Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrste Micromeria kosaninii Šilić (Lamiaceae)

Šojat, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:644724

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Mia Šojat

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrste *Micromeria kosaninii* Šilić (Lamiaceae)

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Analitika lijekova 2* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, u suradnji s Farmaceutskim botaničkim vrtom „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Jurišić Grubešić.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić, na pruženoj pomoći te ukazanom strpljenju i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem i ostalim članovima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na susretljivosti tijekom provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja.

Veliko hvala mojim najbližima što su vjerovali u mene, imali strpljenja i pružali mi potporu tijekom svih godina studija.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Botanički podatci 3

1.1.1. Porodica *Lamiaceae* (syn. *Labiatae*) Lindl. 1836. – usnače 3

1.1.2. Rod *Micromeria* Bentham – bresine ili vrisići 4

1.1.3. *Micromeria kosaninii* Šilić 5

1.2. Biološki aktivne tvari vrste *Micromeria kosaninii* Šilić 7

1.2.1. Polifenoli 7

1.2.1.1. Kemijska struktura i značajke 7

1.2.1.2. Rasprostranjenost 9

1.2.1.3. Djelovanje i upotreba 9

1.2.2. Fenolne kiseline 11

1.2.2.1. Kemijska struktura i značajke 11

1.2.2.2. Rasprostranjenost 12

1.2.2.3. Djelovanje i upotreba 12

1.2.3. Flavonoidi 13

1.2.3.1. Kemijska struktura i značajke 13

1.2.3.2. Rasprostranjenost 14

1.2.3.3. Djelovanje i upotreba 15

1.2.4. Trjeslovine ili tanini 16

1.2.4.1. Kemijska struktura i značajke 16

1.2.4.2. Rasprostranjenost 17

1.2.4.3. Djelovanje i upotreba 18

2. OBRAZLOŽENJE TEME 19

3. MATERIJALI I METODE 20

3.1. Biljni materijal 20

3.2. Aparatura i kemikalije 21

3.3. Metode i postupci istraživanja 22

3.3.1. Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina 22

3.3.1.1. Tankoslojna kromatografija flavonoida i fenolnih kiselina 22

3.3.2. Kvalitativna analiza polifenola i trjeslovina 22
3.3.2.1. Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 22
3.3.2.2. Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 23
3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina 23
3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida 25
3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 27
4.1. Rezultati kvalitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina 27
4.1.1. Rezultati tankoslojne kromatografije flavonoida i fenolnih kiselina 27
4.2. Rezultati kvalitativne analize polifenola i trjeslovina 30
4.2.1. Rezultati reakcija dokazivanja polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 30
4.2.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja polifenola 30
4.2.2. Rezultati reakcija dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 30
4.2.2.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina 30
4.2.2.2. Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina 31
4.2.2.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju 31
4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina 32
4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida 36
4.5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja polifenola i trjeslovina 39

5. ZAKLJUČCI 44

6. LITERATURA 46

7. SAŽETAK/SUMMARY 49

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD 51

1. UVOD

Ljudi su se od davnina okretali biljkama u potrazi za rješenjima različitih zdravstvenih problema. Ljekovito bilje i pripravci od ljekovitog bilja najstariji su način tretiranja različitih stanja i bolesti. Oblik liječenja koji uključuje primjenu standardiziranih pripravaka/lijekova dobivenih iz biljnog materijala poznat je pod nazivom fitoterapija. Ona podrazumijeva liječenje, ublažavanje i/ili sprječavanje bolesti upotrebom ljekovitih biljaka, njihovih dijelova (npr. cvjetova, korijena, listova) ili njihovih sastojaka (npr. eteričnih ulja), kao i gotovih pripravaka (primjerice, tinktura, čajeva, masti, kapsula). Pripravci od ljekovitog bilja na tržištu se mogu naći u okviru različitih regulatornih skupina, najčešće kao biljni lijekovi, tradicionalni biljni lijekovi ili dodaci prehrani, ali i kao galenski pripravci, medicinski proizvodi, hrana ili kozmetički pripravci. Koriste se kod liječenja blagih simptoma, kroničnih bolesti, kao dopunska terapija te u prevenciji bolesti.

Razvojem znanosti i promjenom stila života, briga o lijekovima povjerena je farmaceutskoj industriji, no posljednjih desetljeća ponovo raste popularnost biljnih pripravaka u prevenciji i liječenju mnogih bolesti. Usporedo s tim, raste i interes znanstvene zajednice za takve pripravke. Biljke koje se tradicionalno upotrebljavaju u narodnoj medicini podvrgavaju se opsežnim ispitivanjima u svrhu utvrđivanja njihovog kemijskog sastava, djelotvornosti i sigurnosti. Javlja se novi pristup upotrebe fitopreparata – racionalna fitoterapija, koji uključuje primjenu učinkovitih i sigurnih biljnih pripravaka/lijekova, čija je primjena temeljena na kliničkim dokazima, poznatoj djelatnoj tvari i dozi, standardiziranom sadržaju aktivnih tvari te poznatim nuspojavama i kontraindikacijama. Znatni se napori pritom ulažu u ispitivanje sastava i određivanje sadržaja različitih fitokemijskih tvari, među kojima valja istaknuti veliku skupinu polifenolnih spojeva, uvelike zaslužnih za pozitivne biološke učinke biljnih pripravaka i lijekova, a s ciljem doprinosa istraživanju potencijalno vrijednih izvora ljekovitih tvari u otkrivanju i razvoju novih terapeutika.

Mnoge biljke porodice Lamiaceae imaju dokazana ljekovita djelovanja i široko se primjenjuju, kako u tradicionalnoj medicini mnogih naroda, tako i u suvremenoj fitoterapiji. Biljne vrste ove porodice poznate su po znatnom sadržaju eteričnog ulja, ali uz to predstavljaju i vrijedan izvor biološki aktivnih tvari, posebice polifenola.

Rod *Micromeria* uključuje mnoge endemične i subendemične vrste koje su zbog ograničene rasprostranjenosti i nepristupačnih nalazišta slabo zastupljene u tradicionalnoj medicini, stoga ne čudi da danas zaokupljaju posebnu pozornost znanstvenika kao slabo istraženi potencijalni izvori ljekovitih tvari.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavonoida, ukupnih polifenola i trjeslovina) iz nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić (Lamiaceae), a u svrhu fitokemijske karakterizacije i spoznavanja njezinog fitoterapijskog potencijala.

1.1. Botanički podatci

1.1.1. Porodica *Lamiaceae* (syn. *Labiatae*) Lindl. 1836. – usnače

Porodica *Lamiaceae* obuhvaća 225 rodova s 6170 vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu, a najviše na području Sredozemlja i u iransko-turanskoj regiji (Grdinić i Kremer, 2009). To su biljke koje vole toplinu, a najbolje uspijevaju na vapnenačkoj podlozi. U Hrvatskoj su zbog toga najrasprostranjenije u primorskom području, no mnoge su vrste prisutne i u unutrašnjim krajevima (Kušan, 1956).

Biljne vrste porodice *Lamiaceae* jednogodišnje su i dvogodišnje biljke ili trajnice, odnosno polugrmovi ili grmovi s karakterističnom četverobridnom stabljikom zbog kolenhima u uglovima stanica. Listovi su jednostavni, unakrsno nasuprotni, bez palistića. Cvjetovi su im dvospolni, rjeđe poligamni, nepravilni, karakteristično dvousnati, skupljeni u zbijene paštitaste cvatove u pazušcima listova. Čaška je sastavljena od 5 međusobno sraslih listića (sulapna), cjevasta ili zvonasta, s 4-5 zubaca, često dvousnata. Vjenčić je srastao u cijev koja se u gornjem dijelu proširuje i razdvaja u dvije usne, pri čemu se gornja usna sastoji od dvije, a donja od tri međusobno srasle latice. U cvijetu se nalazi jedan tučak sastavljen od dva međusobno srasla plodnička lista. Plodnica tučka je nadrasla, četveropretinčana, s po jednim sjemenim zametkom u svakom pretincu, te jednim vratom koji je najčešće umetnut između dijelova plodnice i u gornjem dijelu razdijeljen na dvoje. Četiri prašnika prirasla su za cijev vjenčića, pri čemu su dva duža, a dva kraća (dvomoćni prašnici). Rodovi kadulja (*Salvia*) i ružmarin (*Rosmarinus*) imaju samo dva prašnika. Vrat tučka i prašnici su savijeni i redovito skriveni ispod gornje usne vjenčića. Plod je sitni kalavac koji se pri dozrijevanju raspada na četiri jednosjemena plodića (merikarpa) (Grdinić i Kremer, 2009; Mägdefrau i Ehrendorfer, 1997; Dubravec, 1991; Kušan, 1956).

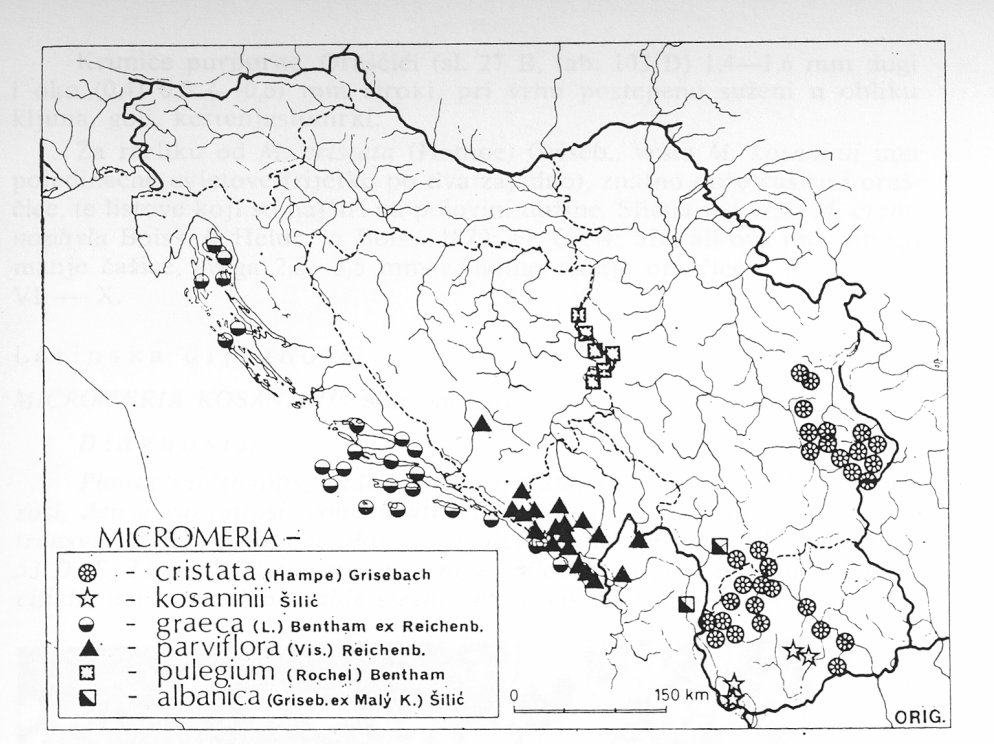
Stabljika i listovi većine vrsta imaju karakterističan miris zbog eteričnog ulja kojeg sadrže u sekretornim (žljezdanim) dlakama pa se mnoge vrste upotrebljavaju kao začin, primjerice mažuran (*Majorana hortensis*), bosiljak (*Ocimum basilicum*), majčina dušica (*Thymus serpyllum*) ili kao ljekovite biljke, npr. lavanda (*Lavandula angustifolia*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis*) i kadulja (*Salvia officinalis*) (Mägdefrau i Ehrendorfer, 1997; Dubravec, 1991).

1.1.2. Rod *Micromeria* Bentham – bresine ili vrisići

Rod *Micromeria* (bresine ili vrisići) u okviru porodice *Lamiaceae* prvi put opisuje Bentham 1834. godine. Vrste toga vrlo polimorfnog roda mali su, razgranjeni i često aromatični polugrmovi koji uglavnom rastu na kamenjaru i u pukotinama stijena mediteranske i submediteranske zone. Rod obuhvaća oko 130 vrsta rasprostranjenih od Kanarskih otoka na zapadu do Indije i Kine na istoku te južno do juga Afrike, sa središtem rasprostranjenosti u zemljama Sredozemlja. U Hrvatskoj nalazimo devet vrsta roda *Micromeria*: *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch, *M. croatica* (Pers.) Schott, *M. pseudocroatica* Šilić, *M. dalmatica* Bentham, *M. juliana* (L.) Bentham ex. Reichenb., *M. kerneri* Murbeck, *M. graeca* (L.) Bentham ex. Reichenb., *M. fruticulosa* (Bertol. in Desv.) Grande i *M. microphylla* (D'Urv.) Benth. (Bräuchler i sur., 2008; Vladimir-Knežević i sur., 2000).

Vrste toga roda karakteriziraju sitni, širokojajasti ili okruglasti, ili pak kopljasti do linearni listovi, s manje-više previnutim rubom. Cvjetovi su sjedeći, ili na kratkim stapkama, skupljeni u rastresite prividne metlice ili pak grade dugačak isprekidan grozd. Sitni su, purpurni, crvenoljubičasti ili bijeli. Čaške su cjevaste ili cjevastozvonaste, pravilne, s 5 jednakih ili gotovo jednakih zubaca ušiljena vrha i s 13-15 uzdužnih žila. Vjenčić je dvousnat s plosnatom gornjom i trolapom donjom usnom. Pod gornjom usnom nalaze se četiri dvomoćna prašnika koja ne izviru iz vjenčića. Plodovi kalavci su vretenasti ili jajasto vretenasti, (0,8-) 1-1,2 (-1,4) mm dugi i oko 0,3-0,4 (-0,5) mm široki, pretežito tamnosmeđe boje, goli ili samo pri vrhu s čuperkom dlačica. U starijoj literaturi prisutno je mnogo nedoumica u pogledu taksonomije i nomenklature *Micromeria* vrsta, što potvrđuje i postojanje velikog broja sinonima za pojedine vrste. Neke su vrste svrstavane u rodove *Thymus*, *Satureja*, *Calamintha*, *Melissa* i dr. (Kalođera i Vladimir, 1992).

Fitokemijskim istraživanjima obuhvaćeno je mnogo vrsta roda *Micromeria*, a utvrđena je prisutnost eteričnog ulja, flavonoida, triterpena i saponina. Iako ih obilježava brojnost, raznolikost i bogat sadržaj navedenih biološki aktivnih sastavnica, većina tih biljaka nema znatnu primjenu u pučkoj medicini, niti se šire rabe kao prirodne ljekovite sirovine. Razlog tome su ograničena područja rasprostranjenosti i vrlo nepristupačna nalazišta mnogih vrsta roda *Micromeria* (Vladimir-Knežević i sur., 2000).



Slika 1. Nalazišta vrsta: *Micromeria cristata* (Hampe) Grisebach, *M. kosaninii* Šilić, *M. graeca* (L.) Bentham ex Reichenb., *M. longipedunculata* Bräuchler (syn. *M. parviflora* (Vis.) Reichenb.) *Clinopodium pulegium* (Rochel) Bräuchler (syn. *Micromeria pulegium* (Rochel) Bentham) i *Clinopodium serpyllifolium* (M. Bieb.) Kuntze (syn. *Micromeria albanica* (Griseb. ex. K. Maly) Šilić) u flori zemalja bivše Jugoslavije (Šilić, 1979).

1.1.3. *Micromeria kosaninii* Šilić

Micromeria kosaninii Šilić višegodišnja je biljka iz porodice *Lamiaceae* koja raste u pukotinama stijena u planinskim područjima Makedonije, a 2013. godine pronađena je i u Nacionalnom parku Prespa u Albaniji (Shuka i Tan, 2013).

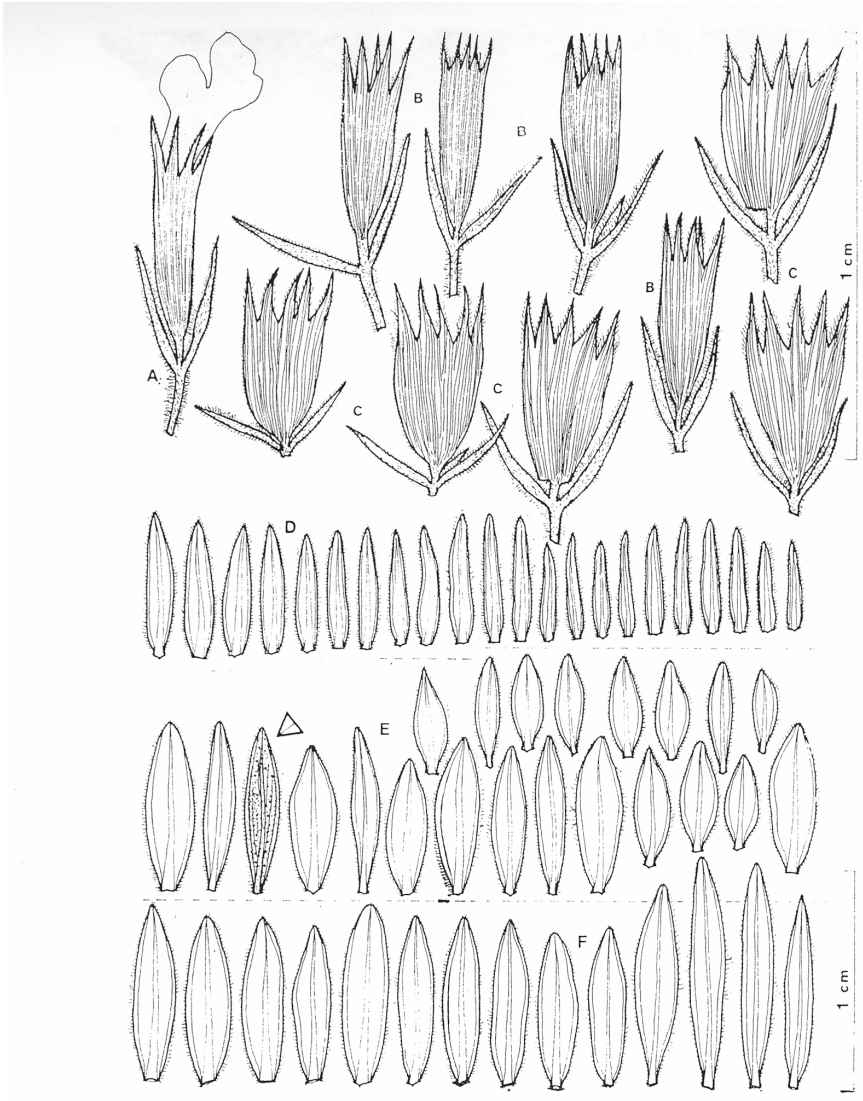
Korijen biljke dobro je razvijen i odrvenjen. Izdanci su mnogobrojni, tanki, gusto busenasto zbijeni, oko 5-10 (-15) cm visoki, na poprečnom presjeku okrugli i tupo bridasti, pokriveni sitnim stršećim dlačicama.

Listovi su u sredini najširi, s obje strane dlakavi, na rubu cjeloviti, prema unutra uvrnuti, trepavičavo dlakavi, s vrlo izraženom središnjom žilom te s 3-4 manje izražene, blago u luku savijene žile. Donji su listovi izduženo eliptični, 7-10 mm dugi i oko 1,5-2 mm široki.

Cvjetovi su pojedinačni, rijetko po dva na zajedničkoj dršci. Smješteni su na tankim, dlakavim 1,5-2 (-2,5) mm dugim stapkama. Čaške su 4-5 mm duge, cjevaste, zelene, rijetko

ljubičasto nahukane, s 13 jasno istaknutih uzdužnih rebara, oštro dlakave, osobito duž rebara, iznutra gole, sjajne. Zupci čaške su 2,5-3 puta kraći od cijevi, izduženo trokutasti, približno iste dužine, trepavičavo dlakavi i s unutrašnje strane s gustim uspravnim dlačicama od osnove pa do polovine ili do ispod samog vrha. Vjenčići su purpurni.

Kestenjastosmeđi i goli oraščićasti plodovi dugi su 1,4-1,6 mm i oko 0,4-0,6 mm široki, pri vrhu postupno suženi u obliku kljuna (Šilić, 1979).



Slika 2. *Micromeria kosaninii* Šilić – A, cvijet s braktejama; B, čaške s braktejama; C, razrezane i raširene čaške s braktejama; D, gornji listovi; E, srednji listovi; F, donji listovi (Makedonija: Galičica: prevoj Poljce, cca 1600 m.s.m., solo calc.) (Šilić, 1979).

1.2. Biološki aktivne tvari vrste *Micromeria kosaninii* Šilić

1.2.1. Polifenoli

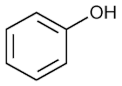
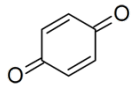
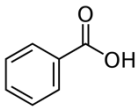
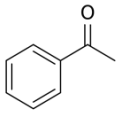
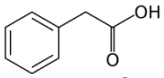
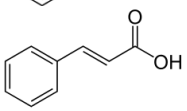
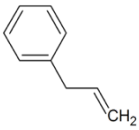
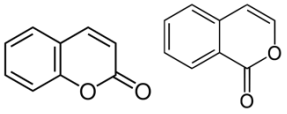
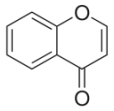
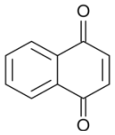
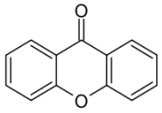
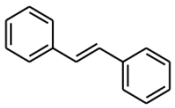
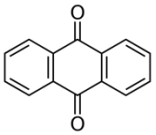
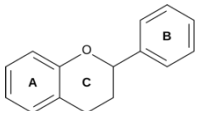
1.2.1.1. Kemijska struktura i značajke

Polifenoli su široko rasprostranjena skupina spojeva biljnog porijekla. Kao što samo ime ukazuje, u strukturi posjeduju jednu ili više fenolnih skupina. U ovu skupinu spojeva, za koje se procjenjuje da ih u prirodi ima više od milijun (jer najčešće dolaze u obliku glikozida), svrstavaju se fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, tanini i lignini (Amić, 2008). Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida građeni su tako da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem, koji može, ali ne mora formirati treći prsten. Stilbeni su polifenoli koji sadrže 1,2-difenileten kao funkcionalnu skupinu, a najpoznatiji predstavnik ove skupine polifenola je resveratrol (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Zanimanje za ove spojeve iznimno je veliko jer se pokazalo da su mnogi polifenolni spojevi pronađeni u povrću, voću i drugim biljnim izvorima prirodni antioksidansi.

Usprkos velikoj raznolikosti biljnih fenola, većina ovih spojeva ipak potječe od zajedničkog izvora: aminokiselina fenilalanina ili tirozina, nastalih iz korizmata, završnog spoja iz puta šikiminske kiseline. Ove se aminokiseline deaminiraju do cimetne kiseline, nakon čega ulaze u fenilpropanski put biosinteze. Ključni korak u ovom biosintetskom putu je uvođenje jedne ili više hidroksilnih grupa na benzenski prsten. Kao posljedica, ovi su spojevi izvedeni iz zajedničkog C_6-C_3 fenilpropanskog građevnog bloka (Pereira i sur., 2009).

Prirodni polifenolni spojevi variraju od jednostavnih molekula poput fenolnih kiselina, do visoko polimeriziranih spojeva poput tanina. Prvenstveno se javljaju u obliku konjugata, s jednim ili više šećernih ostataka vezanih na hidroksilne grupe, iako su moguće i direktne veze šećera na aromatski ugljikov atom. Vezani šećeri mogu biti prisutni u obliku monosaharida, disaharida, pa čak i oligosaharida. Najčešći šećerni ostatak je glukoza, iako se mogu naći i galaktoza, ramnoza, ksiloza i arabinoza, kao i glukuronska i galakturonska kiselina te mnogi drugi. Također su česte i veze s drugim spojevima, poput karboksilnih i organskih kiselina, amina i lipida, kao i veze s drugim fenolnim spojevima. Glavne klase polifenolnih spojeva prikazane su u Tablici 1 (Bravo, 1998).

Tablica 1. Glavne klase polifenolnih spojeva (Bravo, 1998).

Klasa	Temeljni kostur	Temeljna struktura
Jednostavni fenoli	C_6	
Benzokinoni	C_6	
Fenolne kiseline	C_6-C_1	
Acetofenoni	C_6-C_2	
Feniloctene kiseline	C_6-C_2	
Hidroksicimetne kiseline	C_6-C_3	
Fenilpropeni	C_6-C_3	
Kumarini, izokumarini	C_6-C_3	
Kromoni	C_6-C_3	
Naftokinoni	C_6-C_4	
Ksantoni	C_6-C_1-C_6	
Stilbeni	C_6-C_2-C_6	
Antrakinoni	C_6-C_2-C_6	
Flavonoidi	C_6-C_3-C_6	
Lignani, neolignani	$(C_6$-$C_3)_2$	
Lignini	$(C_6$-$C_3)_n$	

1.2.1.2. Rasprostranjenost

Polifenolni spojevi gotovo su sveprisutni u hrani (voće, povrće, žitarice, mahunarke, orašasto voće) i pićima biljnog podrijetla (vino, pivo, čaj, kakao). Njihova količina znatno varira čak i među različitim kultivarima iste biljne vrste. Nastanak flavonskih i flavonolskih glikozida uvelike ovisi o svjetlosti, stoga se najveće koncentracije tih spojeva u pravilu pronalaze u listovima i ostalim nadzemnim dijelovima, a svega u tragovima u podzemnim dijelovima biljke. Prisutnost polifenola u biljkama uvelike je uvjetovana genetskim čimbenicima i okolišnim uvjetima. Ostali čimbenici, poput klijanja, vegetacijskog razdoblja, varijeteta, obrade i skladištenja, također utječu na sadržaj polifenola u biljnom materijalu.

Glavni polifenolni spojevi u mahunarkama i žitaricama su flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine. U žitarica, polifenolni spojevi čine manje od 1% suhe tvari. Veće količine polifenola sadrže tamnije vrste mahunarki, poput graha (*Phaseoulus vulgaris*). Mahunarke također sadržavaju izoflavonoide, za razliku od povrća koje pretežito sadrži flavonoidne glikozide. Flavonoidi se uglavnom nalaze u nadzemnim dijelovima biljke, rijetko kad u korijenu i lukovici. Iznimke su pojedine biljne vrste poput luka i sladića. Bobičasto voće karakterizira visok sadržaj antocijanidina, dok je voće poput jabuka bogato fenolnim kiselinama, a vrste roda *Citrus* flavonoidima. Predominantan polifenolni spoj u voću je flavonol, a najveće koncentracije dolaze u kori. Orašasto voće bogato je trjeslovinama. Ulje sjemenki pretežito sadrži fenolne kiseline, a maslinovo ulje sadrži i fenolne kiseline i trjeslovine koje hidroliziraju.

Fermentacija uzrokuje različit sadržaj polifenola u različitim vrstama čaja: zeleni čaj vrlo je bogat flavanolima, dok crni čaj sadrži velike količine oksidiranih polifenola (teaflavin i tearubigin). Klorogenska kiselina je glavni polifenolni sastojak zrna kave. Glavni polifenolni spoj ploda kakaovca je flavanol epikatehin, a uz njega je također bogat antocijanima i trjeslovinama. Polifenolni spojevi iz vina uključuju fenolne kiseline, antocijane, tanine i ostale polifenole poput fitoaleksina resveratrola. Postoje znatne razlike između polifenolnog sastava crvenih i bijelih vina, kao i između mladih i odležanih vina te svježeg soka grožđa (Bravo, 1998).

1.2.1.3. Djelovanje i upotreba

Polifenolni se spojevi akumuliraju u velikim količinama u biljkama te imaju mnoštvo uloga u životnom ciklusu biljke, poput strukturnih uloga u različitim potpornim ili zaštitnim tkivima te sudjelovanja u obrambenim strategijama. Osim toga, igraju važnu ulogu u privlačenju

oprašivača i životinja koje raznose sjeme, zaštiti od UV zračenja te služe kao signalne molekule u interakciji biljaka i njihovog okoliša. Jedna od najsvestranijih skupina flavonoida, antocijanidini, štite kloroplast od fotodegradacije apsorpcijom kvanata visoke energije i hvatanjem slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva. Flavonoli su, osim što štite biljku od djelovanja UV-B zračenja, uključeni i u poticanje razvoja prašničke cijevi u svrhu oprašivanja. Nadalje, izoflavonoidi igraju važnu ulogu u zaštiti od patogena i kukaca te služe kao signalne molekule pri stvaranju dušik-fiksirajućih kvržica mahunarki (leguminoza). Nakon smrti biljke, polifenolni spojevi zaostaju u tlu još tjednima ili mjesecima te utječu na razgradne organizme i proces razgradnje u tlu, čime proširuju svoje djelovanje sa same biljke na cijeli eko sustav (Jaganath i Crozier, 2010).

Osim što služe biljkama kao načini preživljavanja i prilagodbe na uvjete okoline, spomenuti spojevi pokazuju i širok raspon farmakoloških učinaka povezanih s njihovim antioksidativnim svojstvima (Brahmi i sur., 2017). Reaktivni kisikovi spojevi u obliku superoksidnog aniona (O_2^{-}•), vodikovog peroksida (H_2O_2) i hidroksilnog radikala (HO•) prirodni su nusprodukti ljudskog organizma. Postaju opasni, međutim, kada su prisutni u suvišku, jer mogu napasti biološke molekule poput lipida, proteina, enzima, DNA i RNA, te uzrokovati oštećenja stanica i tkiva povezana s nastankom degenerativnih bolesti poput arterioskleroze, neurodegenerativnih bolesti, raka, šećerne bolesti, upalnih bolesti, a utječu i na proces starenja. Iako metabolizam sisavaca posjeduje zaštitne mehanizme za borbu protiv i za smanjenje štete nastale djelovanjem reaktivnih kisikovih spojeva, epidemiološka ispitivanja ukazuju da prehrana bogata fitonutrijentima antioksidativnog djelovanja, posebice flavonoidima i drugim polifenolima, pozitivno djeluje na ljudsko zdravlje (Vladimir-Knežević i sur., 2011; Amarowicz i sur., 2004).

Oksidativni stres označava stanje neravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i reaktivnih metabolita te njihove eliminacije pomoću zaštitnih mehanizama. Nastala neravnoteža uzrokuje oštećenja biomolekula i organa, s potencijalnim djelovanjem na cijeli organizam. Hvatanjem slobodnih radikala, polifenoli inhibiraju oksidaciju biomolekula. Funkcija antioksidansa je da reagiraju sa slobodnim radikalima brže nego što slobodni radikali reagiraju sa supstratom. Za antioksidativno djelovanje polifenolnih spojeva zaslužan je njihov redoks potencijal, koji im omogućuje da brzo djeluju kao reducirajući agensi, tj. donori vodikovih atoma (Vladimir-Knežević i sur., 2011; Amić, 2008).

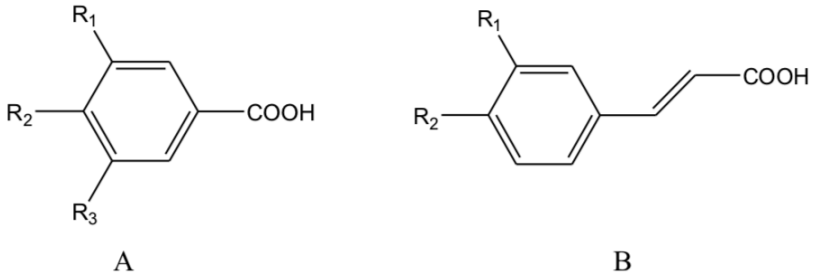
1.2.2. Fenolne kiseline

1.2.2.1. Kemijska struktura i značajke

Fenolne kiseline prisutne u biljnim drogama dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Mogu biti u slobodnom obliku, obliku estera ili glikozida.

Osnovnu strukturu hidroksibenzojevih kiselina predstavlja C_6-C_1 jedinica, a međusobne razlike proizlaze iz hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (npr. galna i vanilinska kiselina).

U biljnim drogama zastupljenije su hidroksicimetne kiseline (C_6-C_3) koje se također međusobno razlikuju prema hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena. Među njima su najučestalije kavena i kumarinska kiselina. Uglavnom se nalaze u obliku estera (npr. klorogenska i ružmarinska kiselina), a rjeđe u slobodnom obliku. Ružmarinska kiselina je ester kavene kiseline i 3,4-dihidroksifenilmliječne kiseline. Karakteristična je sastavnica droga koje se dobivaju iz biljnih vrsta porodice *Lamiaceae* (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).



Slika 3. Osnovne strukture hidroksibenzojevih (A) i hidroksicimetnih (B) kiselina (Bival Štefan, 2015).

Hidroksicimetne kiseline nastaju deaminacijom aminokiselina fenilalanina i tirozina. Eliminacijom dušika iz postraničnog lanca fenilalanina nastaje cimetna kiselina, a deaminacijom tirozina *p*-kumarinska kiselina. Sve biljke imaju sposobnost deaminacije fenilalanina pomoću enzima fenilalanin-amonia-liaze (PAL), dok je deaminacija tirozina ograničena na porodicu trava (Gramineae/Poaceae). Ostale kiseline dobivaju se naknadnim reakcijama hidroksilacije i metilacije (Pereira i sur., 2009).

Derivati hidroksibenzojeve kiseline nastaju iz fenilpropana skraćivanjem postraničnog lanca β-oksidacijom, pri čemu, primjerice, iz *p*-kumarinske kiseline nastaje 4-hidroksibenzojeva kiselina. Druga je mogućnost da do eliminacije postranog lanca dođe već u

ranoj fazi biosinteze. Tako *p*-hidroksibenzojeva kiselina može nastati izravno iz prefenata (koji nastaje iz korizminske kiseline). Glavni su predstavnici ove skupine galna, vanilinska, siringična i salicilna kiselina, a poznati su i pripadajući aldehidi (vanilin, salicilaldehid) (Vladimir-Knežević, 2008).

1.2.2.2. Rasprostranjenost

Fenolne kiseline prisutne su u gotovo svoj hrani biljnog podrijetla (voću, povrću i žitaricama), a nalaze se u gotovo svim biljnim dijelovima (sjemenu, listu, korijenu i stabljici). Zbog široke rasprostranjenosti u biljnom svijetu, procjenjuje se da se od 25 mg do 1 g fenolnih kiselina unosi dnevno hranom, ovisno o prehrambenim navikama pojedinca. Vrlo malo fenolnih kiselina dolazi u slobodnom obliku. Većina je vezana esterskim, eterskim ili acetalnim vezama za strukturne komponente biljke (celuloza, proteini, lignin), veće polifenole (flavonoidi), manje organske molekule (glukoza, kina kiselina) ili druge prirodne spojeve (terpeni). Sadržaj fenolnih kiselina u biljnom materijalu ovisi o mnogim čimbenicima, a najveći utjecaj imaju klima, uvjeti uzgoja i vegetacijsko razdoblje (Bival Štefan, 2015; Robbins, 2003).

1.2.2.3. Djelovanje i upotreba

Uloga fenolnih kiselina kao sekundarnih metabolita u biljkama još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, no smatra se da sudjeluju u različitim procesima, kao što su unos hranjivih tvari, sinteza proteina, aktivnost enzima, fotosinteza i alelopatija. Također ih se povezuje s bojom, okusom, mirisom, nutritivnim i antioksidativnim svojstvima hrane.

Dosadašnja istraživanja bioloških učinaka fenolnih kiselina pokazala su da ferulinska i ružmarinska kiselina smanjuju aktivnost lipooksigenaze i sprječavaju lančane reakcije slobodnih radikala koji nastaju u organizmu. Za kavenu kiselinu istraživanja su pokazala da bi mogla posjedovati antitumorsku aktivnost na rak debelog crijeva. Utvrđeno je da mnoge fenolne kiseline (uključujući kavenu kiselinu) inhibiraju transkripcijsku aktivnost AP-1 proteina koji je povezan s procesima koji kontroliraju upalu te diferencijaciju i proliferaciju stanica. Derivati kavene kiseline pokazali su se kao potencijalna antivirusna terapija kod infekcija HIV-om, budući da selektivno i potentno inhibiraju HIV-integrazu, enzim koji katalizira ugradnju virusne DNA u DNA stanica domaćina. Klorogenska kiselina i cinarin potiču pojačano lučenje žuči te na taj način pospješuju detoksikaciju organizma (Maleš i sur., 2013; Robbins, 2003).

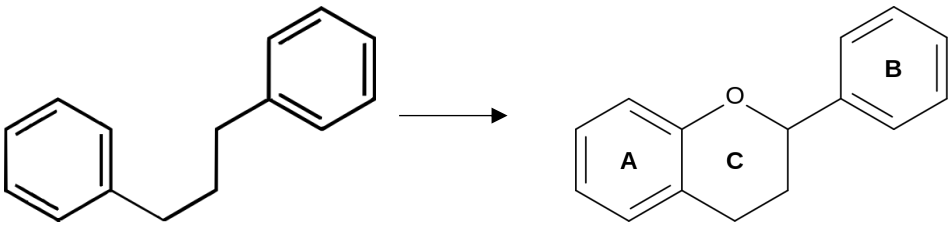
1.2.3. Flavonoidi

1.2.3.1. Kemijska struktura i značajke

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva, glikozida, široko rasprostranjenih u biljnom svijetu. Obuhvaćaju jarko obojene tvari koje daju boju laticama, plodovima i katkad listovima. Naziv skupine potječe od žute boje (lat. *flavus* – žut) mnogih flavonoida (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

Imaju strukturu tipa C_6–C_3–C_6 (1,3-difenilpropan, dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem). U većine flavonoida, središnji fragment povezan je kisikom u heterociklički prsten. Raznolikost njihove strukture uvjetovana je stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama pa se dijele na flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, antocijanidine, leukoantocijanidine, katehine, kalkone i aurone. Uglavnom se nalaze u glikozidnom obliku. Obilježava ih vrsta, broj i položaj šećera vezanih na aglikon. Pretežno su O-glikozidi, a šećer je najčešće vezan u položaju 3 i 7 (Vladimir-Knežević, 2008; Petričić, 1983). Od monosaharida, najzastupljeniji su 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) (Jurišić, 2003).

Mješovitog su biogenog podrijetla, nastaju kombinacijom puta šikiminske kiseline i acilpolimalonatnog puta. Benzenski prsten B nastaje preko šikiminske kiseline, dok je prsten A acetatnog podrijetla, formiran zatvaranjem poliketidnog lanca (Vladimir-Knežević, 2008).



Slika 4. Povezivanje C_6-C_3-C_6 fragmenta flavonoida u heterociklički prsten.

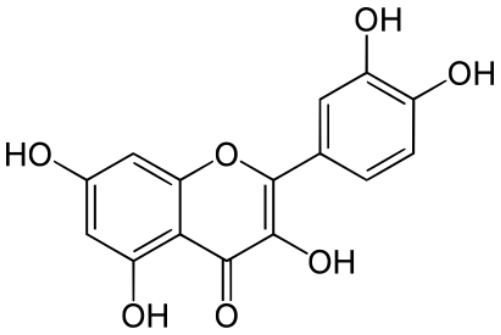
Ovisno o tome u kojem je položaju prsten B vezan na heterociklički benzopiranski prsten, flavonoidi se dijele na: glavne flavonoide (2-fenilbenzopirani), izoflavonoide (3-fenilbenzopirani) i neoflavonoide (4-fenilbenzopirani) (Pereira i sur., 2009).

1.2.3.2. Rasprostranjenost

U prirodi su najrasprostranjeniji flavoni i flavonoli, a zajedno s flavanonima, antocijanidinima i izoflavonoidima čine više od 80% poznatih flavonoidnih spojeva. Dok se flavanoni i flavoni često pronalaze zajedno, flavoni i flavonoli često se međusobno isključuju, a antocijani gotovo da su odsutni u flavanonima bogatim porodicama (Rice-Evans i sur., 1996).

Flavonoli su najrasprostranjenija skupina flavonoida u biljnom svijetu. Variraju u boji od bijele do žute, a strukturno su vrlo srodni flavonima (Jaganath i Crozier, 2010). Najrasprostranjeniji flavonolski flavonoid je rutin (kvercetin-3-rutinozid). Aglikon je kvercetin. Šećerni dio molekule, vezan u položaju C3, čini disaharid rutinoza građena od glukoze i ramnoze. Iz ove skupine heterozida poznatiji su još kvercitrin, izokvercitrin i hiperozid, koji se razlikuju u vrsti šećera vezanoj na kvercetinski aglikon (Vladimir-Knežević, 2008; Petričić, 1983).

Tablica 2. Struktura nekih glikozida flavonolskog tipa.

Aglikon	Šećer	3-O-glikozid
 kvercetin	rutinoza	rutin
	ramnoza	kvercitrin
	glukoza	izokvercitrin
	galaktoza	hiperozid

Flavoni se od flavonola razlikuju jedino po odsutnosti hidroksilne skupine u položaju C3. Glavni predstavnici ove skupine flavonoida su apigenin i luteolin. Za razliku od flavonola, nisu široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, a veće količine nađene su samo u celeru, peršinu i artičokama (Jaganath i Crozier, 2010).

Flavanoni su karakteristični za vrste roda *Citrus*, a glavni predstavnici ove skupine su hesperetin i naringenin, gorki flavonoidi zastupljeni u albedu ploda (Vladimir-Knežević, 2008). Naringenin se također može naći i u rajčici te u proizvodima od rajčice (Jaganath i Crozier, 2010).

Antocijani su vodotopljivi biljni pigmenti, glikozidi koji se hidrolizom razgrađuju na aglikon antocijanidin i šećer koji je najčešće glukoza, galaktoza ili ramnoza (rjeđe ksiloza ili arabinoza). Zaslužni su za crvenu, ljubičastu i plavu boju cvjetova, listova, plodova, stabljike i kore biljaka. Poznato je 17 različitih antocijanidina, no svega ih je 6 (cijanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin i malvidin) šire rasprostranjeno i od prehrambene važnosti. Za razliku od ostalih skupina flavonoida, antocijanidini su pozitivno nabijeni pri kiselom pH (Jaganath i Crozier, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

Izoflavonoidi nastaju premještanjem aromatskog prstena B nastalog iz šikiminske kiseline s C2 na C3 benzopiranskog prstena. Ova je reakcija pregradnje rijetka u prirodi pa su izoflavonoidi ograničeni na porodicu *Fabaceae*. Glavni predstavnici te skupine su daidzein i genistein (Vladimir-Knežević, 2008).

1.2.3.3. Djelovanje i upotreba

Flavonoidi služe kao signalne molekule, obrana od patogenih gljivica i mikroorganizama, detoksificirajući agensi, sredstva koja potiču klijanje sjemenki i spora, zaštita od ultraljubičastog zračenja, alelokemijski agensi, kod prilagodbe na različite okolišne čimbenike, kao što su visoke i niske temperature, suša i ekstremne promjene saliniteta, a zbog živih boja privlače oprašivače i životinje koje se hrane plodovima te time potpomažu reprodukciju (Maleš i sur., 2013).

Flavonoidne biljne droge imaju različit farmakološki učinak. Djeluju spazmolitski (glikozidi iz kamiličina cvijeta ili korijena sladića), diuretski (list breze, korijen zečjeg trna, zelen zlatnice), protuupalno i protuedematozno (rutin, kvercetin, luteolin i apigenin), koleretski (smilje) i dijaforetski (bazgin cvijet i lipin cvijet). Posjeduju i antialergijsko, estrogeno, antihepatotoksično te antisklerotično djelovanje. Djeluju na koronarne krvne žile, kapilare i krvotok, a ljekoviti pripravci iz kamiličina cvijeta ili cvijeta rimske kamilice rabe se u terapiji želučano-crijevnih bolesti (Kuštrak, 2005).

Različita biološka djelovanja flavonoida temelje se na njihovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, vezanju teških metala i interakcijama koje imaju s različitim enzimima: inhibiciji fosfolipaze A_2, ciklooksigenaze, lipooksigenaze, glutation reduktaze, ksantin oksidaze, β-glukuronidaze, hijaluronidaze, alkalne fosfataze, arilsulfataze, H^+-ATP-aze membrane lizosoma, Na^+K^+-ATP-aze plazma membrane, fosfodiesteraze, DOPA-dekarboksilaze, katehol-*O*-metiltransferaze, aldoza-reduktaze, kinaze i drugih, tj. na indukciji CYP enzima i epoksid hidrolaze (Maleš i sur., 2013).

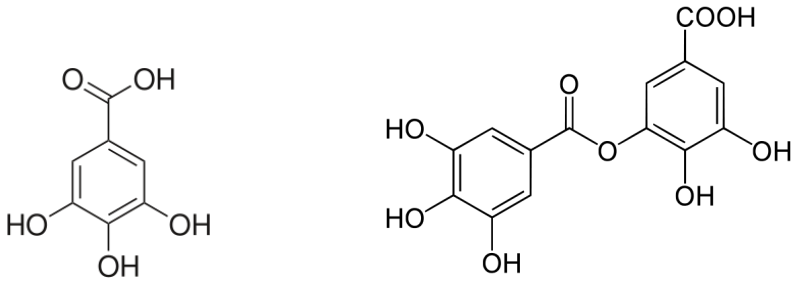
1.2.4. Trjeslovine ili tanini

1.2.4.1. Kemijska struktura i značajke

Trjeslovine su vrlo heterogena skupina polifenolnih spojeva, srednje do velike molekulske mase, koji su, u većoj ili manjoj količini, prisutni u gotovo svim biljnim vrstama. Riječ je o visoko hidroksiliranim molekulama, a mogu stvarati netopljive komplekse s ugljikohidratima i proteinima. Ova reakcija trjeslovina zaslužna je za adstringentno djelovanje hrane bogate trjeslovinama jer dolazi do precipitacije s proteinima iz sline. Daju taloge sa želatinom, teškim metalima i većinom alkaloida (osim morfina) te obojenja s feri solima. Prema strukturi se mogu podijeliti u dvije skupine: trjeslovine koje hidroliziraju i kondenzirane trjeslovine (Kalođera, 2010; Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008; Bravo, 1998).

Trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini i elagtanini)

Trjeslovine koje hidroliziraju obuhvaćaju dvije podskupine: tanine i depside. Tanini su esteri fenolnih kiselina s glukozom, najčešće esteri galne kiseline (galotanini). Najjednostavniji galotanin je glukogalin (1-galoil-β-glukoza). Depsidi su esterski vezane fenilkarbonske kiseline. U njih, umjesto galoilnog ostatka, dolazi depsidni digaloilni ostatak. Kao što samo ime kazuje, ta skupina trjeslovina lako hidrolizira u kiselom i lužnatom mediju, vrućoj vodi ili djelovanjem enzima, pri čemu nastaju polialkoholi i fenilkarboksilna kiselina (Kuštrak, 2005; Jurišić, 2003; Bravo, 1998).

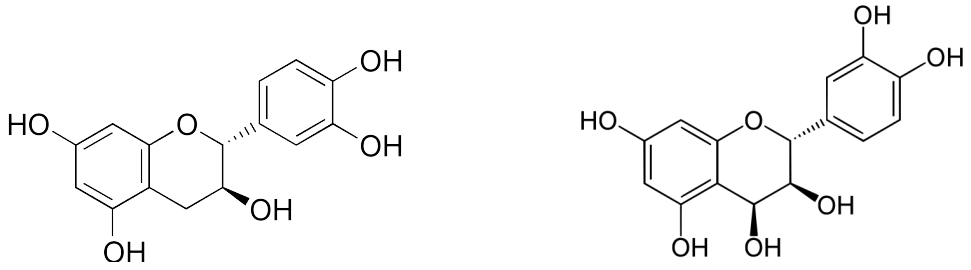


Slika 5. Galna kiselina (lijevo) i m-digalna kiselina (desno).

Kondenzirane trjeslovine (katehinske trjeslovine)

Kondenzirane trjeslovine su polimerni spojevi kojima je osnovna građevna jedinica katehin (katehinske trjeslovine) ili leukoantocijanidin. U slabo kiselom mediju staničnog soka, enzimatskim ili neenzimatskim procesima, odvija se polimerizacija katehina ili leukoantocijanidina, pri čemu nastaju visokomolekularni spojevi topljivi u vodi (katehinske

trjeslovine). Jedan se dio katehinskih trjeslovina nadalje polimerizira tijekom skladištenja i prelazi u trjeslovinsko crvenilo ili flobafene – netopljive i nedjelatne spojeve (Kuštrak, 2005; Jurišić, 2003).



Slika 6. Katehin (lijevo) i leukocijanidin (predstavnik leukoantocijanidina, desno).

1.2.4.2. Rasprostranjenost

Trjeslovine su u biljnom svijetu vrlo rasprostranjene. Sadrže ih već zelene alge, ali rijetko se pojavljuju u gljivama. Jednosupnice su siromašne trjeslovinama, a u dvosupnica postoje trjeslovinama bogate i trjeslovinama siromašne biljne porodice (Kuštrak, 2005). Biljne vrste iz porodica *Brassicaceae* i *Papaveraceae*, primjerice, ne sadrže trjeslovine, dok su porodice Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Burseraceae, Combretaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae (od dvosupnica), te Najadaceae i Typhaceae (od jednosupnica) bogate trjeslovinama (Mole, 1993).

Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene po dijelovima biljke, a najviše ih sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi i konačno plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine *Gallae* ili šiške. Riječ je o okruglastim izraslinama koje se razvijaju u mladim lisnim pupoljcima maloazijskog hrasta (*Quercus infectoria*) ili kineskog ruja (*Rhus semialata* i druge vrste roda *Rhus*) nakon uboda ose šiškarice (azijski hrast), odnosno jedne vrste lisnih uši (kineski ruj), a mogu sadržavati do 75% trjeslovina. Iz jajašca kojega je osa ili lisna uš odložila u lisnom pupoljku razvija se ličinka, a biljka zbog podražaja životinjskog organizma razvija posebne tvari koje obavijaju ličinku i istodobno služe kao stan i hrana. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, trjeslovine u većoj količini dolaze u mlađim dijelovima biljke (Kalođera, 2010; Kuštrak, 2005).

Smatra se da je voće, pogotovo bobičasto, glavni izvor kondenziranih trjeslovina u ljudskoj prehrani, dok ih povrće u pravilu sadrži u manjoj količini. Mahunarke, orašasto voće i neke pseudožitarice poput ječma također sadrže kondenzirane trjeslovine, za razliku od glavnih prehrambenih žitarica, poput kukuruza, riže i pšenice, koje ih ne sadrže. Vino, pivo i neki voćni

sokovi dobri su izvori kondenziranih trjeslovina, dok kava to nije. Bobičasto voće, mahunarke i zeleno lisnato povrće, glavni su izvori trjeslovina koje hidroliziraju. Primijećeno je znatno smanjenje sadržaja trjeslovina u hrani ovisno o uvjetima skladištenja i termalnoj obradi (Serrano i sur., 2009).

1.2.4.3. Djelovanje i upotreba

Fiziološko značenje trjeslovina prilično je nejasno. Smatralo se da njihov gorki i trpki okus štiti biljku od štetočina, no to se kasnije pokazalo netočnim. Pretpostavka da su trjeslovine pričuvne tvari također se pokazala neispravnom, jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvnih tvari (Jurišić, 2003). Zbog sposobnosti reagiranja s proteinima i gašenja enzimske aktivnosti, biljni ekstrakti s visokim sadržajem tanina koristili su se od davnina u kožarskoj industriji za obradu sirovog krzna i kože kako bi se spriječilo njihovo propadanje.

Medicinska primjena trjeslovina zasniva se na njihovim adstringirajućim svojstvima. Imaju širok spektar djelovanja te djeluju antisekretorički i antiperistaltički, antibakterijski (posebno na gram-negativne bakterije) i antivirusno, zatim antiflogistički, antieksudativno, antialergijski i antioksidativno. Galotanini djeluju antitumorski, a i galotanini, i proantocijanidini sprječavaju stvaranje naslaga na zubima te time i stvaranje karijesa. Trjeslovine se rabe za rane, opekline, ozebline, hemoroide, zatim anginu, gingivitis i stomatitis. Trjeslovinski pripravci također se rabe protiv katara želuca i crijeva, gastritisa i proljeva gdje specifično djeluju na bakterijske toksine. Trjeslovine se primjenjuju i kao protuotrov pri trovanju alkaloidima i teškim metalima (Kuštrak, 2005).

Kao i ostali polifenolni spojevi, trjeslovine također pokazuju antioksidativni učinak hvatanjem slobodnih radikala, keliranjem metala u tragovima te taloženjem proteina i gašenjem njihove enzimske aktivnosti. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala raste s porastom broja galoilnih skupina, molekulske mase trjeslovina i prisutnošću *o*-dihidroksi strukture, što ukazuje na to da su hidroksilne skupine zaslužne za sposobnost hvatanja slobodnih radikala i kelirajuća svojstva tih spojeva.

Uz to što dijele antioksidativno djelovanje s ostalim polifenolima, novija istraživanja ukazuju i na vjerojatnost da trjeslovine poboljšavaju unos glukoze i inhibiraju stvaranje masnog tkiva, što ih čini potencijalnim lijekovima za liječenje šećerne bolesti neovisne o inzulinu (šećerna bolest tipa 2) (Pereira i sur., 2009; Serrano i sur., 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Porodica Lamiaceae obiluje biljnim vrstama koje predstavljaju raznolik i bogat izvor polifenolnih spojeva. Među njima se ističu mnoge nedovoljno istražene endemične i subendemične vrste. Cilj ovoga diplomskog rada bila je fitokemijska karakterizacija makedonske endemične vrste *Micromeria kosaninii* Šilić, s obzirom na sastav fenolnih kiselina, flavonoida, ukupnih polifenola i trjeslovina.

Kvalitativna analiza fenolnih kiselina i flavonoida provedena je tankoslojnom kromatografijom, a ukupnih polifenola i trjeslovina općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga.

Kvantitativna analiza polifenolnih spojeva provedena je spektrofotometrijskim metodama: fenolne kiseline nakon reakcije s nitrit-molibdat reagensom (505 nm i 525 nm), flavonoidi mjerenjem apsorbancije kompleksa dobivenih u reakciji flavonoidnih aglikona s Al^{3+} i (425 nm), a ukupni polifenoli i trjeslovine metodom koja se temelji na reakciji polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (720 nm), kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom.

Rezultati fitokemijske analize polifenolnih spojeva dobiveni u okviru ovog diplomskog rada predstavljaju osnovu za daljnja istraživanja biološke aktivnosti i fitokemijskog potencijala vrste *Micromeria kosaninii* te pridonose dosadašnjim istraživanjima roda *Micromeria* i slabo istraženih endemičnih biljnih vrsta.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal prikupljen je u srpnju 2012. u Makedoniji, na lokalitetu Pletvar kod Prilepa.

Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Šilić, 1979).

Analizirani su pulverizirani nadzemni dijelovi (listovi, stabljike i cvjetovi) biljne vrste *Micromeria kosaninii* Šilić.

Slika 7. *Micromeria kosaninii* Šilić (Shuka i Tan, 2013).

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura i pribor

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453E (Hewlett Packard, Njemačka); kiveta 1 cm;
- TLC ploče s tankim slojem Kieselgela 60 F_{254}, kromatografske komore i kapilare; ultraljubičasta lampa (UPV Upland U.S.A., UVGL-58);
- pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, epruvete, kapalice, satna stakla, filtar papir, povratna hladila, lijevci i stalci za odjeljivanje, odmjerne tikvice, Erlenmayerove tikvice, tikvice s okruglim dnom, plamenik, tronožac, vodena kupelj, kleme.

Kemikalije

- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska);
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- etanol (Carlo-Erba, Rodano, Italija);
- etil acetat (Carlo-Erba, Rodano);
- Folin-Ciocalteuov fenolni reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka);
- formaldehid (Kemika, Zagreb);
- heksametilentetramin (Zorla, Šabac, Srbija);
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb);
- kazein (Merck, Darmstadt);
- klorovodična kiselina, konc. (Carlo-Erba, Rodano);
- metanol (Carlo-Erba, Rodano);
- mravlja kiselina (TTT, Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- natrijev acetat trihidrat (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- natrijev citrat (Gradska ljekarna Zagreb, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države),
- natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Zagreb);
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb);
- natrijev nitrit (Gram-Mol, Zagreb);
- Naturstoff reagens (NST) (Fluka, Buchs, Švicarska);
- octena kiselina, led. (Kemika, Zagreb);
- olovov acetat (Kiedel-de Haën ag. Seelze - Hanover, Njemačka);
- Polietilenglikol 4000 (PEG) (Fluka, Buchs);
- Poredbene tvari za TLC (Roth, Karlsruhe, Njemačka);
- vanilin (Kemika, Zagreb);
- želatina (Sigma-Aldrich, St. Louis);
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje);
- željezov(III) klorid (Kemika, Zagreb).

3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina

3.3.1.1. Tankoslojna kromatografija flavonoida i fenolnih kiselina

Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina provedena je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC).

Biljni uzorci priprave se pojedinačnom ekstrakcijom 0,1 g praškaste droge (list, stabljika, cvijet) s po 2 mL metanola, tijekom 10 minuta na vodenoj kupelji zagrijanoj na 60 ºC. Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina provede se na tankom sloju Kieselgela 60 F_{254}, uz dva različita razvijača:

a) etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*) i
b) etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*).

Nakon razvijanja, kromatogrami se poprskaju Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom Polietilenglikola 4000 (NST/PEG) te promatraju pod UV svjetlom valne duljine 365 nm. NST se priprema otapanjem 1 g β-etilaminoestera difenilborne kiseline u 100 mL metanola (Wagner i sur., 1983).

Za dobivanje referentnih kromatograma pripreme se metanolne otopine standarda (1 mg/mL) i to flavonoida naringenina, naringina, kvercetina, rutina, kvercitrina, izokvercitrina, te fenolnih kiselina: ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske kiseline.

3.3.2. Kvalitativna analiza polifenola i trjeslovina

3.3.2.1. Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

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

Opće reakcije

Reakcija promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge.

3.3.2.2. Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

0,2 g pulveriziranog biljnog materijala 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 2 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 koncentriranoj 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 fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* provedena je spektrofotometrijskim metodama koje propisuje Europska farmakopeja, i to u monografiji Rosmarini folium (EDQM, 2018), gdje je sadržaj izražen kao ružmarinska kiselina, te monografiji Fraxini folium (EDQM, 2018), gdje je sadržaj izražen kao klorogenska kiselina.

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u uzorcima vrste *Micromeria kosaninii* provedena je niže opisanim postupkom.

Ekstrakt. 0,200 g praškasto usitnjene biljne droge ekstrahira se s 80 mL 50%-tnog etanola (V/V) i zagrijava u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 min. Nakon hlađenja i filtriranja, filtrat se nadopuni 50%-tnim etanolom do 100,0 mL u odmjernoj tikvici (osnovna otopina).

Ispitivana otopina 1,0 mL osnovne otopine pomiješa se s 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 2,0 mL otopine nitrit-molibdat reagensa (10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata otopi se u 100,0 mL destilirane vode) te 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica se nadopuni destiliranom vodom do 10,0 mL u odmjernoj tikvici.

Kompenzacijska otopina 1,0 mL osnovne otopine razrijedi se destiliranom vodom do 10,0 mL u odmjernoj tikvici.

Apsorbancija dobivenih otopina odmah se izmjeri na 505 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračuna se i izrazi kao ružmarinska kiselina prema izrazu:

$$\%\ fenolnih\ kiselina = \frac{A \times 2{,}5}{m}$$

A – izmjerena apsorbancija na 505 nm

m – masa droge izražena u gramima

Specifična apsorbancija ($A^{1\%}_{1cm}$) ružmarinske kiseline pri 505 nm iznosi 400.

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao klorogenska kiselina

Ispitivana otopina pripremi se na isti način kao i za određivanje hidroksicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina. Apsorbancija dobivenih otopina odmah se izmjeri na 525 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračuna se i izrazi kao klorogenska kiselina prema sljedećem izrazu:

$$\%\ fenolnih\ kiselina = \frac{A \times 5{,}3}{m}$$

A – izmjerena apsorbancija na 525 nm

m – masa droge izražena u gramima

Specifična apsorbancija ($A^{1\%}_{1cm}$) klorogenske kiseline pri 525 nm iznosi 188.

3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (1960), prema niže opisanom postupku.

Postupak:

U prah usitnjeni listovi lovora (0,2 g) ekstrahirani su 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 još 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 25,0 mL. U svaku je tikvicu dodano 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijeva citrata. U jednu tikvicu dodano je još 2,0 mL otopine aluminijeva klorida (2 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno je u 100,0 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 sljedećem izrazu:

$$\%\, flavonoida = \frac{A \times 0{,}772}{m}$$

A = apsorbancija na 425 nm; m = masa droge izražena u gramima

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih polifenola (UPF) i trjeslovina (T) u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* 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 min. Nakon hlađenja, iscrpina se profiltrira u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopuni do oznake 30%-tnim metanolom.

Otopina 1 (O1). 2,0 mL filtrata pomiješa se s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline nadopuni se destiliranom vodom do 100,0 mL; pH = 5, optimalno za taloženje trjeslovina).

Otopina 2 (O2). 10,0 mL *O1* mućka se s 50 mg kazeina na mućkalici 45 min i profiltrira.

Po 1,0 mL *O1* i *O2* pomiješa se odvojeno u odmjernim tikvicama od 10,0 mL s po 0,5 mL Folin-Ciocalteuova fenolnog reagensa (FCR) i nadopuni do oznake 33%-tnom otopinom natrijeva karbonata dekahidrata (FCR sadrži Na-volframat, Na-molibdat, dest. H_2O, 85%-tnu H_3PO_4, 36%-tnu HCl, Li_2SO_4 i Br_2). Apsorbancije dobivenih plavih otopina izmjere se na 720 nm, uz dest. H_2O kao slijepi pokus. Vrijednost koju daje *O1* odgovara količini UPF, dok razlika vrijednosti dobivenih za *O1* i *O2* predstavlja količinu T vezanih na kazein. Za izračunavanje koncentracije T izrađen je kalibracijski 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, *OOS*). Radni standard (*RS*) pripremljen je miješanjem 5,0 mL *OOS* i 5,0 mL puferske otopine. Koncentracijski niz, dobiven razrjeđivanjem volumena od 0,2 do 1,2 mL *RS*-a do 10,0 mL puferskom otopinom (koncentracija trjeslovina od 0,001 do 0,006 mg/mL), daje linearni porast apsorbancije. Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *O1* i *O2* izračunaju se pripadajuće koncentracije iz kalibracijskog pravca i izraze kao grami UPF, odnosno T, na 100 g droge (%). Razlika %UPF (dobiven mjerenjem *O1*), i % određenog za *O2*, predstavlja %T koje su istaložene kazeinom.

Odnosno, za izražavanje %UPF, odnosno %T, vrijedi sljedeći izraz:

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

A = izmjerena apsorbancija *O1* (%UPF), odnosno razlika apsorbancija *O1* i *O2* (%T)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati kvalitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina

4.1.1. Rezultati tankoslojne kromatografije flavonoida i fenolnih kiselina

Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* provedena je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC).
Na tanki sloj Kieselgela 60 F_{254} naneseni su metanolni ekstrakti droge te standardne otopine flavonoida (naringenin, naringin, kvercetin, rutin, kvercitrin, izokvercitrin) i fenolnih kiselina (ferulična, kavena, klorogenska i ružmarinska kiselina). Kromatogrami su razvijeni korištenjem dviju različitih mobilnih faza:

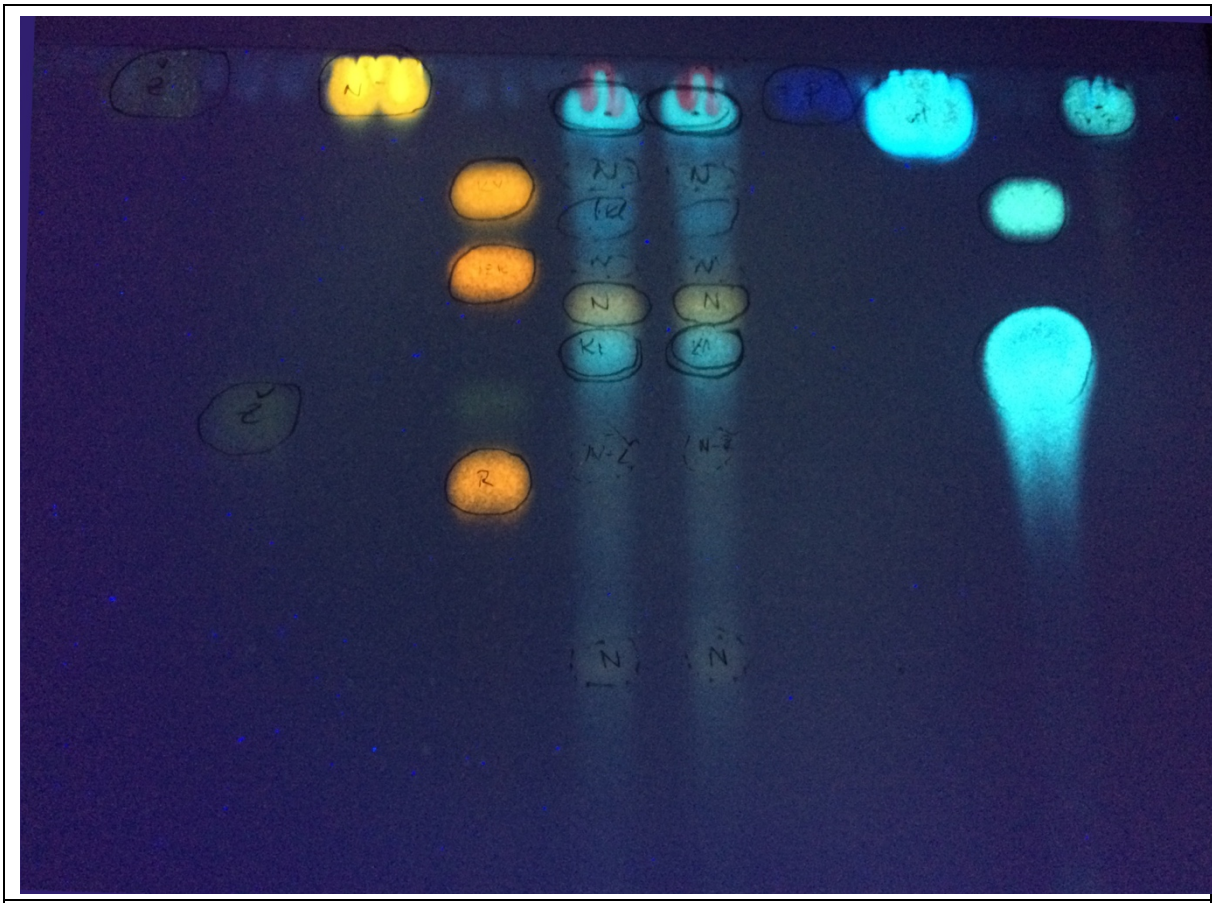
MF1: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*);

MF2: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*).

Detekcija je provedena prskanjem ploča Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom Polietilenglikola 4000 (NST/PEG), nakon čega su kromatogrami vizualizirani pod UV svjetlom valne duljine 365 nm.

Na kromatogramima su uočene žute i narančaste fluorescirajuće zone karakteristične za flavonoide te plavozelene fluorescirajuće zone karakteristične za fenolne kiseline. Bolje razlučivanje postignuto je upotrebom **MF1**, gdje su se metanolni ekstrakti droge razdijelili u osam različitih zona, dok su se upotrebom **MF2** razdijelili u četiri različiti zone.

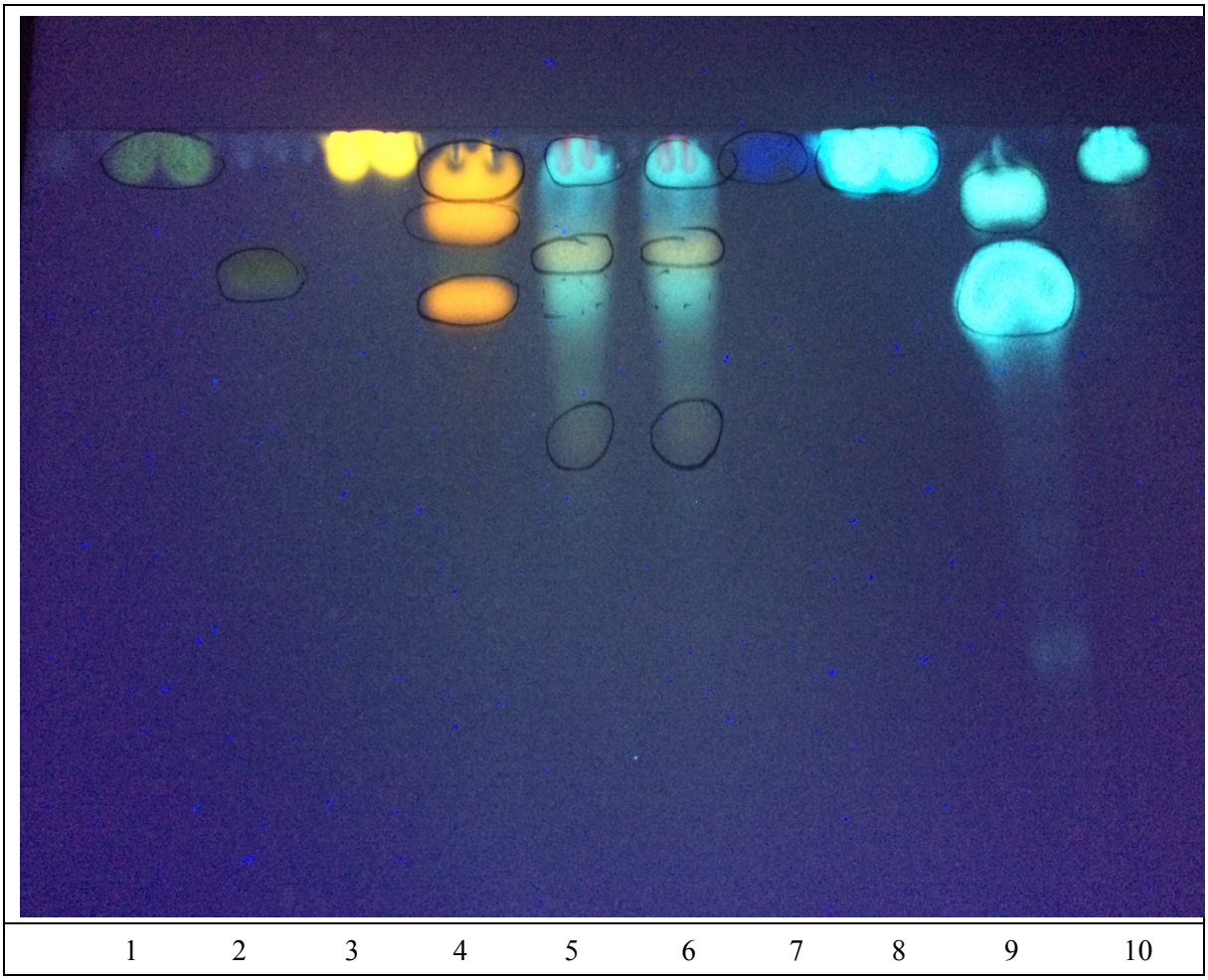
Iz dobivenog kromatograma, na temelju R_f vrijednosti i boja razvijenih kromatografskih zona, može se zaključiti da metanolni ekstrakt nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* sadrži naringin, kvercitrin, izokvercitrin, zatim klorogensku, izoklorogensku te kavenu i/ili ružmarinsku kiselinu. Za preciznije zaključke o prisutnosti kavene i ružmarinske kiseline u ispitivanom biljnom uzorku trebalo bi ponavljati TLC analizu variranjem sastava mobilnih faza do odjeljivanja/postizanja različitih R_f vrijednosti spomenutih fenolnih kiselina.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Slika 8. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* u razvijaču **MF1**: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*); Stacionarna faza: Kieselgel 60 F_{254}; Detekcija: NST/PEG reagens i UV-365 nm.

Legenda: 1 – naringenin, 2 – naringin, 3 – kvercetin, 4 – smjesa rutina, kvercitrina i izokvercitrina, 5 – metanolni ekstrakt droge, 6 – metanolni ekstrakt droge, 7 – ferulična kiselina, 8 – kavena kiselina, 9 – smjesa klorogenske i izoklorogenske kiseline, 10 – ružmarinska kiselina.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Slika 9. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* u razvijaču **MF2**: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*); Stacionarna faza: Kieselgel 60 F_{254}; Detekcija: NST/PEG reagens i UV-365 nm.

Legenda: 1 – naringenin, 2 – naringin, 3 – kvercetin, 4 – smjesa rutina, kvercitrina i izokvercitrina, 5 – metanolni ekstrakt droge, 6 – metanolni ekstrakt droge, 7 – ferulična kiselina, 8 – kavena kiselina, 9 – smjesa klorogenske i izoklorogenske kiseline, 10 – ružmarinska kiselina.

4.2. Rezultati kvalitativne analize polifenola i trjeslovina

4.2.1. Rezultati reakcija dokazivanja polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

4.2.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja polifenola

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

Dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt fino usitnjenih nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* nastalo je vrlo intenzivno narančastosmeđe obojenje.

4.2.2. Rezultati reakcija dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

4.2.2.1. 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 ispitivane biljne droge nastalo je vrlo intenzivno zelenoplavo obojenje.

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

Dodatkom 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata u vodeni ekstrakt ispitivane biljne droge nastalo je vrlo intenzivno zelenoplavo obojenje.

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

Dodatkom 10%-tne otopine olovova acetata u vodeni ekstrakt ispitivane biljne droge nastalo je vrlo intenzivno žutosmeđe zamućenje, koje se istaložilo i ostala je bistra otopina iznad taloga.

4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

Dodatkom 1%-tne otopine želatine u vodeni ekstrakt ispitivane biljne droge nastalo je slabo žuto zamućenje.

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

Dodatkom 1%-tne otopine vanilina u konc. klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt ispitivane biljne droge nastalo je umjereno narančastocrveno obojenje.

4.2.2.2. Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina

Nakon dodatka formaldehida i 10%-tne klorovodične kiseline u vodeni ekstrakt droge, sadržaj je ugrijan do vrenja, ohlađen te profiltriran. Filtar papir je ispran toplom vodom. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filtar papiru koji je netopljiv u toploj 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

U vodenom ekstraktu vrste *Micromeria kosaninii* nije dokazana prisutnost kondenziranih trjeslovina jer u reakciji nije nastao netopljivi talog na filtar papiru.

4.2.2.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu koji se dobije u reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom, doda se natrijev acetat trihidrat (bez protresivanja epruvete), a zatim 1%-tna otopina željezova(III) amonijeva sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju, javlja se ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

U vodenom ekstraktu vrste *Micromeria kosaninii* dokazana je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju jer je nastao jasno vidljiv ljubičasti prsten.

4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* provedena je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja u monografijama a) Rosmarini folium i b) Fraxini folium (EDQM, 2018).
Određivanje fenolnih kiselina temelji se na prisutnosti *o*-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata koji s nitrit-molibdat reagensom daju žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine žuta boja prelazi u narančastocrvenu (Vladimir-Knežević, 2008).

Pripravljena su dva ekstrakta ispitivane biljne droge te su uzeti uzorci za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina. Apsorbancija je izmjerena tri puta za svaki ekstrakt na:

a) 505 nm (prema metodi za ružmarinsku kis.) i 495 nm (apsorpcijski maksimum);
b) 525 nm (prema metodi za klorogensku kis).

Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata izražen kao ružmarinska kiselina izračunat je iz izraza:

$$\%\ fenolnih\ kiselina = \frac{A \times 2{,}5}{m}$$

A – izmjerena apsorbancija na 505 nm; m – masa droge izražena u gramima; specifična apsorbancija ružmarinske kiseline pri 505 nm iznosi 400.

Maseni udio fenolnih kiselina izražen kao klorogenska kiselina izračunat je prema izrazu:

$$\%\ fenolnih\ kiselina = \frac{A \times 5{,}3}{m}$$

A – izmjerena apsorbancija na 525 nm; m – masa droge izražena u gramima; specifična apsorbancija klorogenske kiseline pri 525 nm iznosi 188.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina vrste *Micromeria kosaninii* prikazani su u Tablicama 3-5.

Tablica 3. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 505 nm (prema metodi), izraženo kao ružmarinska kiselina.

	Masa uzorka (g)	**A_{505nm} otopine**	**Srednja vrijednost A_{505nm} ± SD**	**% fenolnih kiselina (FK)**	**Srednja vrijednost % FK ± SD**	**Srednja vrijednost % FK ± SD**
ekstrakt 1	0,2001	0,334	0,329 ± 0,004	4,17	4,11 ± 0,05	4,30 ± 0,21
		0,326		4,07		
		0,327		4,09		
ekstrakt 2	0,2000	0,360	0,359 ± 0,001	4,50	4,49 ± 0,01	
		0,358		4,48		
		0,359		4,49		

Tablica 4. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 495 nm (apsorpcijski maksimum), izraženo kao ružmarinska kiselina.

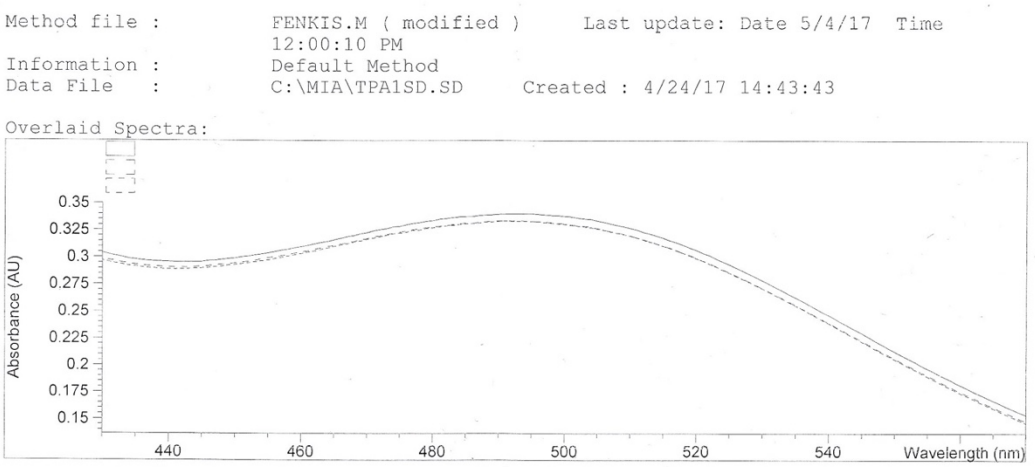
	Masa uzorka (g)	**A_{495nm} otopine**	**Srednja vrijednost A_{495nm} ± SD**	**% fenolnih kiselina (FK)**	**Srednja vrijednost % FK ± SD**	**Srednja vrijednost % FK ± SD**
ekstrakt 1	0,2001	0,340	0,335 ± 0,004	4,25	4,19 ± 0,05	4,39 ± 0,22
		0,333		4,16		
		0,333		4,16		
ekstrakt 2	0,2000	0,368	0,367 ± 0,001	4,60	4,59 ± 0,01	
		0,366		4,58		
		0,366		4,58		

Tablica 5. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 525 nm, izraženo kao klorogenska kiselina.

	Masa uzorka (g)	**A_{525nm} otopine**	**Srednja vrijednost A_{525nm} ± SD**	**% fenolnih kiselina (FK)**	**Srednja vrijednost % FK ± SD**	**Srednja vrijednost % FK ± SD**
ekstrakt 1	0,2001	0,293	0,288 ± 0,004	7,76	7,64 ± 0,10	7,97 ± 0,37
		0,286		7,58		
		0,286		7,58		
ekstrakt 2	0,2000	0,314	0,313 ± 0,001	8,32	8,30 ± 0,02	
		0,313		8,29		
		0,313		8,29		

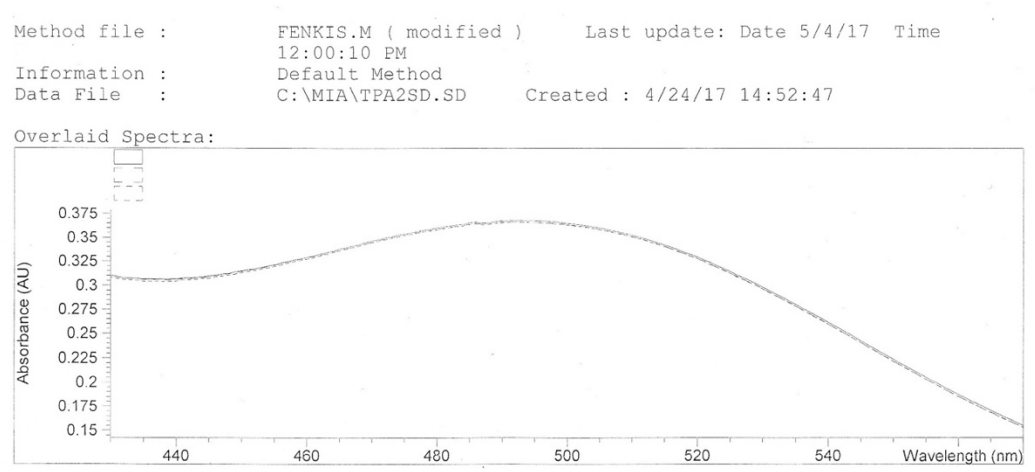
Sadržaj fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* iznosio je 4,30±0,21% (505 nm) te 4,39±0,22% (495 nm), izraženo kao ružmarinska kiselina, odnosno 7,97±0,37% (525 nm), izraženo kao klorogenska kiselina.

Primjere dobivenih UV spektara za fenolne kiseline u analiziranim uzorcima vrste *Micromeria kosaninii* prikazuje Slika 10.



#	Name	Abs<495nm>	Abs<505nm>	Abs<525nm>
1		0.34019	0.33352	0.29335
2		0.33300	0.32616	0.28571
3		0.33314	0.32660	0.28601

a) ekstrakt 1



#	Name	Abs<495nm>	Abs<505nm>	Abs<525nm>
1		0.36769	0.36014	0.31440
2		0.36601	0.35808	0.31252
3		0.36591	0.35887	0.31282

b) ekstrakt 2

Slika 10. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina a) ekstrakta 1 i b) ekstrakta 2 nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić.

4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (1960). Određivanje se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+}. Stvaranju kompleksa prethodi oslobađanje aglikona iz flavonoidnih heterozida kiselom hidrolizom.
Apsorbancije otopina s aluminijevim kloridom mjere se na 425 nm. Kao slijepi pokus koriste se prethodno pripremljene otopine bez aluminijeva klorida. Sadržaj flavonoida, izražen kao kvercetin, izračuna se prema izrazu:

$$\%\, flavonoida = \frac{A \times 0{,}772}{m}$$

A = apsorbancija na 425 nm; m = masa droge u gramima

Pripravljena su dva ekstrakta ispitivane biljne droge te su uzeti uzorci za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Apsorbancija je izmjerena tri puta za svaki ekstrakt na 425 nm (prema metodi) i na 421 nm (apsorpcijski maksimum).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida vrste *Micromeria kosaninii* prikazani su Tablicama 6 i 7.

Tablica 6. Sadržaj flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 425 nm (prema metodi).

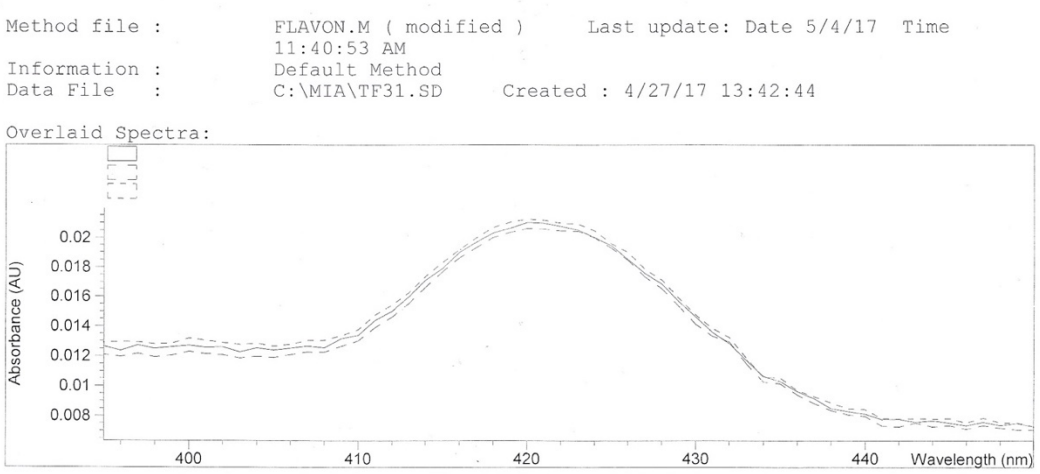
	Masa uzorka (g)	**A_{425nm} otopine**	**Srednja vrijednost A_{425nm} ± SD**	**% flavonoida (%F)**	**Srednja vrijednost % F ± SD**	**Srednja vrijednost % F ± SD**
ekstrakt 1	0,2000	0,019	0,019 ± 0,001	0,07	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
		0,020		0,08		
		0,019		0,07		
ekstrakt 2	0,2003	0,017	0,016 ± 0,001	0,07	0,06 ± 0,01	
		0,016		0,06		
		0,016		0,06		

Tablica 7. Sadržaj flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 421 nm (apsorpcijski maksimum).

	Masa uzorka (g)	**A_{421nm} otopine**	**Srednja vrijednost A_{421nm} ± SD**	**% flavonoida (%F)**	**Srednja vrijednost % F ± SD**	**Srednja vrijednost % F ± SD**
ekstrakt 1	0,2000	0,021	0,021 ± 0,000	0,08	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01
		0,021		0,08		
		0,021		0,08		
ekstrakt 2	0,2003	0,018	0,017 ± 0,001	0,07	0,07 ± 0,00	
		0,017		0,07		
		0,017		0,07		

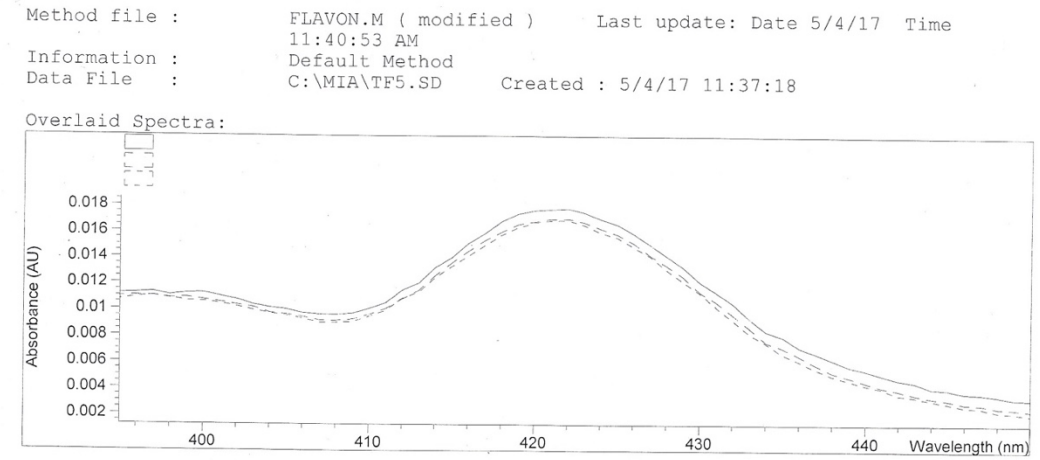
Sadržaj flavonoida u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* iznosio je 0,07±0,01% (425 nm) te 0,08±0,01% (421 nm).

Primjere dobivenih UV spektara za flavonoide u analiziranim uzorcima vrste *Micromeria kosaninii* prikazuje Slika 11.



#	Name	Abs<425nm>	Abs<421nm>
1		1.9464E-2	2.0979E-2
2		1.9303E-2	2.0607E-2
3		1.9581E-2	2.1199E-2

a) ekstrakt 1



#	Name	Abs<425nm>	Abs<421nm>
1		1.6561E-2	1.7745E-2
2		1.5823E-2	1.6985E-2
3		1.5586E-2	1.6869E-2

b) ekstrakt 2

Slika 11. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida a) ekstrakta 1 i b) ekstrakta 2 nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić.

4.5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja polifenola i trjeslovina

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (1976). Određivanje ukupnih polifenola temelji se na reakciji s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR) pri čemu nastaje plavo obojenje. Određivanje trjeslovina temelji se na prethodnom taloženju trjeslovina kazeinom, a udio se izračunava iz razlike apsorbancija dobivenih za ukupne polifenole (UPF) i apsorbancija otopina s polifenolima koji nisu istaloženi kazeinom.

Nakon dodatka FCR, izmjerene su apsorbancije dobivenih plavih otopina na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepi pokus.

Za izračunavanje %UPF i %T prethodno je izrađen kalibracijski pravac, mjerenjem apsorbancija koncentracijskog niza poredbenih otopina taninske kiseline.

Za izmjerene apsorbancije *otopine 1* (*O1*, odgovara sadržaju UPF) i *otopine 2* (*O2*, odgovara sadržaju polifenola koji se ne talože kazeinom), iz kalibracijskog je pravca izražena koncentracija kao grami ukupnih polifenola (UPF), odnosno trjeslovina (T), na 100 g droge (%UPF, odnosno %T), pri čemu vrijedi izraz:

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

A = izmjerena apsorbancija *O1* (%UPF), odnosno razlika apsorbancija *O1* i *O2* (%T)

Sadržaj trjeslovina istaloženih kazeinom (%T) predstavlja razlika sadržaja ukupnih polifenola (%UPF), dobivenog mjerenjem *O1*, i sadržaja (%) polifenola koji nisu istaloženi kazeinom, dobivenog mjerenjem *O2*.

Pripravljena su dva ekstrakta biljne droge te su uzeti uzorci za spektrofotometrijsko određivanje UPF i T. Apsorbancija je izmjerena tri puta za svaku otopinu na 720 nm (prema metodi) i na 750 nm (apsorpcijski maksimum).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina vrste *Micromeria kosaninii* prikazani su u Tablicama 8-11.

Tablica 8. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 720 nm (prema metodi).

	Masa uzorka (g)	**Ukupni polifenoli (UPF)**		**Sadržaj ukupnih polifenola (%UPF)**		
		A_{720nm} otopine 1 *(O1)*	**Srednja vrijednost A_{720nm} *O1* ± SD**	**%**	**Srednja vrijednost %UPF ± SD**	**Srednja vrijednost %UPF ± SD**
ekstrakt 1	0,2501	0,214	0,213 ± 0,001	8,56	8,51 ± 0,05	8,62 ± 0,13
		0,212		8,48		
		0,212		8,48		
ekstrakt 2	0,2502	0,218	0,218 ± 0,001	8,72	8,73 ± 0,02	
		0,218		8,72		
		0,219		8,76		

Tablica 9. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 750 nm (apsorpcijski maksimum).

	Masa uzorka (g)	**Ukupni polifenoli (UPF)**		**Sadržaj ukupnih polifenola (%UPF)**		
		A_{750nm} otopine 1 *(O1)*	**Srednja vrijednost A_{750nm} *O1* ± SD**	**%**	**Srednja vrijednost %UPF ± SD**	**Srednja vrijednost %UPF ± SD**
ekstrakt 1	0,2501	0,218	0,217 ± 0,001	8,72	8,68 ± 0,04	8,80 ± 0,13
		0,217		8,68		
		0,216		8,64		
ekstrakt 2	0,2502	0,223	0,223 ± 0,000	8,92	8,92 ± 0,00	
		0,223		8,92		
		0,223		8,92		

Sadržaj ukupnih polifenola u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* iznosio je 8,62±0,13% (720 nm) te 8,80±0,13% (750 nm).

Tablica 10. Sadržaj trjeslovina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 720 nm (prema metodi).

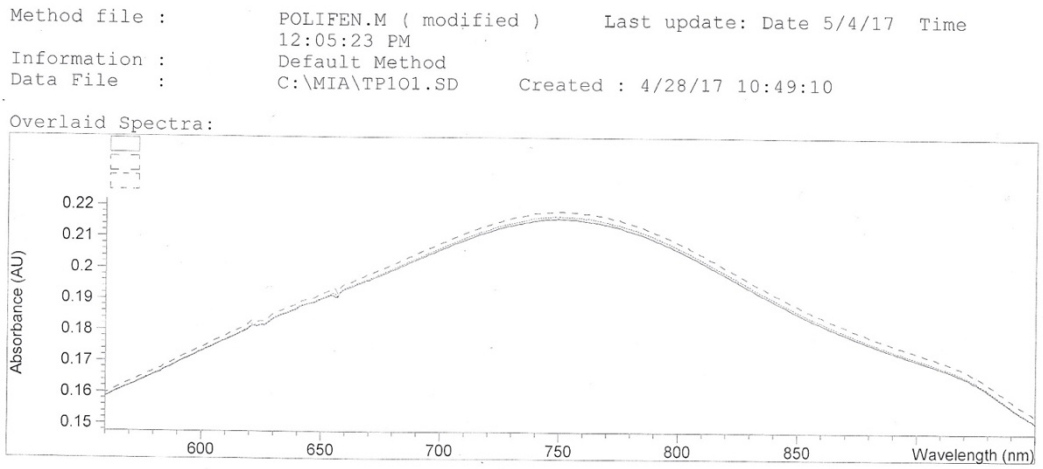
	Polifenoli nevezani na kazein		**Trjeslovine vezane na kazein**		**Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein (%T)**		
	A_{720nm} otopine 2 *(O2)*	**Srednja vrijednost A_{720nm} ± SD**	**A1 – A2**	**Srednja vrijednost (A1-A2) ± SD**	**%T**	**Srednja vrijednost %T ± SD**	**Srednja vrijednost %T ± SD**
ekstrakt 1	0,142	0,140 ± 0,002	0,072	0,072 ± 0,001	2,88	2,89 ± 0,02	2,76 ± 0,15
	0,140		0,072		2,88		
	0,139		0,073		2,92		
ekstrakt 2	0,153	0,153 ± 0,001	0,065	0,066 ± 0,001	2,60	2,63 ± 0,02	
	0,152		0,066		2,64		
	0,153		0,066		2,64		

Tablica 11. Sadržaj trjeslovina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria kosaninii* Šilić pri valnoj duljini 750 nm (apsorpcijski maksimum).

	Polifenoli nevezani na kazein		**Trjeslovine vezane na kazein**		**Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein (%T)**		
	A_{750nm} otopine 2 *(O2)*	**Srednja vrijednost A_{750nm} ± SD**	**A1 – A2**	**Srednja vrijednost (A1-A2) ± SD**	**%T**	**Srednja vrijednost %T ± SD**	**Srednja vrijednost %T ± SD**
ekstrakt 1	0,145	0,143 ± 0,002	0,073	0,074 ± 0,001	2,92	2,95 ± 0,02	2,83 ± 0,13
	0,143		0,074		2,96		
	0,142		0,074		2,96		
ekstrakt 2	0,155	0,155 ± 0,001	0,068	0,068 ± 0,001	2,72	2,71 ± 0,02	
	0,155		0,068		2,72		
	0,156		0,067		2,68		

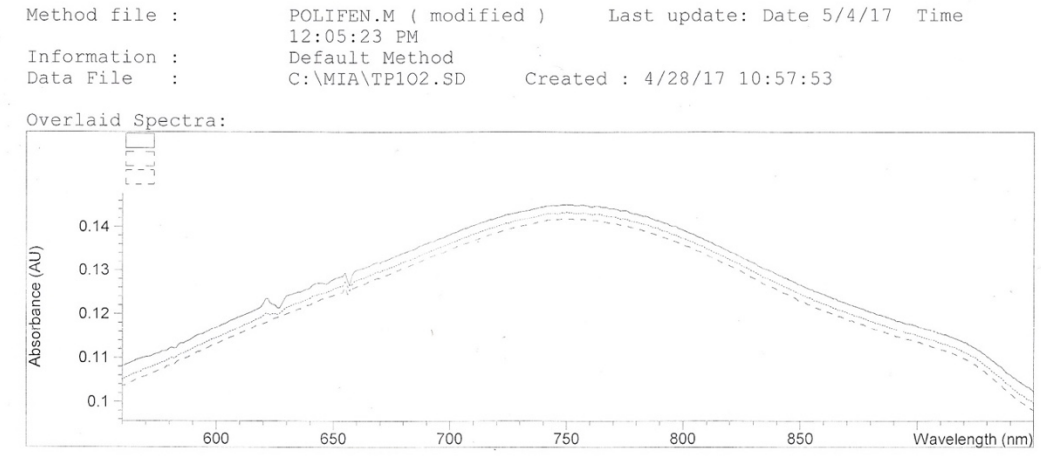
Sadržaj trjeslovina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* iznosio je 2,76±0,15% (720 nm), odnosno 2,83±0,13% (750 nm).

Primjere dobivenih UV spektara za ukupne polifenole i trjeslovine u analiziranim uzorcima vrste *Micromeria kosaninii* prikazuje Slika 12.



#	Name	Abs<720nm>	Abs<750nm>
1		0.21171	0.21598
2		0.21238	0.21689
3		0.21395	0.21846

a) ekstrakt 1, *otopina 1* (*O1*)



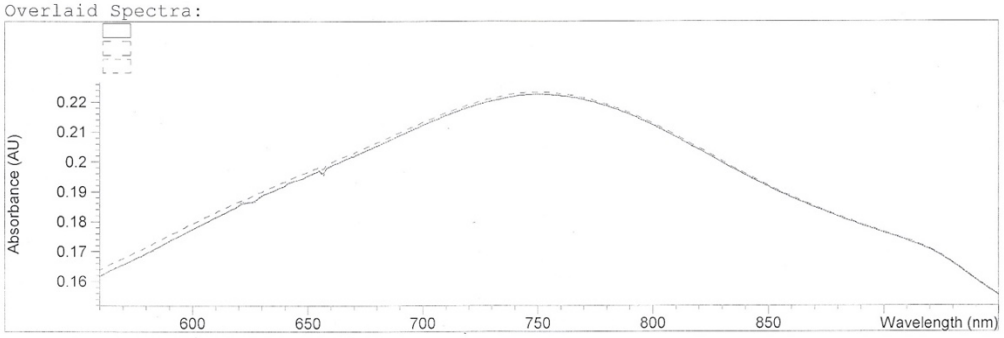
#	Name	Abs<720nm>	Abs<750nm>
1		0.14212	0.14524
2		0.14016	0.14342
3		0.13869	0.14190

b) ekstrakt 1, *otopina 2* (*O2*)

Slika 12a. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola a) ekstrakta 1 *otopine 1* i b) ekstrakta 1 *otopine 2* u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* Šilić.

Method file : POLIFEN.M (modified) Last update: Date 5/4/17 Time 12:05:23 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MIA\TP201.SD Created : 4/28/17 11:07:39

Overlaid Spectra:

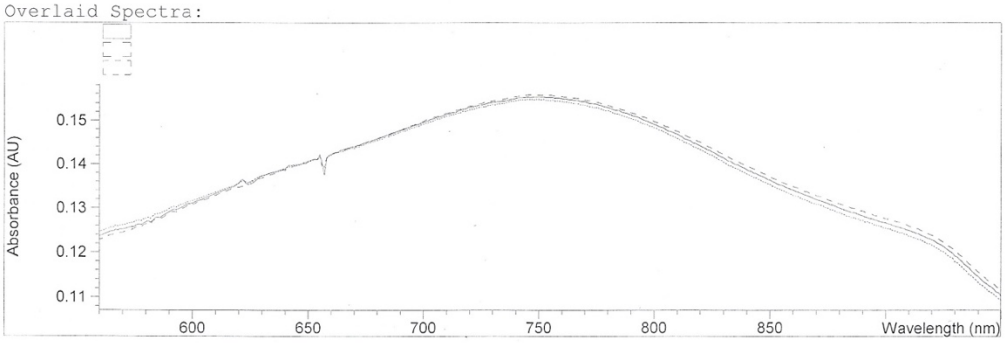


#	Name	Abs<720nm>	Abs<750nm>
1		0.21817	0.22260
2		0.21840	0.22270
3		0.21910	0.22332

a) ekstrakt 2, *otopina 1* (*O1*)

Method file : POLIFEN.M (modified) Last update: Date 5/4/17 Time 12:05:23 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MIA\TP202.SD Created : 4/28/17 11:11:04

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<720nm>	Abs<750nm>
1		0.15297	0.15543
2		0.15243	0.15483
3		0.15326	0.15588

b) ekstrakt 2, *otopina 2* (*O2*)

Slika 13b. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola a) ekstrakta 2 *otopine 1* i b) ekstrakta 2 *otopine 2* u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria kosaninii* Šilić.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija nadzemnih dijelova makedonske endemične vrste *Micromeria kosaninii* Šilić, a uključivala je kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih kiselina (**FK**), flavonoida (**F**), ukupnih polifenola (**UPF**) i trjeslovina (**T**).

- Kvalitativna analiza **F** i **FK** provedena je tankoslojnom kromatografijom (TLC) metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrste *M. kosaninii* na sloju Kieselgela 60 F_{254}, uz dva različita razvijača: MF1 (etil acetat – mravlja kiselina – voda, 8:1:1, *V/V*) i MF2 (etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda, 100:11:11:27, *V/V*). Bolje razdvajanje postignuto je primjenom MF1, a detekcijom razvijenih TLC kromatograma na UV-365 nm, nakon prskanja NST/PEG reagensom, utvrđena je prisutnost naringina, kvercitrina, izokvercitrina, klorogenske i izoklorogenske kiseline u ispitivanim biljnim uzorcima; također je detektirana kromatografska zona za koju se nije moglo sa sigurnošću potvrditi odgovara li kavenoj ili ružmarinskoj kiselini.

- Kvalitativna analiza **UPF** provedena je reakcijom stvaranja obojenog produkta dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge, dok su **T** dokazane kemijskim reakcijama stvaranja obojenja i taloga. U ispitivanim uzorcima nije dokazana prisutnost kondenziranih trjeslovina, ali je reakcija na trjeslovine koje hidroliziraju bila pozitivna.

- Sadržaj **F**, **FK**, **UPF** i **T** određen je spektrofotometrijskim metodama.

- Kvantitativna analiza **FK** provedena je metodom prema Europskoj farmakopeji, a koja se temelji na reakciji stvaranja kompleksa s nitrit-molibdat reagensom. Sadržaj **FK** u analiziranim uzorcima iznosio je 4,30±0,21% (na 505 nm, prema metodi) i 4,39±0,22% (na 495 nm, max. apsorpcije), izraženo kao ružmarinska kiselina, odnosno 7,97±0,37% (na 525 nm), izraženo kao klorogenska kiselina.

- Udio **F**, dobiven mjerenjem apsorbancije otopina koje su sadržavale komplekse flavonoidnih aglikona s Al^{3+}, iznosio je 0,07±0,01% (na 425 nm, prema metodi), odnosno 0,08±0,01% (na 421 nm, max. apsorpcije).

- Kvantitativna analiza **UPF** i **T** provedena je metodom koja se temelji na reakciji s FCR fenolnim reagensom i prethodnom taloženju trjeslovina kazeinom. Sadržaj **UPF** u nadzemnim dijelovima vrste *M. kosaninii* iznosio je 8,62±0,13% (na 720 nm, prema metodi), odnosno 8,80±0,13% (na 750 nm, max. apsorpcije), dok je sadržaj **T** koje se talože s kazeinom iznosio 2,76±0,15% (na 720 nm, prema metodi), odnosno 2,83±0,13% (na 750 nm, max. apsorpcije).

Rezultati provedene fitokemijske analize polifenolnih spojeva endemične vrste *Micromeria kosaninii* Šilić predstavljaju značajan prilog dosadašnjim istraživanjima ove makedonske endemične biljne vrste i donose nove spoznaje o njezinom fitoterapijskom potencijalu, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

6. LITERATURA

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry,* 2004, 84, 551-562.

Amić D. Organska kemija za studente agronomske struke. Zagreb, Školska knjiga, 2008.

Bival Štefan M. Biološki učinci fenolnih kiselina iz odabranih vrsta porodice *Lamiaceae*. Doktorski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015.

Brahmi F, Guendouze N, Hauchard D, Okusa P, Kamagaju L, Madani K, Duez P. Phenolic profile and biological activities of *Micromeria graeca* (L.) Benth. ex Rchb. *International Journal of Food Properties,* 2017, 20(S2), S2070-S2083.

Bräuchler C, Ryding O, Heubl G. The genus *Micromeria* (*Lamiaceae*), a synoptical update. *Willdenowia,* 2008, 38(2), 363-410.

Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews,* 1998, 56, 317-333.

Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavanol-derivaten in Drogen. *Archiv der Pharmazie*, 1960, 15, 33-38.

Dubravec K. Botanika. Zagreb, Fakultet poljoprivrednih znanosti, 1991.

EDQM. European Pharmacopoeia. 9 ed. Strasbourg, Council of Europe, 2018; http://online6.edqm.eu/ep905/#, pristupljeno: 15.6.2018.

Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009.

Jaganath IB, Crozier A. Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. U: Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. Fraga CG, ur., Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2010, str. 1-39.

Jurišić R. Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda Plantago L. Doktorski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2003.

Kalođera Z, Vladimir S. *Micromeria* vrste u flori Hrvatske. *Farmaceutski Glasnik,* 1992, 48, 203-214.

Kalođera Z. Farmakognozija II. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2010.

Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb, Poljoprivredni nakladni zavod, 1956.

Kuštrak D. Farmakognozija - fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing - Tehnička knjiga, 2005.

Mägdefrau K, Ehrendorfer F. Udžbenik botanike za visoke škole: sistematika, evolucija i geobotanika. Zagreb, Školska knjiga, 1997.

Maleš Ž, Crkvenčić M, Hazler Pilepić K, Herenda F. Istraživanje flavonoida, fenolnih kiselina i aminokiselina gole kilavice - *Herniaria glabra* L. *Farmaceutski glasnik,* 2013, 69, 673-684.

Marković S. Fitoaromaterapija. Zagreb, Centar Cedrus, 2005.

Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1993, 21, 833-846.

Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules,* 2009, 14, 2202-2211.

Petričić J. Farmakognozija (farmaceutska biologija). Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1983.

Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kemija u industriji,* 2009, 58, 121-128.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine,* 1996, 20, 933-956.

Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 2003, 51, 2866-2887.

Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Archiv der Pharmazie*, 1976, 309, 38-44.

Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research,* 2009, 53, S310-S329.

Shuka L, Tan K. New records for Albania based on taxa from the Prespa National Park. *Biodiversity Data Journal,* 2013, 1, 1-24.

Šilić Č. Monografija rodova *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Bentham, *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. u flori Jugoslavije. Sarajevo, Zemaljski muzej BiH, 1979.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B. *Farmakognozija I, Praktikum,* Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2008, 16-21.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Alegro A, Kőszegi T, Petrik J. Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected *Micromeria* Species from Croatia. *Molecules,* 2011, 16, 1454-1470.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2008.

Vladimir-Knežević S, Kalođera Z, Jurišić R. Biološki aktivne tvari u biljnim vrstama roda *Micromeria* Bentham. *Farmaceutski glasnik,* 2000, 56, 301-312.

Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1983, 136-137.

7. SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska analiza polifenolnih spojeva iz nadzemnih biljnih dijelova makedonske endemične vrste *Micromeria kosaninii* Šilić (Lamiaceae). Prisutnost polifenolnih spojeva dokazana je kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Tankoslojnom kromatografijom metanolnog ekstrakta utvrđena je prisutnost naringina, kvercitrina, izokvercitrina, klorogenske kiseline i izoklorogenske kiseline te kavena i/ili ružmarinska kiselina. Kvantitativna analiza polifenola provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj fenolnih kiselina, izražen kao ružmarinska kiselina, iznosio je 4,30±0,21% (505 nm, prema metodi), odnosno 4,39±0,22% (495 nm, max.), dok je sadržaj izražen na klorogensku kiselinu bio 7,97±0,37% (525 nm). Udio flavonoida iznosio je 0,07±0,01% (425 nm, prema metodi), odnosno 0,08±0,01% (421 nm, max.). Sadržaj ukupnih polifenola kretao se od 8,62±0,13% (720 nm, prema metodi) do 8,80±0,13% (750 nm, max.), dok je udio trjeslovina bio u granicama od 2,76±0,15% (720 nm, prema metodi) do 2,83±0,13% (750 nm, max.). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja doprinos dosadašnjem istraživanju roda *Micromeria* i makedonskih endema te upotpunjuje znanstvene spoznaje o biološkoj aktivnosti i fitoterapijskom potencijalu vrste *Micromeria kosaninii* Šilić.

SUMMARY

A phytochemical characterization of polyphenolic compounds in the aboveground parts of the Macedonian endemic plant species *Micromeria kosaninii* Šilić (Lamiaceae) was carried out. The presence of polyphenols was established through the usage of general chemical reactions of developing colored products and precipitates. Thin layer chromatography (TLC) of the methanol extract revealed the presence of naringin, quercitrin, isoquercitrin, chlorogenic acid, isochlorogenic acid, as well as caffeic and/or rosmarinic acid. Quantitative analyses of polyphenolics were carried out using the spectrophotometric methods. The content of phenolic acids (PA), expressed as rosmarinic acid, was 4.30±0.21% (505 nm, according to method) and 4.39±0.22% (495 nm, max. abs.), while the PA content, expressed as chlorogenic acid, was 7.97±0.37%. The flavonoid content was 0.07±0.01% (425 nm, according to method) and 0.08 ± 0.01% (421 nm, max. abs.). The total polyphenolic yield was in range from 8.62±0.13% (720 nm, according to method) to 8.80±0.13% (750 nm, max. abs.), while the tannin content varied from 2.76±0.15% (720 nm, according to method) to 2.83±0.13% (750 nm, max. abs.). Conducted phytochemical characterization represents a scientific contribution to the previous research of the genus *Micromeria* and Macedonian endemic plant species, and also contributes to the existing knowledge concerning biological activity and phytotherapeutic potential of *Micromeria kosaninii* Šilić.

8. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

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

Diplomski rad

KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA POLIFENOLA VRSTE *MICROMERIA KOSANINII* ŠILIĆ (LAMIACEAE)

Mia Šojat

SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska analiza polifenolnih spojeva iz nadzemnih biljnih dijelova makedonske endemične vrste *Micromeria kosaninii* Šilić (Lamiaceae). Prisutnost polifenolnih spojeva dokazana je kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Tankoslojnom kromatografijom metanolnog ekstrakta utvrđena je prisutnost naringina, kvercitrina, izokvercitrina, klorogenske kiseline i izoklorogenske kiseline te kavena i/ili ružmarinska kiselina. Kvantitativna analiza polifenola provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj fenolnih kiselina, izražen kao ružmarinska kiselina, iznosio je 4,30±0,21% (505 nm, prema metodi), odnosno 4,39±0,22% (495 nm, max.), dok je sadržaj izražen na klorogensku kiselinu bio 7,97±0,37% (525 nm). Udio flavonoida iznosio je 0,07±0,01% (425 nm, prema metodi), odnosno 0,08±0,01% (421 nm, max.). Sadržaj ukupnih polifenola kretao se od 8,62±0,13% (720 nm, prema metodi) do 8,80±0,13% (750 nm, max.), dok je udio trjeslovina bio u granicama od 2,76±0,15% (720 nm, prema metodi) do 2,83±0,13% (750 nm, max.). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja doprinos dosadašnjem istraživanju roda *Micromeria* i makedonskih endema te upotpunjuje znanstvene spoznaje o biološkoj aktivnosti i fitoterapijskom potencijalu vrste *Micromeria kosaninii* Šilić.

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

Rad sadrži: 50 stranica, 12 slika, 11 tablica i 34 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Micromeria kosaninii* Šilić, polifenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, trjeslovine, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, tankoslojna kromatografija, UV-Vis spektrofotometrija

Mentor: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Živka Juričić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: srpanj, 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF POLYPHENOLS OF *MICROMERIA KOSANINII* ŠILIĆ (LAMIACEAE)

Mia Šojat

SUMMARY

A phytochemical characterization of polyphenolic compounds in the aboveground parts of the Macedonian endemic plant species *Micromeria kosaninii* Šilić (Lamiaceae) was carried out. The presence of polyphenols was established through the usage of general chemical reactions of developing colored products and precipitates. Thin layer chromatography (TLC) of the methanol extract revealed the presence of naringin, quercitrin, isoquercitrin, chlorogenic acid, isochlorogenic acid, as well as caffeic and/or rosmarinic acid. Quantitative analyses of polyphenolics were carried out using the spectrophotometric methods. The content of phenolic acids (PA), expressed as rosmarinic acid, was 4.30±0.21% (505 nm, according to method) and 4.39±0.22% (495 nm, max. abs.), while the PA content, expressed as chlorogenic acid, was 7.97±0.37%. The flavonoid content was 0.07±0.01% (425 nm, according to method) and 0.08 ± 0.01% (421 nm, max. abs.). The total polyphenolic yield was in range from 8.62±0.13% (720 nm, according to method) to 8.80±0.13% (750 nm, max. abs.), while the tannin content varied from 2.76±0.15% (720 nm, according to method) to 2.83±0.13% (750 nm, max. abs.). Conducted phytochemical characterization represents a scientific contribution to the previous research of the genus *Micromeria* and Macedonian endemic plant species, and also contributes to the existing knowledge concerning biological activity and phytotherapeutic potential of *Micromeria kosaninii* Šilić.

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

Thesis includes: 50 pages, 12 figures, 11 tables, and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Micromeria kosaninii* Šilić, polyphenols, phenolic acids, flavonoids, tannins, qualitative analysis, quantitative analysis, thin layer chromatography, UV-Vis spectrophotometry

Mentor: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2018