *otopine 1*, i sadržaja određenog za *otopinu 2*, predstavlja sadržaj (%) trjeslovina koje su istaložene kazeinom.

### 3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrsta *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (1960).

Fino usitnjeni nadzemni 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 je propušten kroz vatu, a ostatci droge na vati ponovo su ekstrahirani s 20 mL acetona, grijanjem do vrenja 10 minuta. Ta je otopina također propuštena kroz vatu, a prethodno opisana ekstrakcija acetonom ponovljena je dva puta. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100,0 mL. Potom je 20,0 mL hidrolizata pomiješano s 20 mL vode te ekstrahirano najprije s 15 mL, a zatim tri puta s po 10 mL etil acetata. Sjedinjene etil acetatne faze isprane su dva puta s po 40 mL vode, propuštene kroz vatu i razrijeđene etil acetatom do 50,0 mL. Po 10,0 mL te otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25 mL. U svaku je tikvicu dodano 0,5 mL 0,5%-tne vodene

otopine natrijeva citrata. U jednu tikvicu dodano je još 2 mL otopine aluminijeva klorida (2 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno je u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline). Potom su obje tikvice dopunjene do 25,0 mL 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta, izmjerene su apsorbancije otopina s aluminijevim kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus predstavlja prethodno pripremljena otopina bez aluminijeva klorida. Maseni udio flavonoida izračuna se kao kvercetin, prema izrazu:

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

(A = apsorbancija; b = masa droge izražena u g).

### 3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina

Količina fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrsta *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum* određena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium iz Europske farmakopeje (Ph. Eur., 2007).

*Ekstrakt.* 0,200 g droge u prašku ekstrahira se s 80 mL 50%-tnog etanola u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Nakon hlađenja, ekstrakt se profiltrira u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se potom nadopuni do oznake 50%-tnim etanolom.

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

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

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

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

A = apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm; m = masa droge (g)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola i trjeslovina

#### Rezultat dokazivanja polifenola

##### 1. Reakcija promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge

Dodatkom 0,1 M natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt ispitivanog biljnog uzorka, u epruveti je nastalo narančastosmeđe obojenje. Reakcija promjene boje bila je vrlo intenzivna za obje ispitivane vrste (*Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum*).

#### Rezultati dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

##### *Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina*

##### 1. Reakcija taloženja dodatkom željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge

Dodatkom 5%-tne otopine željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge nastalo je intenzivno zelenoplavo zamućenje za *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum*.

##### 2. Reakcija promjene boje dodatkom željezova(III) amonijeva sulfata u vodeni ekstrakt droge

Reakcijom trjeslovina sa željezovim(III) amonijevim sulfatom nastaje vrlo intenzivno zelenoplavo obojenje za ispitivane vrste, *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum* (+++).

##### 3. Reakcija promjene boje dodatkom olovova acetata u vodeni ekstrakt droge

Trjeslovine stvaraju s olovovim acetatom pahuljasto zamućenje narančastosmeđe boje. Dobiveno zamućenje je vrlo jakog intenziteta (+++) za *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum*.

##### 4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

U reakciji trjeslovina s 1%-tnom želatinom nastalo je slabo blijedožuto zamućenje kod ekstrakta droge vrste *Geranium macrorrhizum*, a kod *G. dalmaticum* reakcija je bila umjerenog intenziteta.

## 5. Reakcija promjene boje dodatkom otopine vanilina u vodeni ekstrakt droge

Dodatkom 1%-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt droge nastalo je umjereno narančastocrveno obojenje kod obje ispitane biljne vrste.

### *Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina*

Nakon dodatka formaldehida i 10%-tne klorovodične kiseline u vodeni ekstrakt droge, sadržaj se ugrije do vrenja te se potom ohladi i profiltrira. Filtar papir se ispere s 1 ml tople vode, a kondenzirane trjeslovine dokazuju se talogom na filter papiru koji je netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

U reakciji s ekstraktom stjenjarske iglice, na filter papiru je ostao smeđi talog, dok je za dalmatinsku iglicu dobiven žuto-narančasti talog, također netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida, kao dokaz prisutnosti kondenziranih trjeslovina.

### *Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju*

Filtratu iz reakcije za dokazivanje kondenziranih trjeslovina doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata bez protresivanja, a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U ekstraktima obje ispitane biljne vrste dokazana je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju jer je nastao jako intenzivan ljubičast prsten na mjestu prikladnog pH.

## **4.2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina**

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u nadzemnim dijelovima vrsta *Geranium macrorrhizum* (stjenjarska iglica) i *G. dalmaticum* (dalmatinska iglica) provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru. Metoda se temelji na reakciji polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR), kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom. Nakon dodatka FCR, izmjerene su apsorbancije dobivenih plavih otopina na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina određena je pomoću prethodno dobivenog baždarnog pravca, na osnovi izmjerenih apsorbancija analiziranih poredbenih otopina taninske kiseline propisanih koncentracija.



Za izmjerene vrijednosti apsorbancija otopine 1 i otopine 2 očitaju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog pravca i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%), pri čemu vrijedi izraz:

$$\% \text{ polifenola} = \frac{A}{0,025} = 40A$$

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Napravljena je jedna ekstrakcija droge te su uzeta tri uzorka za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina. Za svaki od uzoraka, tri je puta izvršeno mjerenje apsorbancije.

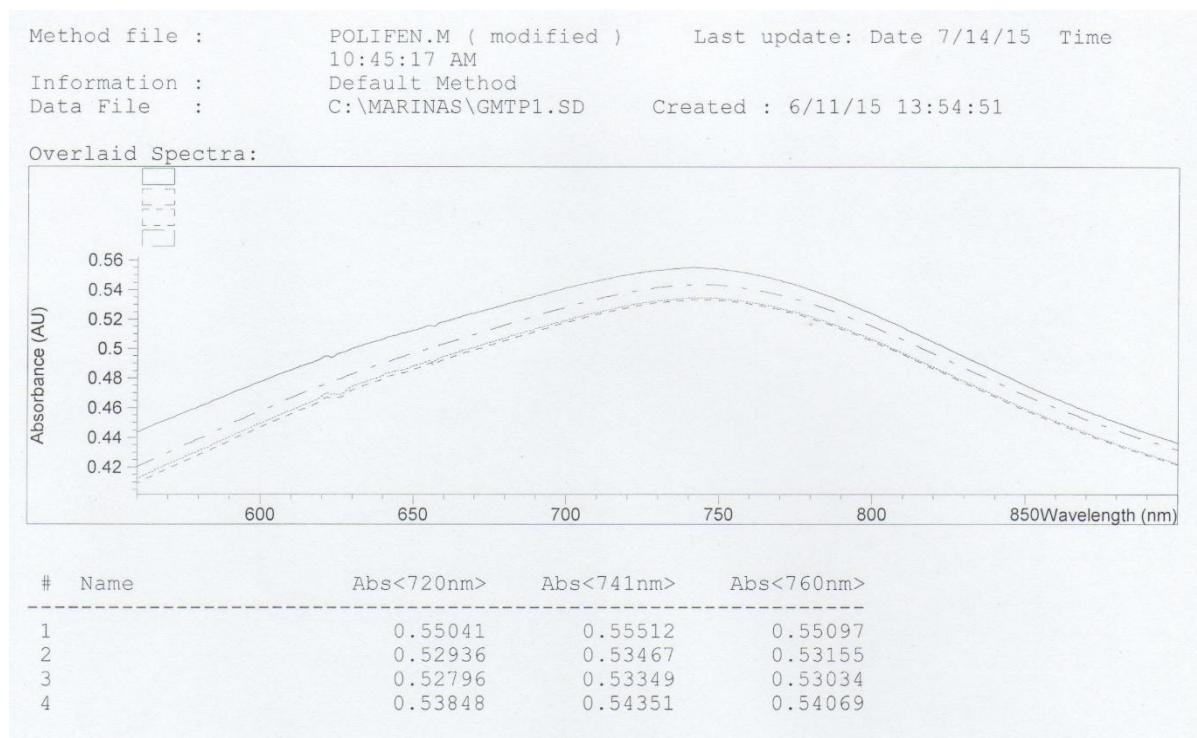
- Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina za vrstu *Geranium macrorrhizum* L. prikazani su u Tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium macrorrhizum* L.

<i>Geranium macrorrhizum</i>		ukupni polifenoli		sadržaj ukupnih polifenola	
		A <sub>720 nm</sub> otopine 1	srednja vrijednost A <sub>720nm</sub> otopine1±SD	%	srednja vrijednost %±SD
ekstrakt	uzorak 1	0,550	0,536±0,010	22,00	21,45±0,41
		0,529		21,16	
		0,528		21,12	
		0,538		21,52	
	uzorak 2	0,555	0,542±0,010	22,20	21,67±0,40
		0,535		21,40	
		0,533		21,32	
		0,544		21,76	
	uzorak 3	0,551	0,539±0,010	22,04	21,54±0,38
		0,532		21,28	
		0,530		21,20	
		0,541		21,64	

Tablica 3. Sadržaj trjeslovina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium macrorrhizum* L.

<i>Geranium macrorrhizum</i>		polifenoli nevezani na kazein		trjeslovine vezane na kazein		sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		A <sub>720 nm</sub> otopine 2	srednja vrijednost A <sub>720nm</sub> otopine2±SD	A1-A2	srednja vrijednost (A1-A2)±SD	%	srednja vrijednost %±SD
ekstrakt	uzorak 1	0,141	0,142±0,001	0,409	0,394±0,013	16,36	15,76±0,52
		0,141		0,388		15,52	
		0,143		0,385		15,40	
	uzorak 2	0,145	0,145±0,001	0,410	0,396±0,012	16,40	15,84±0,49
		0,144		0,391		15,64	
		0,146		0,387		15,48	
	uzorak 3	0,144	0,145±0,001	0,407	0,393±0,012	16,28	15,72±0,49
		0,144		0,388		15,52	
		0,146		0,384		15,36	



Slika 11. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium macrorrhizum* L.

Dakle, sadržaj ukupnih polifenola vrste *Geranium macrorrhizum* iznosio je prosječno  $21,55 \pm 0,40\%$ , dok je prosječni udio trjeslovina bio  $15,77 \pm 0,50\%$ .

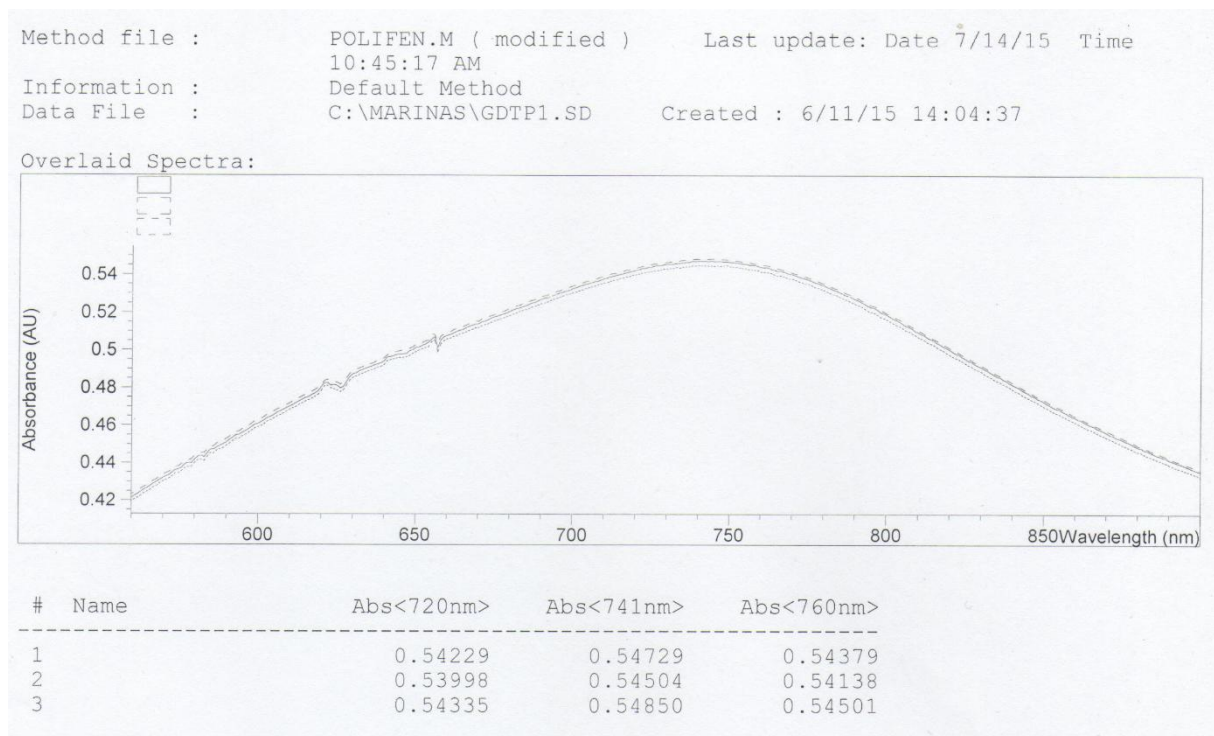
- Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina za vrstu *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f. prikazani su u Tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f.

<i>Geranium dalmaticum</i>		ukupni polifenoli		sadržaj ukupnih polifenola	
		A <sub>720 nm</sub> otopine 1	srednja vrijednost A <sub>720nm</sub> otopine1±SD	A <sub>720 nm</sub> otopine 1	srednja vrijednost A <sub>720nm</sub> otopine1±SD
ekstrakt	uzorak 1	0,542	0,542±0,002	21,68	21,67±0,06
		0,540		21,60	
		0,543		21,72	
	uzorak 2	0,547	0,547±0,002	21,88	21,88±0,08
		0,545		21,80	
		0,549		21,96	
	uzorak 3	0,544	0,543±0,002	21,76	21,73±0,08
		0,541		21,64	
		0,545		21,80	

Tablica 5. Sadržaj trjeslovina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f.

<i>Geranium dalmaticum</i>		polifenoli nevezani na kazein		trjeslovine vezane na kazein		sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		A <sub>720 nm</sub> otopine 2	srednja vrijednost A <sub>720nm</sub> otopine2±SD	A1-A2	A <sub>720 nm</sub> otopine 2	srednja vrijednost A <sub>720nm</sub> otopine2±SD	A1-A2
ekstrakt	uzorak 1	0,153	0,152±0,001	0,389	0,390±0,001	15,56	15,59±0,05
		0,151		0,389		15,56	
		0,152		0,391		15,64	
	uzorak 2	0,157	0,156±0,002	0,390	0,391±0,001	15,60	15,65±0,06
		0,154		0,391		15,64	
		0,156		0,393		15,72	
	uzorak 3	0,157	0,156±0,002	0,387	0,388±0,001	15,48	15,51±0,05
		0,154		0,387		15,48	
		0,156		0,389		15,56	



Slika 12. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f.

Zaključno se može reći da je prosječni sadržaj ukupnih polifenola vrste *Geranium dalmaticum* iznosio  $21,76 \pm 0,07\%$ , a sadržaj trjeslovina  $15,58 \pm 0,05\%$ .

### 4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrsta *Geranium macrorrhizum* i *Geranium dalmaticum* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru. Metoda se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s  $Al^{3+}$ . Tvorbi kompleksa prethodi kisela hidroliza flavonoidnih heterozida kako bi se omogućilo oslobađanje aglikona.

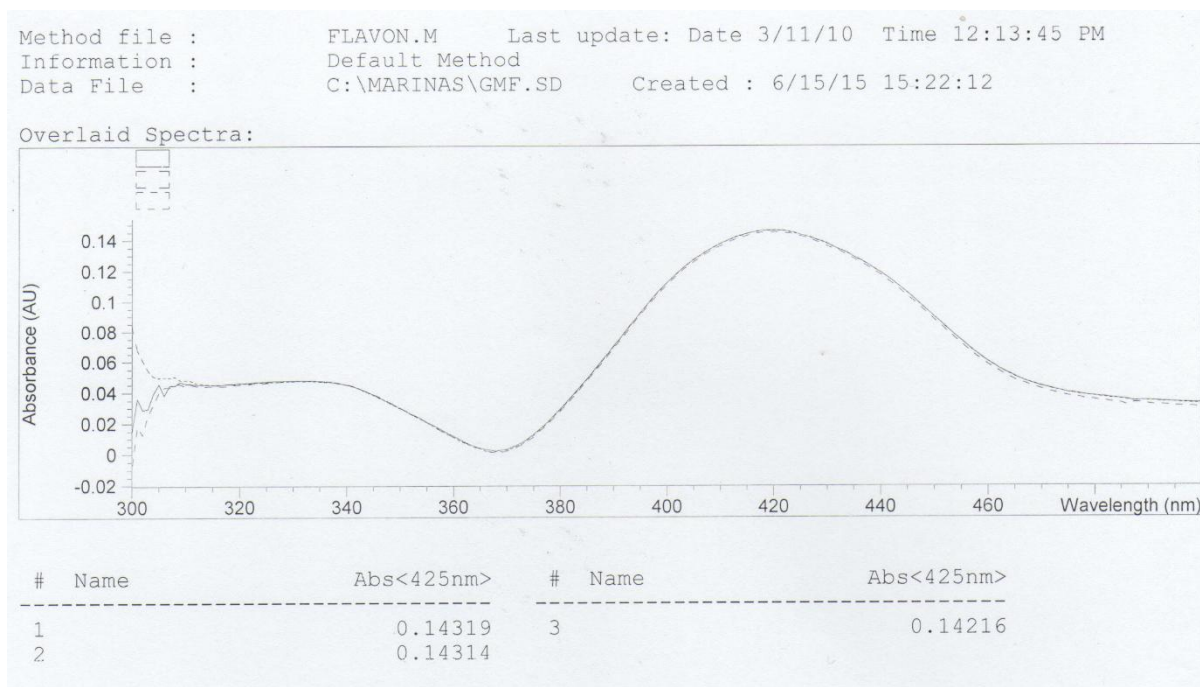
Izmjerene su apsorbancije nastalih kompleksa na valnoj duljini od 425 nm te je izračunat udio flavonoida prema formuli:  $\% = A \times 0,772 / \text{masa droge (g)}$ , izražen kao kvercetin. Slijepe su uzorke predstavljale prethodno pripremljene otopine bez aluminijeva klorida.

Pripremljen je jedan ekstrakt iz kojega je pripremljen uzorak za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Za vrstu *Geranium macrorrhizum* tri je puta mjerena apsorbancija, a za uzorak *Geranium dalmaticum* četiri puta.

- Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium macrorrhizum* L. prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Sadržaj flavonoida u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Geranium macrorrhizum* L.

<i>Geranium macrorrhizum</i>	Masa uzorka (g)		A <sub>425 nm</sub>	Srednja vrijednost A <sub>425 nm</sub> ± SD	% flavonoida	Srednja vrijednost % flavonoida ±SD
ekstrakt	0,2000	uzorak 1	0,143	0,143±0,001	0,55	0,55±0,00
			0,143		0,55	
			0,142		0,55	

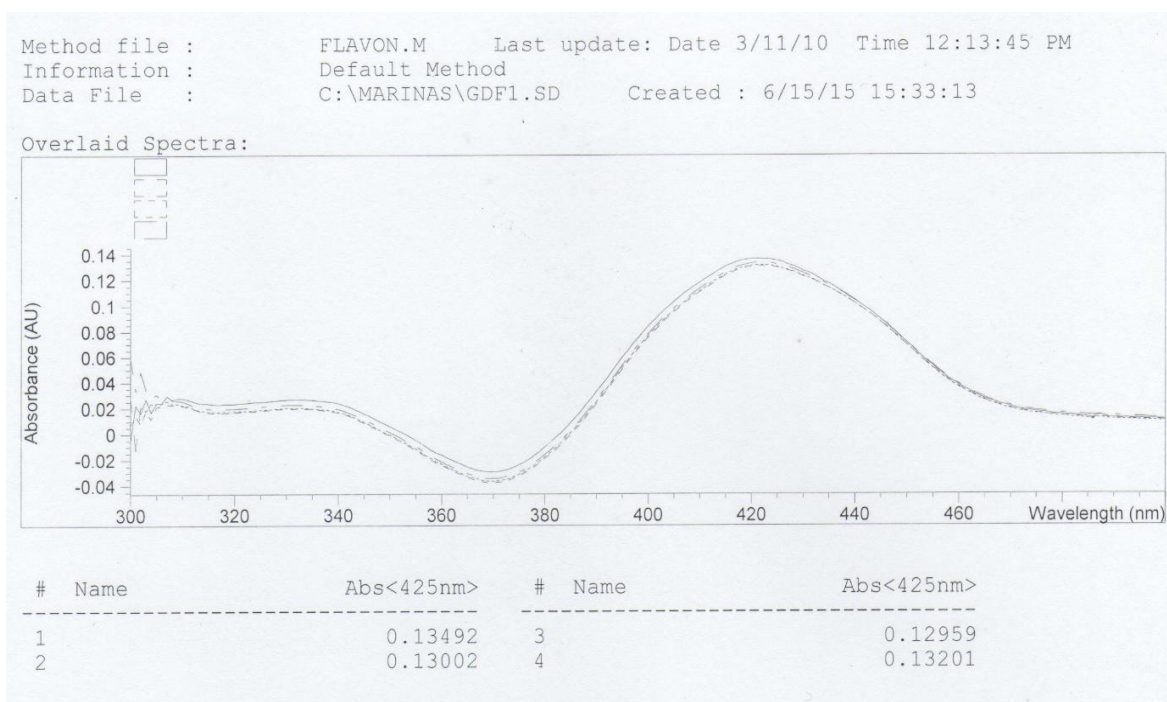


Slika 13. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium macrorrhizum* L.

- Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f. prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Sadržaj flavonoida u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f.

<i>Geranium dalmaticum</i>	Masa uzorka (g)		A <sub>425 nm</sub>	Srednja vrijednost A <sub>425 nm</sub> ±SD	% flavonoida	Srednja vrijednost % flavonoida ± SD
ekstrakt	0,2005	uzorak 1	0,135	0,132±0,002	0,52	0,51±0,01
			0,130		0,50	
			0,130		0,50	
			0,132		0,51	



Slika 14. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f.

Dakle, prosječan sadržaj flavonoida vrste *Geranium macrorrhizum* iznosio je 0,55±0,00%, a vrste *G. dalmaticum* 0,51±0,01.

#### 4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrsta *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum* provedena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium iz Europske farmakopeje (EDQM, 2007). Određivanje se temelji na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata koja s nitrit-molibdat reagensom daje žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine, žuta boja prelazi u narančastocrvenu. Apsorbancija se mjeri na 505 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, izražen kao ružmarinska kiselina, izračuna pomoću specifične apsorbancije koja za ružmarinsku kiselinu iznosi 400 (Vladimir-Knežević, 2008).

Jednom je napravljena ekstrakcija nadzemnih biljnih dijelova ispitivanih biljnih vrsta te je uzet jedan uzorak za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina za svaku biljnu vrstu. Apsorbancija je mjerena tri puta za uzorak stjenjarske i dalmatinske iglice.

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

A = apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm; m = masa droge (g)

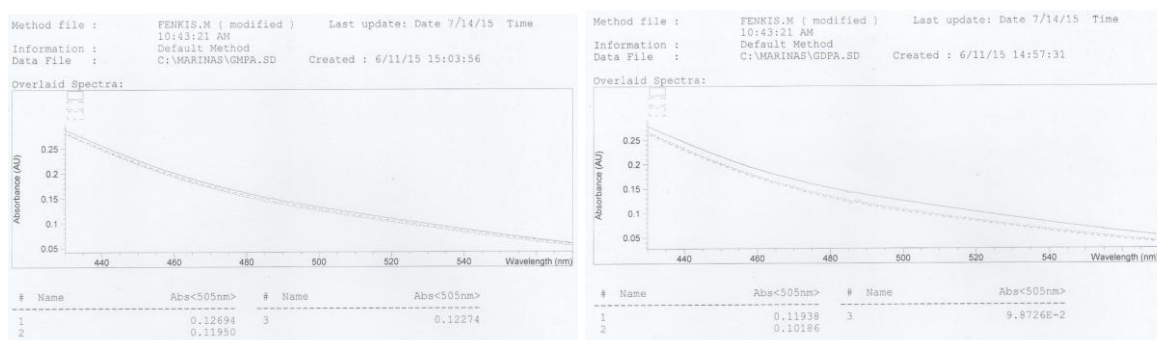
- Rezultate spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina vrsta *Geranium macrorrhizum* i *G. dalmaticum* donose Tablice 8 i 9. te Slika 15.

Tablica 8. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Geranium macrorrhizum* L.

<i>Geranium macrorrhizum</i>	Masa uzorka (g)		A <sub>505nm</sub> otopine	Srednja vrijednost A <sub>505nm</sub> ± SD	% fenolnih kiselina (FK)	Srednja vrijednost % FK ± SD
ekstrakt	0,2008	uzorak	0,127	0,123±0,004	1,58	1,53±0,05
			0,120		1,49	
			0,123		1,53	

Tablica 9. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f.

<i>Geranium dalmaticum</i>	Masa uzorka (g)		A <sub>505nm</sub> otopine	Srednja vrijednost A <sub>505nm</sub> ± SD	% fenolnih kiselina (FK)	Srednja vrijednost % FK ± SD
ekstrakt	0,2007	uzorak	0,119	0,107±0,011	1,48	1,33±0,13
			0,102		1,27	
			0,099		1,23	



Slika 15. Spektri dobiveni mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrsta *Geranium macrorrhizum* L. i *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f.

Zaključno, sadržaj fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Geranium macrorrhizum* iznosio je 1,53±0,05%, dok je prosječni udio flavonoida vrste *G. dalmaticum* bio 1,33±0,13%.



## 5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija vrsta roda *Geranium*: *Geranium macrorrhizum* L. – stjenjarska iglica i *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f. – dalmatinska iglica, koja je uključivala kvalitativnu i kvantitativnu analizu ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina.

Kvalitativna analiza polifenola provedena je općom reakcijom promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge.

Kvalitativna analiza trjeslovina provedena je općim reakcijama taloženja i promjene boje. Kondenzirane trjeslovine dokazane su kod obje vrste jer se pojavio talog na filter papiru, koji je bio intenzivnijeg smeđeg obojenja kod stjenjarske iglice. Trjeslovine koje hidroliziraju dokazane su pojavom ljubičastog prstena na mjestu prikladnog pH.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktu biljnih vrsta određena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, kojoj prethodi taloženje trjeslovina kazeinom. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima vrste *Geranium macrorrhizum* iznosio je  $21,55 \pm 0,40\%$ , a sadržaj trjeslovina  $15,77 \pm 0,50\%$ . Kod vrste *Geranium dalmaticum*, sadržaj ukupnih polifenola iznosio je  $21,76 \pm 0,07\%$ , a sadržaj trjeslovina  $15,58 \pm 0,05\%$ .

Kvantitativna analiza flavonoida provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s  $Al^{3+}$ . Sadržaj flavonoida u nadzemnim biljnim dijelovima stjenjarske iglice je iznosio  $0,55 \pm 0,00\%$ , a dalmatinske iglice  $0,51 \pm 0,01\%$ .

Fenolne su kiseline u uzorcima vrsta određene spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji s nitrit-molibdat reagensom, a njihov je sadržaj za stjenjarsku iglicu iznosio  $1,53 \pm 0,05\%$ , a za dalmatinsku iglicu  $1,33 \pm 0,13\%$ .

Fitokemijska karakterizacija koja je provedena u okviru ovoga diplomskog rada predstavlja doprinos znanstvenom istraživanju biološki aktivnih tvari vrsta roda *Geranium*. Nisu uočene značajne razlike u količini biološki aktivnih tvari između stjenjarske i dalmatinske iglice. Dalmatinska iglica je endemična vrsta, dakle, s ograničenim područjem rasprostranjenosti i slabo je istraživana vrsta, zbog čega njezina uporaba još nije dovoljno istražena, dok je *G. macrorrhizum* u pučkoj medicini u uporabi kod oboljenja želuca. S obzirom na slične kvalitativne i kvantitativne rezultate ovoga fitokemijskog istraživanja, može se pretpostaviti slično biološko djelovanje ispitivanih biljnih vrsta te moguća primjena u slične terapijske svrhe.

## 6. LITERATURA

1. Ascacio-Valdés JA, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilera-Carbo A, Prado-Barragán A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J Med Plant Res*, 2011; 5(19): 4696-4703.
2. Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2008; 59: str. 205-212
3. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*. 1998; 56 (11): str. 317-333.
4. Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baeumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 2011; 30 (4): str. 490-493.
5. Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)*, 2009; 6: str. 33.
6. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen des Gehaltes an Flavanol-derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960; 293: str. 1033-1042.
7. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*. 2007; 43(4): str. 348-361.
8. de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(3): str. 3203-3228.
9. Erhardt W, Götz E, Bödeker N, Seybold S. Zander-Handwörterbuch der Pflanzennamen. 17. Aufl. Stuttgart, Eugen Ulmer GmbH und Co., 2002, str. 154, 444-446.
10. Furtado MA, de Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mut Res*, 2008; 657: str. 150-154.

11. Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009.
12. Gülcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, str. 207, 213-220.
13. Hagerman AE. The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.
14. Hagerman AE. The Tannin Handbook, Condensed Tannin Structural Chemistry. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.
15. Harborne JB. Biochemistry of Phenolic Compounds. London-New York, Academic Press, 1964, str. 57-62, 83, 136, 149.
16. Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural Product Reports*. 1994; 11: str. 41-66.
17. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Natr Cancer*, 2010, 61, str. 1-20.
18. Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyauma AH, Yamasaki H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int J Mol Med*, 2011, 28: str. 595-598.
19. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on dimalindang-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine*, 2004, 11: str. 424-430.
20. Kalodžera Z. Farmakognozija II. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.
21. Kim HP, Mani I, Ziboh VA. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase from guinea pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty*
22. Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*, 2008, 7: str. 301-311.
23. Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferryl myoglobin: Consumption vs regeneration. *Arch Biochem Biophys*, 1995, str. 323, 373-381.

24. Maleš Ž. Izolacija i identifikacija flavonoida drače – *Paliurus spina-christi* Mill.,  
Magistarski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb,  
1990, str. 49.
25. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food  
sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): str. 727-747.
26. Marković Lj. (2000) *Geranium* L. – *iglica*. In *Index florae Croaticae*, pars 3, suppl. 1.  
Nikolić T. (Ed.). *Natura Croatica*, 9, str. 102–103.
27. Miller AL. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*,  
1996, 1: str. 103-111.
28. Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool  
for ecological studies. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1993; 21 (8): str.  
833-846.
29. Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-  
Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules.* 2011; 16: str.  
2191-2217.
30. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T.  
Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces  
lipopoly saccharide (LPS) – induced liver injury in d-galactosamine (dGalN) –  
sensitized mice. *Free Radical Med*, 2002, 33: str. 798-806.
31. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal  
inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* in the murine two-  
stage skin model. *Carcinogenesis*, 2004, 25: str. 549-557.
32. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and  
disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2: str. 270-278.
33. Petrik J. Polifenoli – antioksidansi, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta  
u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.
34. Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Nisimoto Y, Yoshino  
M. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in  
RAW264.7 macrophages. *Free Radical Res*, 2005, 39: str. 995-1003.

35. Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1994, 1: str. 3485-3498.
36. Rangari VD. Pharmacognosy Tannin Containing Drugs, J.L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.
37. Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem. Ind.* 2009; 58 (3): str. 121-128.
38. Robards K, Prenzler PD, Tucke G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 1999, 66: str. 401-436.
39. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agr Food Chem*, 2003, 51: str. 2866-2887.
40. Russell WR, Burkitt MJ, Provan GJ, Chesson A. Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. *J Sci Food Agric*, 1999, 79: str. 408-410.
41. Saija A, Scalese M, Lanza M et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19: str. 481-486.
42. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*, 2011, 403: str. 136-138.
43. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81 (1): str. 2155-2175.
44. Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Arch. Pharm.* 1976; 309: str. 38-44.
45. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53: str. 310-329.
46. Şöhretoğlu D, Ekizoğlu M, Özalp M, Sakar MK. (2008) Free radical scavenging and antimicrobial activities of some *Geranium* species. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 28, str. 115-124.

47. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002; 32 (4): str. 314-318.
48. Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2007, 51: str. 3367-3370.
49. Šilić Č. (1990) *Endemične biljke*. IP Svjetlost , Sarajevo. str. 65.
50. Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol*, 2002, 449: str. 261-267.
51. Thomé O. W. *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 1885, Gera, Germany
52. Vladimir S. Izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva timijanolistnog vršića – *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. Magistarski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišt u Zagrebu, Zagreb, 1993, str. 8, 20-30.
53. Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.
54. Vuković R. Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Beuth.). Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2013.
55. Wagner H. Pharmazentische Biologie, Drogen un ihre Inhaltsstoffe, 5. neubearbeitete Auflage. Stuttgart-New York, Gustav Fischer Verlag, 1993, str. 39, 147, 244-249, 267.
56. Webb DA, Ferguson IK. (1978) *Geranium* L. In *Flora Europaea*, vol. 2, *Rosaceae to Umbelliferae*. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge. str. 193–199.
57. Widmer TL, Laurent N. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. Pathogenic to *Theobroma cacao*. *Eur J Plant Pathol*, 2006, 115, 377-388.
58. Zhang LL, Lin YM. Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008; 9(5): 407-415.

## 7. SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta *Geranium macrorrhizum* L. i *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f. (Geraniaceae). Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari za vrstu *Geranium macrorrhizum* iznosio je:  $21,55 \pm 0,40\%$  (UP),  $15,77 \pm 0,50\%$  (T),  $0,55 \pm 0,00\%$  (F) i  $1,53 \pm 0,05\%$  (FK). Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari za vrstu *Geranium dalmaticum* iznosio je:  $21,76 \pm 0,07\%$  (UP),  $15,58 \pm 0,05\%$  (T),  $0,51 \pm 0,01\%$  (F) i  $1,33 \pm 0,13\%$  (FK). Provedena kvalitativna i kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju vrsta roda *Geranium* i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrsta *G. macrorrhizum* i *G. dalmaticum*, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

## SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative analysis of polyphenols of *Geranium macrorrhizum* L. and *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f. (Geraniaceae) was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. Quantitative analysis of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) was carried out using spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds for *Geranium macrorrhizum* were as follows:  $21.55 \pm 0.40\%$  (TP),  $15.77 \pm 0.50\%$  (T),  $0.55 \pm 0.00\%$  (F), and  $1.53 \pm 0.05\%$  (PA). The contents of analyzed polyphenolic compounds for *Geranium dalmaticum* were as follows:  $21.76 \pm 0.07\%$  (TP),  $15.58 \pm 0.05\%$  (T),  $0.51 \pm 0.01\%$  (F), and  $1.33 \pm 0.13\%$  (PA). Performed qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of genus *Geranium* and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of species *G. macrorrhizum* i *G. dalmaticum*, especially in relation to the content of bioactive polyphenolic substances.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA POLIFENOLA VRSTA *GERANIUM MACRORRHIZUM* L. I *G. DALMATICUM* (BECK) RECH. F., GERANIACEAE

*Marina Šimunić*

#### SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta *Geranium macrorrhizum* L. i *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f. (Geraniaceae). Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari za vrstu *Geranium macrorrhizum* iznosio je:  $21,55 \pm 0,40\%$  (UP),  $15,77 \pm 0,50\%$  (T),  $0,55 \pm 0,00\%$  (F) i  $1,53 \pm 0,05\%$  (FK). Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari za vrstu *Geranium dalmaticum* iznosio je:  $21,76 \pm 0,07\%$  (UP),  $15,58 \pm 0,05\%$  (T),  $0,51 \pm 0,01\%$  (F) i  $1,33 \pm 0,13\%$  (FK). Provedena kvalitativna i kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju vrsta roda *Geranium* i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrsta *G. macrorrhizum* i *G. dalmaticum*, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

- Rad sadrži: 44 stranice, 15 grafičkih prikaza, 9 tablica i 58 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: *Geranium macrorrhizum*, L., *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f., polifenoli, trjeslovine, flavonoidi, fenolne kiseline, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija
- Voditeljica: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
- Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Jadranka Vuković Rodríguez**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Živka Juričić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj, 2016.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, HR-10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF POLYPHENOLS OF *GERANIUM MACRORRHIZUM* L. AND *G. DALMATIUM* (BECK) RECH. F., GERANIACEAE

*Marina Šimunić*

#### SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative analysis of polyphenols of *Geranium macrorrhizum* L. and *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f. (Geraniaceae) was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. Quantitative analysis of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) was carried out using spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds for *Geranium macrorrhizum* were as follows: 21.55±0.40% (TP), 15.77±0.50% (T), 0.55±0.00% (F), and 1.53±0.05% (PA). The contents of analyzed polyphenolic compounds for *Geranium dalmaticum* were as follows: 21.76±0.07% (TP), 15.58±0.05% (T), 0.51±0.01% (F), and 1.33±0.13% (PA). Performed qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of genus *Geranium* and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of species *G. macrorrhizum* i *G. dalmaticum*, especially in relation to the content of bioactive polyphenolic substances.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 15 figures, 9 tables, and 58 references. Original is in Croatian language.  
Keywords: *Geranium macrorrhizum*, L., *Geranium dalmaticum* (Beck) Rech. f., total polyphenols, tannins, flavonoids, phenolic acids, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry  
Mentor: **Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jadranka Vuković Rodríguez, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Živka Juričić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2016

