

# Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog učinka u vrstama *Iris illyrica* Tomm. i *Iris pseudopallida* Trinajstić

---

Krezić, Danijela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:278202>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Danijela Krezić**

**Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog  
učinka u vrstama *Iris illyrica* Tomm. i *Iris  
pseudopallida* Trinajstić**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Farmaceutska botanika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Željana Maleša.

*Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Željenu Malešu na stručnom vodstvu i savjetima pri izradi diplomskog rada. Veliko hvala asistentu Ivanu Duki, mag. pharm., na strpljenju prilikom izrade i pisanja rada i hvala na svim stručnim savjetima. Hvala kolegici Petri Kovačić na podršci i druženju prilikom izrade diplomskog rada, ali i tokom cijelog studija.*

*Za kraj, želim zahvaliti svojim roditeljima, braći Andri i Mati te sestri Neri što su uvijek bili uz mene i svojom podrškom mi pomogli i olakšali ovo vrijeme provedeno u Zagrebu. Također, hvala brojnim prijateljima, a naročito Hani, Loreni, Lari, Adeliti, Ani, Nini, Luciji, Marini i Branimiru.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. BOTANIČKI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Obilježja vrsta porodice Iridaceae.....	2
1.1.2. Obilježja vrsta roda <i>Iris</i> L.....	3
1.1.3. Obilježja biljnih vrsta <i>Iris illyrica</i> Tomm. i <i>Iris pseudopallida</i> Trinajstić.....	4
1.1.3.1. <i>Iris illyrica</i> Tomm. – ilirska perunika.....	4
1.1.3.1. <i>Iris pseudopallida</i> Trinajstić – 'lažno' blijeda perunika.....	6
<b>1.2. FITOKEMIJA</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI BILJNIH VRSTA RODA <i>Iris</i></b> .....	<b>10</b>
<b>1.4. ETNOBOTANIKA VRSTA RODA <i>Iris</i></b> .....	<b>11</b>
<b>1.5. FENOLNI SPOJEVI (POLIFENOLI)</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5.1. FLAVONOIDI</b> .....	<b>15</b>
1.5.1.1. Biološki učinci.....	17
<b>1.5.2. KSANTONI – biološki učinci</b> .....	<b>19</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 BILJNI MATERIJALI</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2. APARATI I KEMIKALIJE</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3. METODE ISPITIVANJA</b> .....	<b>24</b>
3.3.1. Priprema ekstrakata.....	24
3.3.2. Tankoslojna kromatografija.....	25
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	26
3.3.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	28
3.3.5. Određivanje antioksidativnog učinka (ABTS test).....	30
3.3.6. Statistička obrada podataka.....	31
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2. ODREĐIVANJE POLIFENOLA</b> .....	<b>34</b>
4.2.1. Baždarni pravac galne kiseline.....	34
4.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola.....	35
<b>4.3. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA</b> .....	<b>37</b>

4.3.1. Baždarni pravac kvercetina.....	37
4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	38
4.4. ABTS TEST.....	40
4.4.1. Baždarni pravac galne kiseline.....	40
4.4.2. Određivanje antioksidativnog učinka.....	41
4.5. KORELACIJA.....	43
5. RASPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČCI.....	45
7. LITERATURA.....	46
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	49
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

Biljke se još od davnina primjenjuju kao lijekovi, ljudi su polako otkrivali njihove blagodati i naučili ih koristiti u sprječavanju i liječenju određenih bolesti, za ublažavanje bolova i drugih tegoba. Brojne biljke sadrže farmakološki djelotvorne tvari kao što su alkaloidi, eterična ulja, fenolni spojevi, smole i sluzi. Te sastavnice se mogu nalaziti u različitim dijelovima biljke, npr. u listu, cvijetu, podanku, korijenu i kori.

Otkrićem sintetskih lijekova tijekom prošlog stoljeća smanjila se uporaba biljnih pripravaka i vjerovanje u uspješnost fitoterapije. Međutim, razvoj otpornosti na brojne lijekove, kao i nemogućnost sinteze lijekova za određena stanja doveli su do ponovnog istraživanja biljaka i njihovih sastavnica. Također, u današnje vrijeme ljudi pokazuju sve veći interes za prirodne sastojke, kako u prehrani i kozmetici, tako i u farmaciji.

Biljne vrste istražene u ovom radu su *Iris illyrica* Tomm. i *Iris pseudopallida* Trinajstić. Rasprostranjene su u Republici Hrvatskoj i pripadaju rodu *Iris* L. Druge vrste ovog roda upotrebljavaju se za liječenje određenih bolesti, imaju različita djelovanja, a neka od njih su protuupalno, antioksidativno, antibakterijsko, antikolinergičko i antitumorsko djelovanje. Upravo iz tog razloga istražene su dvije navedene vrste, a u ovom radu naglasak je na njihovom antioksidativnom djelovanju.

## **1.1. BOTANIČKI PREGLED**

### **1.1.1 Obilježja vrsta porodice Iridaceae**

Porodica Iridaceae sadrži oko 80 rodova u koje je raspoređeno više od 1800 vrsta. Rasprostranjene su po cijelom svijetu, ali nema ih u hladnim područjima i na sjeveru Euroazije. Većinom su višegodišnje zeljaste biljke, a ovisno o rodu podzemni organ može biti podanak, gomolj ili lukovica. Pravilni ili nepravilni cvjetovi su dvospolni, mogu biti pojedinačni ili skupljeni u paštasti cvat. Vrste ove porodice prepoznatljive su po kožastim, plosnatim ili valjkastim listovima koji mogu biti sjedeći ili na peteljci. Kod nekih oblika listovi su distihni - svaki pršljen sadrži jedan list koji je okrenut za 180° u odnosu na list prethodnog pršljena. Plojka je linearna ili lancetasta, raspored lisnih žila je paralelan, bez žila višeg reda. Plod je mnogosjemeni tobolac. Tri prašnika su srasla bilo za cijev perigona ili međusobno prašničkim nitima, a plodnica se sastoji od tri srasla plodnička lista. U Hrvatskoj se iz ove porodice nalazi 5 rodova i 24 vrste (Glavaš, 2019; Nikolić, 2013).

Ove biljke upotrebljavaju se kao hrana, a pojedine kao začini. Zbog lijepih boja cvjetova primjenjuju se kao ukrasne biljke. Nadalje, upotrebljavaju se kao ljekovite biljke u liječenju prehlade, gripe, malarije, zubobolje i kod opekline (Rasool i sur., 2013).

### 1.1.2. Obilježja vrsta roda *Iris* L.

U rod *Iris* ubrajaju se višegodišnje biljke čija je nadzemna stabljika najčešće okruglasta, može biti duža ili kraća od listova te razgranata ili nerazgranata. Listovi su dugački, uski i nemaju peteljku. Cvjetovi su veliki i različitih su boja. Perunike su jednosupnice pa se u njihovom cvijetu ne razlikuju lapovi i latice; ocvijeće cvijeta čine istovrsni listovi, a naziva se perigon. Sastoji se od šest listova, tri vanjska su veća i okrenuta prema dolje, a unutarnji su manji i uspravni. Na vanjskim listovima često se nalaze dlačice koje služe kukcima za lakše skupljanje nektara. Vratovi tučaka nalikuju na latice i prividno daju ocvijeću još jedan pršljen latica ([www.matica.hr](http://www.matica.hr); Kušan, 1956).

Cvijet perunike čine tri identične i biološki samostalne cjeline, a svaka se sastoji od vanjskog lista perigona, prašnika, proširenog vrata tučka s njuškom i pripadajućeg pretinca plodnice sa sjemenim zametcima. Tijekom oprašivanja, svaka cjelina cvijeta se može oprašiti zasebno. Ovakva građa cvijeta osigurava oplodnju s genetički vrlo raznolikim muškim gametama, a to osigurava opstanak i evoluciju vrsta roda *Iris*. Sjemenke su okrugle, kruškolike ili spljoštene, glatke ili naborane površine. Većina perunika se lako vegetativno razmnožava pomoću podanka. Perunike se dijele na velik broj srodstvenih kategorija: sekcija, podsekcija, podrodova i serija. Evolucija perunika još uvijek traje ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)).



### 1.1.3. Obilježja biljnih vrsta *Iris illyrica* Tomm. i *Iris pseudopallida* Trinajstić

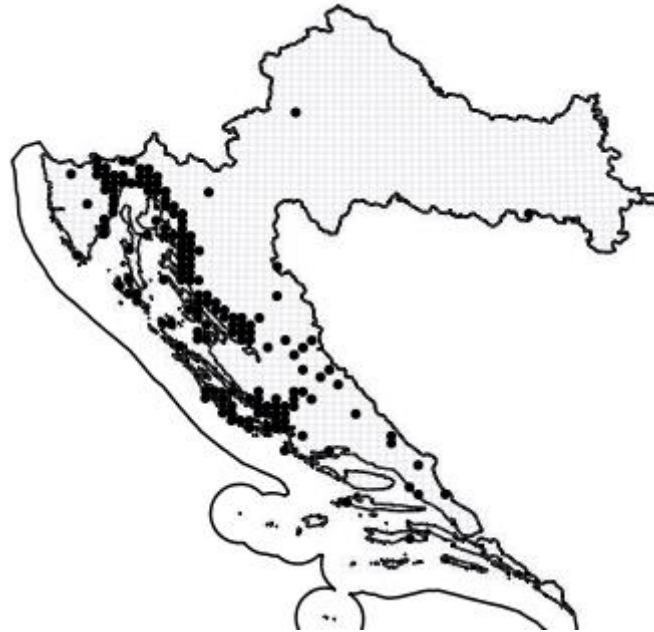
#### 1.1.3.1. *Iris illyrica* Tomm. – ilirska perunika

Vrsta *I. illyrica* je trajnica; nadzemna stabljika joj je snažna i uspravna, grana se i nosi dva do pet cvjetova. Visina joj je od 30 do 70 cm, a stabljika visinom prelazi sabljaste i lagano zakrivljene listove koji se suše i otpadaju u jesen. Ovojni listovi cvjetova su suhokožičasti i u vrijeme cvatnje su smeđkaste boje. Krupni cvjetovi mogu biti svjetlije ili tamnije ljubičaste boje, a na vanjskim listovima se ističu žute dlačice koje pridonose lijepom izgledu cvjetova (Slika 1.). Biljka cvjeta u razdoblju od travnja do lipnja. Može se razmnožavati sjemenkama, ali i vegetativno pomoću podanka. Ilirska perunika je strogo zaštićena vrsta jer joj brojnost opada zbog ljudskog utjecaja (Nikolić i sur., 2015; [www.matica.hr](http://www.matica.hr)).



**Slika 1.** *Iris illyrica* Tomm. ([www.matica.hr](http://www.matica.hr))

Raste u raspuklinama stijena, na starim zidinama i u svijetlim šikarama, a može se pronaći u sjevernoj Italiji, Sloveniji i Hrvatskoj. U Hrvatskoj raste u obalnom području od Istre preko Kvarnera do srednje Dalmacije (Slika 2.) (Nikolić i sur., 2015; Šugar, 1994).



**Slika 2.** Rasprostranjenost vrste *I. illyrica* u Hrvatskoj ([www.hirc.botanic.hr](http://www.hirc.botanic.hr))

### 1.1.3.2. *Iris pseudopallida* Trinajstić – 'lažno' blijeda perunika

Vrsta *I. pseudopallida* je također trajnica; snažna je biljka s debelim podankom, a stabljika je uspravna i pri vrhu razgranjena na dva do pet ogranaka. Listovi su joj široki, veliki i mesnati, niži su od stabljike koja visinom može doseći do 100 cm. Za razliku od listova vrste *I. illyrica*, ne suše se već ostaju postojani cijelu zimu. Ovojni listovi cvjetova su suhokožičasti i najčešće su tamnosmeđe boje. Cvjetovi su veliki i svijetloljubičasti, a na vanjskim listovima se do polovice dužine protežu žute dlačice (Slika 3.) (Nikolić i sur., 2015). Ova vrsta perunike je samonikla, dobro se razmnožava vegetativno te dobro uspijeva u kulturi. Cvjeta u proljeće, od travnja do lipnja ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)).



Slika 3. *Iris pseudopallida* Trinajstić ([www.matica.hr](http://www.matica.hr))

Biljka je strogo zaštićena, a u Hrvatskoj se nalazi na području središnje i južne Dalmacije na vapnenačkim stijenama i kamenjarskim travnjacima (Slika 4.). Raste također i u Hercegovini, primorskom dijelu Crne Gore i u Albaniji (Nikolić i sur., 2015).



**Slika 4.** Rasprostranjenost vrste *I. pseudopallida* u Hrvatskoj ([www.hirc.botanic.hr](http://www.hirc.botanic.hr))

## 1.2. FITOKEMIJA

Perunike su bogat izvor fenolnih spojeva i drugih sekundarnih metabolita. Prvotno su sekundarni metaboliti smatrani otpadnim produktima, ali nakon što su se provela brojna istraživanja utvrdilo se da upravo oni imaju važnu ulogu u rastu same biljke djelujući kao glasnici procesa. Pojedini sudjeluju u postupku oprašivanja tako što privlače kukce, a drugi su važni u zaštiti od biljojeda. Sekundarni metaboliti sastoje se od mnoštva različitih spojeva razvrstanih u skupine ovisno o njihovom biosintetskom podrijetlu (Rasool i sur., 2013). Spojevi nađeni u perunikama su:

### Flavonoidi

Flavonoidi nađeni u rodu *Iris* mogu se podijeliti u pet skupina:

1. izoflavoni i njihovi heterozidi koji se najvećim dijelom nalaze u podanku, manje u listovima i cvjetovima, a njihova prisutnost je uvjetovala primjenu ove biljke u tradicionalnoj medicini,
2. flavoni i njihovi heterozidi – u perunikama je identificirano više heterozida, a najzastupljeniji su C i O vezani heterozidi nađeni u listovima i cvjetovima većine vrsta,
3. flavonoli i njihovi heterozidi,
4. flavanoni,
5. dihidroflavonoli (Wang i sur., 2010).

### Jednostavni fenolni spojevi

Opisano je nekoliko jednostavnih fenolnih spojeva uključujući benzofenone, koniferaldehid, *cis*-epoksikoniferil alkohol, acetovanilon i *p*-hidroksiacetofenon (Kukula-Koch i sur., 2013).

### Ksantoni

Perunike su bogat izvor ksantona, npr. neomagniferina i magniferina (Kukula-Koch i sur., 2013). Ksantoni su triciklički spojevi, derivati dibenzo- $\gamma$ -pirona koji se, osim u biljkama, mogu pojaviti u mikroorganizmima (Panda i sur., 2013).

### Ostali aromatski spojevi

Ostali aromatski spojevi uključuju kinone i antocijane (Kukula-Koch i sur., 2013).

## **Steroidi**

Steroidi se nalaze u ekstraktu samo nekih vrsta. Tu spadaju  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, 7- $\beta$ -hidroksistigmast-4-en-3-on i stigmasterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozid (Kukula-Koch i sur., 2013).

## **Terpeni**

Ekstrakti perunika bogat su izvor triterpena. Sadrže iridale u koje spadaju iritektol A i B, iridobelamal i izoiridogermanal (Kukula-Koch i sur., 2013).

### 1.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI BILJNIH VRSTA RODA *Iris*

Brojni predstavnici vrsta roda *Iris* imaju zanimljive farmakološke učinke. Iridali i triterpeni pronađeni u vrstama *Iris germanica* L. i *Iris pallida* Lam. sprječavaju nastanak tumora i pospješuju liječenje malarije. Zbog prisutnosti izoflavonoida, vrsta *I. germanica* pokazuje protuupalni i antioksidativni učinak. Izoflavonoidi su kemopreventivni i antibakterijski spojevi. Nadalje, barem jedan od izoflavonoida identificiranih u podanku vrste *I. germanica* upotrebljava se kao farmaceutski pripravak za liječenje bolesti povezanih s poremećajem hormona. Spojevima koji su nađeni u vrsti *I. germanica* pripisan je antineoplastični, antitumorski i antimikobakterijski učinak. Listovi iste vrste bogat su izvor vitamina C. Ekstrakti iz svježih podanaka i sušenih nadzemnih dijelova perunika pokazuju antioksidativno i antikolinergičko djelovanje. Eterično ulje dobiveno iz cvjetova može se upotrebljavati u aromaterapiji zbog sedativnog učinka. Hlapljivi spojevi iz vrste *Iris pseudacorus* L. pokazuju antibakterijsku aktivnost, a djeluju na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (Kukula-Koch i sur., 2013).

Novija istraživanja su otkrila da vrste *Iris loczyi* Kanitz i *Iris unguicularis* Poir. sadrže različite sekundarne metabolite koji značajno inhibiraju aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze pa imaju veliki potencijal za kontroliranje dijabetesa i dijabetičkih komplikacija (Kukula-Koch i sur., 2013).

Istraživanja koja se danas provode dijelom su potaknuta povećanjem otpornosti mikroorganizama na dostupne antimikrobne agense. U perunikama se nalaze flavonoidi za koje se smatra da imaju antimikrobni učinak. U provedenim ispitivanjima pokazana je dobra antimikrobna aktivnost što daje poticaj za daljnja istraživanja (Crişan i Cantor, 2016).

#### 1.4. ETNOBOTANIKA VRSTA RODA *Iris*

Prema starogrčkoj legendi, božica Irida (*Iris*) prenosila je poruke bogova na Zemlju pomoću duge. Na mjestu gdje je duga dotaknula tlo izrastao bi cvijet duginih boja, odnosno perunika. Tri dijela ovog cvijeta predstavljala su mudrost, vjeru i hrabrost. Hrvatski naziv biljke najvjerojatnije dolazi od imena staroslavenskog boga Peruna i njegove žene, boginje Perunike. Prema legendi, tamo gdje bi munja gromovnika Peruna udarila u zemlju izrastao bi cvijet koji je uvijek bio različite boje ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)).

Perunike su bile uzgajane još u antičkoj Grčkoj i Rimskom Carstvu, a upotrebljavale su se za izradu parfema. Postoje zapisi o njihovom korištenju kao ljekovitih biljaka prije nove ere. U novije doba podanak perunika se koristio za izradu melema za kožu, zatim prašak napravljen od podzemnih dijelova se stavljao u čajeve koji su rješavali želučane tegobe, poremećaje bubrega i mjehura. Podanak se dodavao u duhan pa bi se pušenjem takvih mješavina smanjivala mučnina. Neke vrste roda *Iris* stoljećima su se rabile u pučkoj medicini kao diuretici, purgativi i spazmolitici (Crišan i Cantor, 2016).

Osim za liječenje, kroz povijest, dijelovi perunika su korišteni i na drugačije načine. Od njih su rađeni pigmenti koje su koristili slikari u Srednjem vijeku. Pigment se i danas ekstrahira i daje boju nekim alkoholnim pićima kao što je džin ili se koristi kao boja za tkanine. Poznato je i korištenje u prehrambenoj industriji gdje se podanci koriste u proizvodnji kolača, slatkiša i sladoleda (Crišan i Cantor, 2016).



## 1.5. FENOLNI SPOJEVI (POLIFENOLI)

Fenolni spojevi, odnosno polifenoli su sekundarni metaboliti koji igraju važnu ulogu u rastu i razmnožavanju biljaka pružajući zaštitu od patogena i biljojeda. Postoji više od 8000 polifenolnih spojeva nađenih u prirodi, a glavna uloga je sprječavanje oksidacije. Imaju i brojne druge učinke među kojima su antialergijsko, antiarterogeno, protuupalno, antimikrobno, anitrombotsko, kardioprotektivno i vazodilacijsko djelovanje. Kod biljaka imaju i neke druge učinke, primjerice sadrže neke tvari koje ubrzavaju oprašivanje ili daju boju biljkama te ih tako maskiraju i štite od biljojeda. Polifenoli su fitokemijski spojevi koji su u najvećem broju nađeni u voću, povrću, čajevima, kavi, žitaricama, čokoladi, raznim pićima i mahunarkama. Štite ljudsko tijelo od slobodnih radikala i UV zračenja (Ganesan i Xu, 2017; Lin i sur., 2016; Balasundram i sur., 2006).

Fenolni spojevi u svojoj strukturi imaju aromatski prsten koji na sebi ima jednu ili više hidroksilnih skupina, a obuhvaćaju jednostavne fenolne molekule, kao i visoko polimerizirane spojeve. Većina prirodnih fenolnih spojeva uključuje konjugate s mono- i polisaharidima povezanim na jednu ili više fenolnih skupina. Strukturno su različiti, a mogu se podijeliti u nekoliko kategorija (Tablica 1.) (Balasundram i sur., 2006).

**Tablica 1.** Strukturna podjela fenolnih spojeva u biljkama

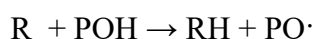
TIP FENOLNOG SPOJA	POJEDNOSTAVLJENA STRUKTURA
Jednostavni fenoli, benzokinoni	$C_6$
Hidroksibenzoati	$C_6 - C_1$
Acetofenoni, fenilacetati	$C_6 - C_2$
Hidroksicinamati, fenilpropanoidi	$C_6 - C_3$
Naftokinoni	$C_6 - C_4$
Ksantoni	$C_6 - C_1 - C_6$
Stilbeni, antrakinoni	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoidi	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Lignini	$(C_6 - C_3)_n$
Kondenzirane trjeslovine	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Među brojnim potencijalnim učincima na ljudsko zdravlje, ističe se sposobnost polifenola da smanje upalu i da spriječe oksidativno oštećenje stanica tako što djeluju kao snažni antioksidansi. Povećani unos hrane koja sadrži polifenole smanjuje rizik razvoja tumora, kardiovaskularnih bolesti, kronične upale i poremećaja metabolizma. Mehanizam antioksidativnog i protuupalnog djelovanja proizlazi iz njihove sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, obnavljanja aktivnosti antioksidativnih enzima i reguliranja upale posredovane citokinima (Zhang i Tsao, 2016).

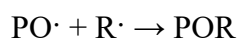
### **Antioksidativno djelovanje**

Antioksidansi su spojevi koji mogu odgoditi ili spriječiti oksidaciju tako što hvataju slobodne radikale i umanjuju oksidativni stres. Oksidativni stres je stanje neravnoteže gdje velike količine reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta nadvladaju endogeni antioksidativni kapacitet što vodi do oksidacije biomolekula kao što su enzimi, proteini, DNK i lipidi. Razvoj kroničnih degenerativnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, rak i starenje, može biti izazvan oksidativnim stresom.

Fenolni spojevi (POH) neutraliziraju slobodne radikale i sprječavaju oksidaciju lipida i drugih molekula tako što doniraju atom vodika radikalima (R):



Nastaje fenoksi radikal ( $PO\cdot$ ) koji je zbog rezonancije relativno stabilan i zato se ne pokreće nova lančana reakcija. Fenoksi radikali mogu reagirati s drugim slobodnim radikalima i tako sprječavaju daljnje širenje reakcija oksidacije:



Struktura fenolnih spojeva je idealna za hvatanje slobodnih radikala jer imaju hidroksilne skupine koje su donori elektrona ili atoma vodika i imaju konjugiranu aromatsku strukturu koja omogućuje delokalizaciju nesparenih elektrona što pridonosi stabilnosti (Dai i Mumper, 2010).

## Protuupalno djelovanje

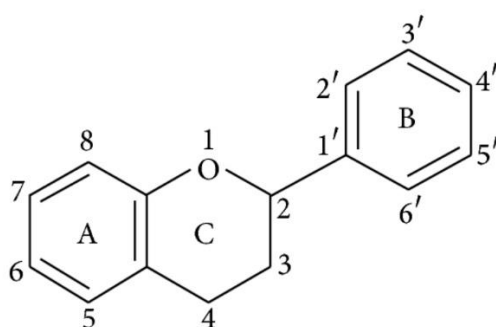
Molekularni mehanizam protuupalnog djelovanja polifenola uključuje djelovanje na određene mete u organizmu. Mete polifenola mogu se podijeliti u dvije skupine. Prva skupina su mete ovisne o putu arahidonske kiseline (ARA), a to su COX (ciklooksigenaza), LOX (lipooksigenaza) i PLA<sub>2</sub> (fosfolipaza A<sub>2</sub>). Druga skupina nije ovisna o putu ARA i u nju spadaju NOS (engl. nitric oxide synthase), NF-κB (engl. nuclear factor κB), NAG-1 (engl. NSAID activated gene-1) i PPAR (engl. peroxisome proliferator-activated receptors).

COX katalizira nastanak prostaglandina iz ARA, a prostaglandini djeluju kao medijatori upale. LOX su enzimi odgovorni za stvaranje leukotriena koji pojačavaju upalu. PLA<sub>2</sub> je enzim koji cijepa fosfolipide iz kojih nastaju slobodne masne kiseline među kojima i ARA. Polifenoli inhibiraju ove enzime i na taj način djeluju protuupalno.

Polifenoli su ligandi PPAR receptora koji se nalaze u jezgri. To su hormonski receptori koji, uz brojne druge aktivnosti, djeluju protuupalno. Radikal dušikovog (II) oksida (NO) je slobodni radikal koji djeluje, između ostalog, kao kemijski posrednik upale. Polifenoli inhibiraju njegovu sintezu tako što djeluju na enzime NOS. NF-κB se nalazi u citoplazmi, a kad se aktivira odlazi u jezgru gdje potakne transkripciju više od 200 gena koji, između ostalog, pojačavaju upalni odgovor. Polifenoli suzbijaju aktivaciju NF-κB i tako djeluju protuupalno. NAG-1 djeluje protuupalno, a sam mehanizam djelovanja nije do kraja istražen. Polifenoli potiču ekspresiju NAG-1, što također pridonosi protuupalnom djelovanju (Yoon i Baek, 2005).

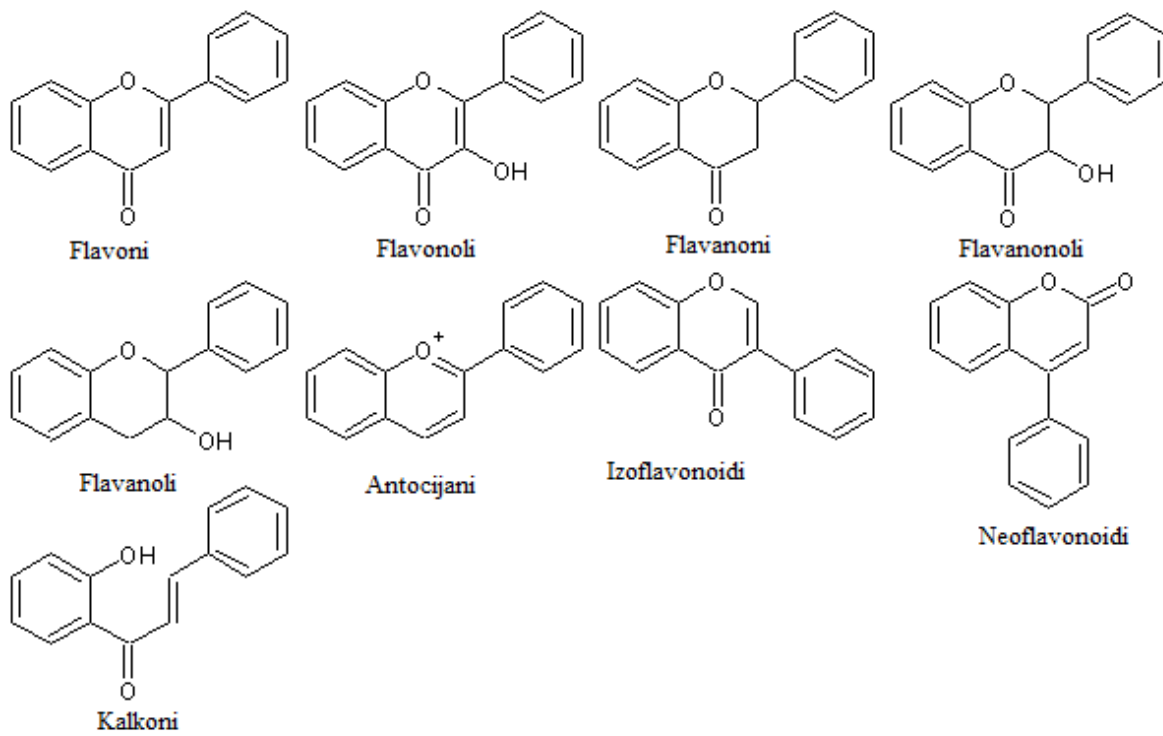
### 1.5.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi su skupina prirodnih spojeva nađenih u biljkama koji mogu biti različite fenolne strukture. Prvi flavonoid izoliran je 1930. godine iz naranče, tada se mislilo da je riječ o vitaminu pa su mu dali ime vitamin P. Kasnije se saznalo da se radi o rutinu, a do danas je identificirano više od 4000 različitih flavonoida. U strukturi flavonoida nalazi se 15 ugljikovih atoma raspoređenih u dva benzenska prstena (A i B) koji su povezani heterocikličkim prstenom – pironom (C) (Slika 5.) (Kumar i Pandey, 2013).



**Slika 5.** Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi se pojavljuju kao aglikoni, heterozidi i njihovi metilirani derivati. Osnovna struktura flavonoida je aglikon. Šesteročlani prsten koji povezuje prstene A i B može biti  $\alpha$ -piron ili njegov dihidro-derivat. Flavonoidi su često hidroksilirani na položajima 3, 5, 7, 2, 3', 4' i 5' (Kumar i Pandey, 2013). Mogu se podijeliti u različite podskupine ovisno o ugljikovom atomu u prstenu C na koji se veže prsten B i o stupnju nezasićenosti i oksidacije prstena C. Spojevi kod kojih je prsten B vezan na položaju 3 prstena C zovu se izoflavonoidi, na položaju 4 neoflavonoidi, a na položaju 2 flavonoidi. Ovisno o značajkama prstena C flavonoidi se dalje dijele na flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, flavanole (katehine), antocijane i kalkone (Slika 6.) (Panche i sur., 2016).



**Slika 6.** Strukture flavonoida ([www.tuscany-diet.net](http://www.tuscany-diet.net))

### **1.5.1.1. Biološki učinci**

#### **Antioksidativni učinak**

Najbolje opisano svojstvo gotovo svake skupine flavonoida je njihova sposobnost da djeluju kao antioksidansi. Čini se kako flavoni i katehini najbolje štite organizam od reaktivnih kisikovih vrsta (Nijveldt i sur., 2001). Mehanizam aktivnosti je ranije opisan i isti je kao kod ostalih fenolnih spojeva.

#### **Antiaterosklerotski učinak**

Zbog njihove antioksidativne aktivnosti, smatra se da flavonoidi imaju veliki utjecaj na kardiovaskularni sustav. Radikali kisika mogu oksidirati LDL (engl. low-density lipoproteins), to oštećuje endotel krvnih žila i tako potiče aterosklerotske promjene. U nekoliko kliničkih istraživanja istaknuto je da unos flavonoida štiti od razvoja koronarnih bolesti srca. Oksidativni stres i oštećenje krvnih žila mogu potaknuti razvoj demencije i smatra se da se unosom flavonoida taj rizik smanjuje (Nijveldt i sur., 2001).

#### **Protuupalni učinak**

Ciklooksigenaza (COX) i lipooksigenaza (LOX) su važni kemijski posrednici upale. Uključeni su u otpuštanje arahidonske kiseline (ARA) koja započinje upalni odgovor. Neutrofili koji sadrže LOX stvaraju kemotaktične spojeve iz ARA i izazivaju otpuštanje citokina. Pokazano je da određeni fenolni spojevi inhibiraju ciklooksigenazni i lipooksigenazni put i tako smanjuju otpuštanje ARA. Točan mehanizam kojim flavonoidi inhibiraju ove enzime nije poznat. Drugi način na koji sprječavaju upalu je inhibicija biosinteze eikozanoida koji su krajnji produkti puteva COX i LOX. Flavonoidi mogu inhibirati degranulaciju neutrofila i na taj način sprječavaju oslobađanje ARA (Nijveldt i sur., 2001).

## **Antibakterijski učinak**

Poznato je da se flavonoidi sintetiziraju u biljkama kao odgovor na infekcije pa ne iznenađuje činjenica da je *in vitro* dokazana njihova antimikrobna aktivnost, a djeluju na široki spektar mikroorganizama. Ekstrakti različitih vrsta biljaka koje su bogate flavonoidima pokazuju antibakterijski učinak. Neki od mogućih mehanizama antibakterijskog djelovanja su inhibicija enzima, transportnih proteina i adhezije bakterija, a hidrofobni flavonoidi se mogu ugraditi u bakterijsku membranu i na taj način poremetiti strukturu same membrane (Kumar i Pandey, 2013).

## **Antitumorski učinak**

Potrošnja luka i/ili jabuka, dva glavna izvora kvercetina, povezana je sa smanjenom pojavnošću karcinoma prostate, pluća, želuca i dojke. Pokazalo se da ljudi koji piju umjerene količine crnog vina imaju manji rizik razvoja karcinoma pluća, endometrija, jednjaka, želuca i kolona. Nekoliko je mogućih mehanizama antitumorskog djelovanja flavonoida: sprječavanje djelovanja mutiranog proteina p53, zaustavljanje staničnog ciklusa, inhibicija tirozin kinaze, inhibicija proteina toplinskog šoka i inhibicija ekspresije Ras proteina (Kumar i Pandey, 2013).

### **1.5.2. KSANTONI – biološki učinci**

Biološka aktivnost ksantona ovisi o položaju supstituenata na tricikličkom prstenu, a među brojnim učincima ističu se antioksidativni, antihipertenzivni, hepatoprotektivni, antitrombotski i antitumorski učinak, a djeluju i kao inhibitori monoamin oksidaze (Panda i sur., 2013).

Magniferin, koji se nalazi u perunikama, ima brojna djelovanja kao što su antioksidativno, antidijabetičko, kardioprotektivno, neuroprotektivno, protuupalno, antipiretsko, analgetsko, antibakterijsko i imunomodulatorno djelovanje (Du i sur., 2018).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vrste *I. illyrica* i *I. pseudopallida* pripadaju hrvatskoj flori i do sada su neistražene. U drugim biljnim vrstama roda *Iris* pronađena je velika količina polifenola, a među njima se ističu flavonoidi. Najvećim dijelom nalaze se u podancima i listovima.

Jedan od ciljeva ovog rada je usporedba sadržaja polifenola i flavonoida iz ekstrakata listova i podanaka navedenih dviju vrsta.

Sljedeći cilj bio je odrediti antioksidativni učinak iz priređenih ekstrakata, a u tu svrhu korišten je ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina) test.

Prisutnost flavonoida (polifenola) u biljnim vrstama često se povezuje s antioksidativnim učinkom pa je u radu također istražena njihova korelacija.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. BILJNI MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su na sobnoj temperaturi osušeni i potom usitnjeni podanci i listovi sljedećih biljnih vrsta:

- ❖ *I. illyrica*, skupljena u travnju 2019. godine u Zatonu kod Šibenika (Slika 7.),
- ❖ *I. pseudopallida*, skupljena u travnju 2019. godine u Topićima kod Baške Vode (Slika 8.).



**Slika 7.** Vrsta *I. illyrica* (foto: Ivan Duka)



**Slika 8.** Vrsta *I. pseudopallida* (foto: Ivan Duka)

### **3.2. APARATI I KEMIKALIJE**

Za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja flavonoida i polifenola te antioksidativnog učinka (ABTS test) upotrebljen je UV-VIS spektrofotometar T70 (proizvod tvrtke PG Instruments Ltd, Velika Britanija). U ispitivanjima je korištena precizna analitička vaga PB303 DeltaRange (proizvod tvrtke Mettler Toledo, SAD) i magnetska mješalica s grijanjem (proizvod tvrtke Witeg, Njemačka). Kromatogram je dobiven stavljanjem ploče u uređaj EPI-Chemi Darkroom (proizvod tvrtke UVP LLC, SAD). Navedeni uređaji pripadaju Zavodu za farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska.

Za pripremu ekstrakta upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- ❖ 96%-tni etanol (Lach-Ner, Češka),
- ❖ destilirana voda.

Za tankoslojnu kromatografiju upotrijebljeni su:

- ❖ etilacetat (Lach-Ner, Češka),
- ❖ 98-100%-tna mravlja kiselina (Scharlau, Španjolska),
- ❖ 99,8%-tna octena kiselina (J. T. Baker, SAD),
- ❖ destilirana voda,
- ❖ 1%-tna metanolna otopina 2-aminoetil difenilborinata (Fluka, Švicarska),
- ❖ 5%-tna etanolna otopina polietilenglikola (PEG) 4000 (Fluka, Švicarska).

Za određivanje količine polifenola upotrijebljeni su:

- ❖ 96%-tni etanol (Lach-Ner, Češka),
- ❖ 98%-tni standard galne kiseline (ACROS Organics, Belgija),
- ❖ Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska),
- ❖ destilirana voda,
- ❖ 7,5%-tna vodena otopina natrijevog karbonata (Kemika, Hrvatska).

Za određivanje količine flavonoida upotrijebljeni su:

- ❖ 96%-tni etanol (Lach-Ner, Češka),
- ❖ 99%-tni aluminijev klorid heksahidrat ( $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, SAD),
- ❖ 95%-tni standard kvercetina (Sigma-Aldrich, SAD),
- ❖ destilirana voda.

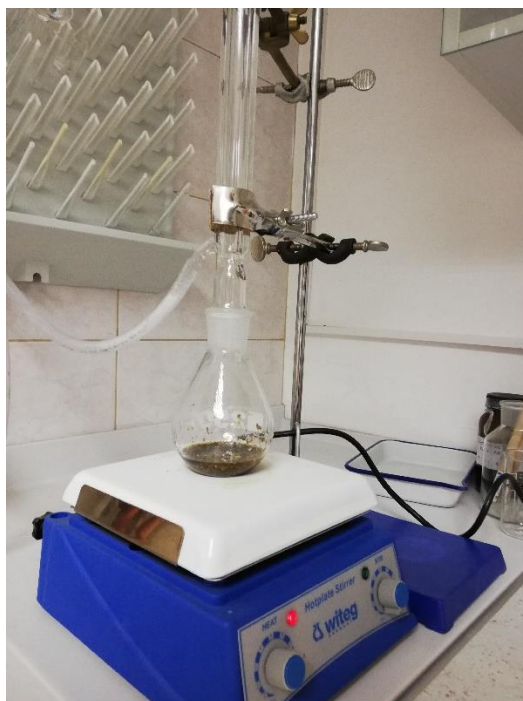
Za antioksidativni test upotrijebljeni su:

- ❖ 96%-tni etanol (Lach-Ner, Češka),
- ❖ kalijev peroksidisulfat (Kemika, Hrvatska),
- ❖ 98%-tni standard galne kiseline (ACROS Organics, Belgija),
- ❖ diamonijeva sol 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS reagens) (Sigma Aldrich, SAD),
- ❖ destilirana voda.

### 3.3. METODE ISPITIVANJA

#### 3.3.1. Priprema ekstrakata

Prije početka same ekstrakcije potrebno je usitniti biljni materijal. Od usitnjenog biljnog materijala izvaže se 1,25 g u tikvicu s ravnim dnom od 250,0 mL i doda 25 mL prethodno pripravljene vodenoalkoholne otopine, koja se sastoji od 80% etanola (96%-tni) i 20% destilirane vode. U većini slučajeva se kao otapalo upotrebljava metanol, ali zbog njegove toksičnosti ekološki je prihvatljivija uporaba etanola. Ekstrahira se u refluksnim uvjetima, s povratnim hladilom (Slika 9.). Listovi se ekstrahiraju 45 minuta, a podanci 90 minuta. Nakon što se ekstrakt ohladi, filtrira se preko vate i naboranog filter papira u odmjernu tikvicu od 25,0 mL. Ukoliko nakon filtracije u tikvici nema 25 mL ekstrakta, biljni materijal se ispiri s vodenoalkoholnom otopinom i nadopuni do oznake na tikvici (Stalikas, 2007).



**Slika 9.** Ekstrakcija biljnog materijala

### 3.3.2. Tankoslojna kromatografija

Kao nepokretna (stacionarna) faza upotrebljava se ploča TLC silikagel F256 (Merck). Pokretna (mobilna) faza priprema se iz etilacetata, mravlje kiseline, ledene octene kiseline (99,8%-tna) i destilirane vode u omjeru 100: 11: 11: 26 (V/V/V/V). Uzorci su nerazrijeđeni ekstrakti listova i podanaka. 20  $\mu$ L uzorka nanosi se na ploču, približno 2 cm od donjeg ruba. Ploča se uroni u mobilnu fazu koja ne smije biti u doticaju s nanesenim uzorcima, a put mobilne faze može iznositi najviše 8 cm. Nakon završene kromatografije slijedi detekcija. Reagens koji se upotrebljava za otkrivanje flavonoida je NP/PEG (engl. Natural products-polyethylene glycol). Ploča se najprije šprica metanolnom otopinom 2-aminoetil difenilborinata koji pojačava fluorescenciju, a zatim etanolnom otopinom polietilenglikola koji pojačava osjetljivost što poboljšava vidljivost rezultata. Ploča se promatra pod UV zračenjem od 365 nm, a u tim uvjetima flavonoidi fluoresciraju žuto, zeleno, narančasto ili svijetloplavo (Wagner i Blatt, 1996).

### 3.3.3 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola određuje se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na primjeni Folin-Ciocalteuvog reagensa (Singleton i Rossi, 1965). Reagens se reducira u prisutnosti fenolnog iona i dolazi do promjene njegove boje. Fenolati ion dobije se dodatkom lužnate otopine natrijevog karbonata fenolima, koji su slabe kiseline.

Reagens se razrijedi deset puta tako da se u 5 mL reagensa doda 45 mL destilirane vode. U odmjernu tikvicu od 50,0 mL izvaže se 3,75 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , dopuni destiliranom vodom do oznake (7,5%-tna otopina). Kao standard koristi se galna kiselina (0,1 mg/mL). 20 mg standarda galne kiseline otopi se u 20 mL etanola (1 mg/mL), iz te otopine uzme se 5 mL i prenese u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te dopuni etanolom do oznake (0,1 mg/mL). Napravi se koncentracijski niz otopina standarda galne kiseline iz kojeg se dobije baždarni pravac. Koncentracije su:

- 10  $\mu\text{g/mL}$  (200  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 1800  $\mu\text{L}$  etanola),
- 20  $\mu\text{g/mL}$  (400  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 1600  $\mu\text{L}$  etanola),
- 40  $\mu\text{g/mL}$  (800  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 1200  $\mu\text{L}$  etanola),
- 60  $\mu\text{g/mL}$  (1200  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 800  $\mu\text{L}$  etanola),
- 80  $\mu\text{g/mL}$  (1600  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 400  $\mu\text{L}$  etanola),
- 100  $\mu\text{g/mL}$  (2000  $\mu\text{L}$  otopine standarda).

Prethodno pripremljeni biljni ekstrakti razrijede se vodenoalkoholnom otopinom u omjeru 1:20 (0,5 mL ekstrakta + 9,5 mL vodenoalkoholne otopine). U epruvetu se stavi 0,25 mL standarda, odnosno razrijeđenog biljnog ekstrakta, doda se 1,25 mL pripremljenog reagensa, a nakon 5 minuta 1 mL 7,5%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nakon sat vremena inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi mjeri se apsorbancija na 765 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu (Slika 10.). Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM).



**Slika 10.** Koncentracijski niz standarda galne kiseline nakon sat vremena inkubacije



### 3.3.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida upotrebljava se spektrofotometrijska metoda temeljena na stvaranju stabilnog kompleksa flavonoida i aluminijevih iona (Arvouet-Grand i sur., 1994).

Kao reagens upotrebljava se 2%-tna otopina aluminijevog klorida heksahidrata ( $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) dobivena otapanjem 2 g  $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u 100 mL etanola. Standard je 0,1 mg/mL otopina kvercetina. 0,05 g standarda kvercetina otopi se u 50 mL etanola (1 mg/mL), iz te otopine se uzme 10 mL, prenese u odmjernu tikvicu od 100,0 mL i dopuni etanolom do oznake (0,1 mg/mL). Napravi se koncentracijski niz otopina standarda kvercetina i iz toga se dobije baždarni pravac.

Koncentracije su:

- 5  $\mu\text{g/mL}$  (250  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 4750  $\mu\text{L}$  etanola),
- 10  $\mu\text{g/mL}$  (500  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 4500  $\mu\text{L}$  etanola),
- 15  $\mu\text{g/mL}$  (750  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 4250  $\mu\text{L}$  etanola),
- 20  $\mu\text{g/mL}$  (1000  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 4000  $\mu\text{L}$  etanola),
- 25  $\mu\text{g/mL}$  (1250  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 3750  $\mu\text{L}$  etanola),
- 30  $\mu\text{g/mL}$  (1500  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 3500  $\mu\text{L}$  etanola).

Po 1 mL svake koncentracije stavi se u 3 epruvete, postupak se radi dva puta uz slijepu probu za svaku koncentraciju. U slijepu probu se doda etanol umjesto reagensa. U epruvete se zatim doda 1 mL pripremljenog reagensa, reakcija se odvija 15 minuta i potom se mjeri apsorbancija na 415 nm (Slika 11.).

Biljni ekstrakti razrijede se vodenoalkoholnom otopinom. Mjeri se tri puta i za svaki uzorak je potrebna jedna slijepa proba. U epruvetu se stavi 1 mL uzorka, zatim se doda 1 mL reagensa, reakcija se odvija 15 minuta te se potom mjeri apsorbancija na 415 nm. Tijekom mjerenja apsorbancije, slijepa proba se stavlja u jednu kivetu, a uzorak, ili standard kvercetina u drugu da reagens ne zaostane u kiveti sa slijepom probom. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM).



**Slika 11.** Koncentracijski niz standarda kvercetina nakon 15 minuta reakcije

### 3.3.5. Određivanje antioksidativnog učinka (ABTS test)

Za određivanje antioksidativnog učinka korištena je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na gubitku boje reagensa nakon dodatka antioksidansa (Re i sur., 1999).

Reagens za ovu metodu je ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina)). Nakon inkubacije, koja traje od 12 do 16 sati, vodene otopine diamonijeve soli ABTS (7 mmol/L) s kalijevim peroksodisulfatom (2,45 mmol/L) na sobnoj temperaturi u mraku dobiva se kationski radikal ( $ABTS^{\cdot+}$ ). Dobivenu otopinu potrebno je razrijediti etanolom sve dok apsorbancija na 734 nm ne iznosi  $0,70 \pm 0,02$ . Dodatkom antioksidansa u pripremljenu otopinu,  $ABTS^{\cdot+}$  se reducira i dolazi do gubitka boje. Standard je otopina galne kiseline (1 mg/mL), a dobije se otapanjem 20 mg standarda galne kiseline u 20 mL etanola. Baždarni pravac dobiven je iz koncentracijskog niza otopina standarda:

40  $\mu\text{g/mL}$  (40  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 960  $\mu\text{L}$  etanola),

80  $\mu\text{g/mL}$  (80  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 920  $\mu\text{L}$  etanola),

120  $\mu\text{g/mL}$  (120  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 880  $\mu\text{L}$  etanola),

160  $\mu\text{g/mL}$  (160  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 840  $\mu\text{L}$  etanola),

200  $\mu\text{g/mL}$  (200  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 800  $\mu\text{L}$  etanola),

240  $\mu\text{g/mL}$  (240  $\mu\text{L}$  otopine standarda + 760  $\mu\text{L}$  etanola).

Ukoliko je potrebno, biljni ekstrakti se razrijede vodenoalkoholnom otopinom. U epruvetu se doda 2 mL reagensa i 10  $\mu\text{L}$  uzorka, odnosno standarda galne kiseline, a nakon jedne minute mjeri se apsorbancija na 734 nm. Kao slijepa proba koristi se destilirana voda. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM).

### 3.3.6. Statistička obrada podataka

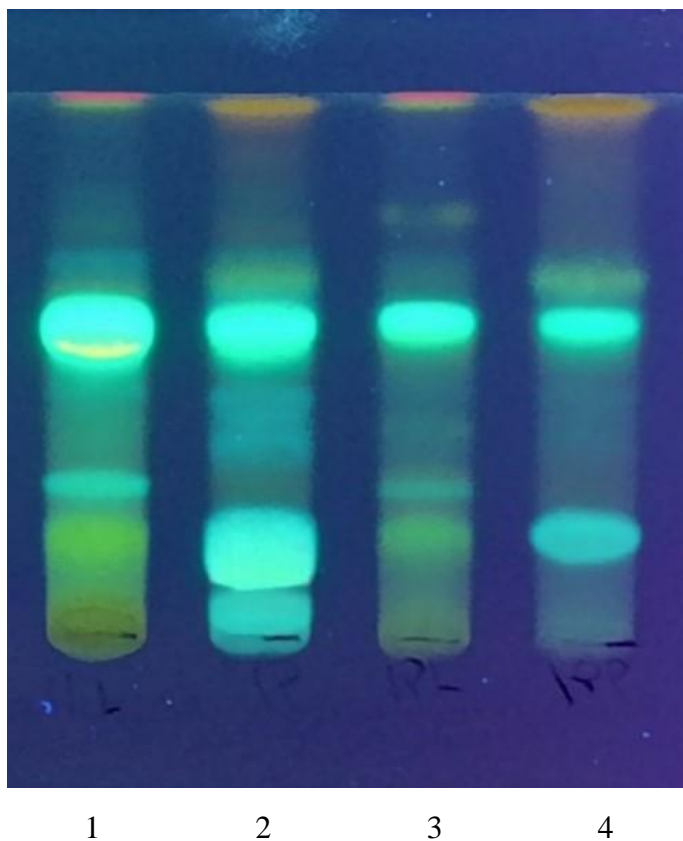
Kod izrade baždarnih pravaca mjerenja su provedena dva puta, a kod određivanja sadržaja polifenola, flavonoida i kod određivanja antioksidativnog učinka mjerenja su provedena tri puta. Obrada svih dobivenih podataka provedena je u programu Microsoft Excel 2017 (Microsoft).

Povezanost između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i antioksidativnog učinka procijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije,  $r$ , uz razinu statističke značajnosti  $p < 0,05$ . Rezultati su dobiveni u dva različita programa, Microsoft Excel 2017 i GraphPad Prism 8.2.1 for Windows (GraphPad Software).

## 4. REZULTATI

### 4.1. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA

Kromatogram je dobiven stavljanjem ploče u uređaj EPI-Chemi Darkroom (Slika 12.).



**Slika 12.** Kromatogram ispitivanih biljnih ekstrakata:

- 1 – ekstrakt lista vrste *I. illyrica*
- 2 – ekstrakt podanka vrste *I. illyrica*
- 3 – ekstrakt lista vrste *I. pseudopallida*
- 4 – ekstrakt podanka vrste *I. pseudopallida*

Za svaki uzorak izmjeren je put mobilne faze ( $Z_f - Z_0$ ) i čimbenik zaostajanja ( $R_F$ ) (Tablica 2.).  $R_F$  vrijednost dobivena je dijeljenjem puta kojeg je prešao uzorak ( $Z_x$ ) i puta mobilne faze, a na temelju te vrijednosti moguće je pretpostaviti o kojoj sastavnici se radi.

**Tablica 2.** Rezultati tankoslojne kromatografije

Biljna vrsta	Organ	$Z_f - Z_0$ /cm	$Z_x$ /cm	$R_F$	Boja
<i>I. illyrica</i>	list	6,8	3,9	0,57	plavozeleno
			2,0	0,29	svijetloplavo
			1,3	0,19	zeleno
<i>I. illyrica</i>	podanak	6,8	4,6	0,68	zeleno
			3,9	0,57	plavozeleno
			1,3	0,19	svijetloplavo
<i>I. pseudopallida</i>	list	6,8	4,0	0,59	plavozeleno
			1,9	0,28	svijetloplavo
			1,4	0,21	zeleno
<i>I. pseudopallida</i>	podanak	6,9	4,5	0,65	zeleno
			4,0	0,58	plavozeleno
			1,4	0,20	svijetloplavo

$Z_f - Z_0$  – udaljenost koju prijeđe pokretna faza od starta ispitivane supstancije;  $Z_f$  predstavlja udaljenost koju prijeđe pokretna faza, a  $Z_0$  udaljenost od starta do početka pokretne faze

$Z_x$  – udaljenost koju prijeđe uzorak od starta

$R_F$  – odnos udaljenosti koju prijeđe uzorak i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza (Kaštelan-Macan i sur., 2006):

$$R_F = Z_x / (Z_f - Z_0).$$

Svi uzorci pokazuju fluorescenciju na dvije približno iste  $R_F$  vrijednosti, ~0,20 i ~0,58. Intenzitet većine mrlja vrste *I. illyrica* veći je od intenziteta vrste *I. pseudopallida* što ukazuje na kvantitativne razlike.

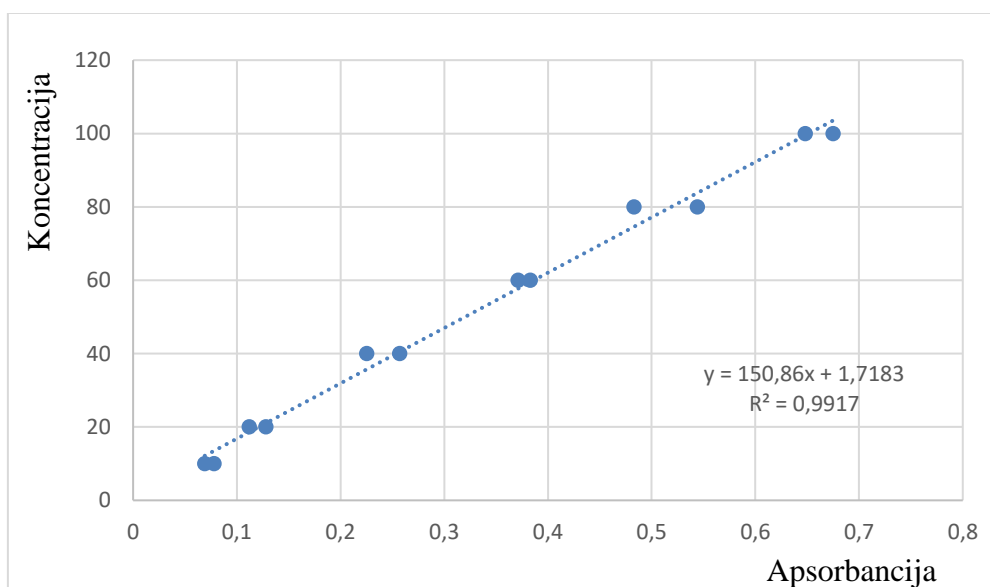
## 4.2. ODREĐIVANJE POLIFENOLA

### 4.2.1. Baždarni pravac galne kiseline

Galna kiselina koristi se kao standard. Napravi se koncentracijski niz otopina galne kiseline i za svaku koncentraciju se prema opisanoj metodi izmjeri apsorbancija (Tablica 3.). Apsorbancija svake koncentracije mjeri se dva puta. Za izradu baždarnog pravca koncentracije u tablici (c) su korigirane čimbenikom (faktorom) korekcije, f, koji iznosi 0,98, odnosno  $c'=c*0,98$ . Iz izmjerenih vrijednosti dobije se baždarni pravac (Slika 13.).

**Tablica 3.** Koncentracije i izmjerene apsorbancije standarda galne kiseline

c (GK)/( $\mu\text{g/mL}$ )	Apsorbancija 1	Apsorbancija 2
10	0,078	0,069
20	0,112	0,128
40	0,225	0,257
60	0,383	0,371
80	0,483	0,544
100	0,675	0,648



**Slika 13.** Baždarni pravac galne kiseline za određivanje sadržaja ukupnih polifenola dobiven mjerenjem apsorbancija različitih koncentracija standarda galne kiseline

#### 4.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sva mjerenja provedena su tri puta. Mjeri se apsorbancija uzorka, a iz baždarnog pravca očita se koncentracija (Tablica 4.). Uzorci su razrijeđeni 20 puta pa se dobivene koncentracije moraju pomnožiti s 20.

$$c=c'*20$$

Miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (x) dobiveni su iz sljedeće formule:

$$x=0,001*c*V/m$$

0,001 – čimbenik pretvorbe  $\mu\text{g}$  u mg,

c – koncentracija nerazrijeđenog uzorka ( $\mu\text{g/mL}$ ),

m – masa suhog biljnog materijala (1,25 g),

V – volumen ekstrakta (25 mL).

Dobivene su tri vrijednosti iz kojih se izračuna srednja vrijednost:

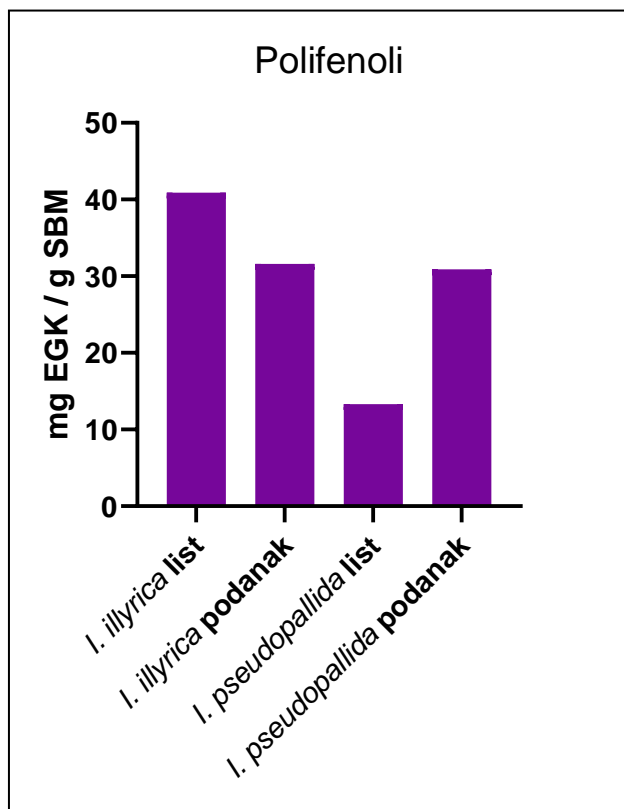
$$\bar{x}=(x_1+x_2+x_3)/3$$

**Tablica 4.** Sadržaj ukupnih polifenola u istraživanim uzorcima

Vrsta	Organ	A	c'	c	Masa SBM/g	mg EGK/g SBM	$\bar{x}$
<i>I. illyrica</i>	list	0,661	101,4	1988,2	1,251	39,73	40,89
		0,684	104,9	2056,2		41,09	
		0,697	106,9	2094,6		41,86	
	podanak	0,479	74,0	1450,0	1,250	29,00	31,64
		0,546	84,1	1648,1		32,96	
		0,546	84,1	1648,1		32,96	
<i>I. pseudopallida</i>	list	0,188	30,1	589,6	1,168	12,62	13,29
		0,199	31,7	622,1		13,32	
		0,209	33,2	651,7		13,95	
	podanak	0,455	70,4	1379,0	1,265	27,25	30,94
		0,527	81,2	1591,9		31,46	
		0,572	88,0	1725,0		34,09	



Iz dobivenih rezultata vidljivo je da list vrste *I. illyrica* sadrži najveću količinu polifenola. Podanci vrsta *I. illyrica* i *I. pseudopallida* imaju gotovo jednake količine polifenola dok je najmanje polifenola pronađeno u listu vrste *I. pseudopallida* (Slika 14.).



**Slika 14.** Grafički prikaz usporedbe sadržaja ukupnih polifenola vrsta *I. illyrica* i *I. pseudopallida*

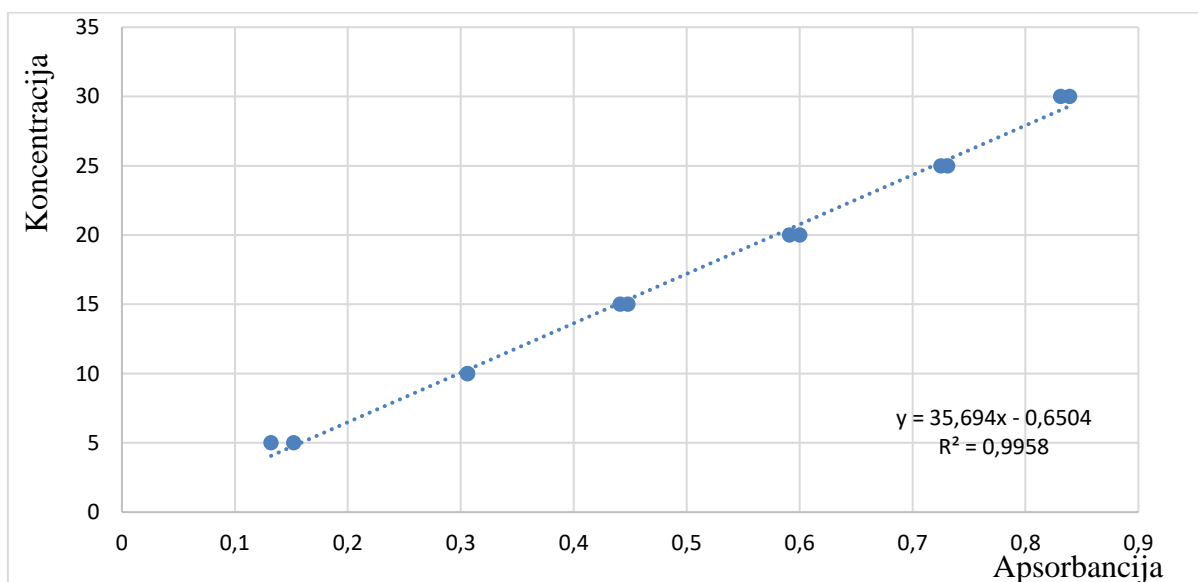
### 4.3. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA

#### 4.3.1. Baždarni pravac kvercetina

Kao standard se upotrebljava kvercetin. Iz koncentracijskog niza otopine kvercetina napravi se baždarni pravac (Slika 15.) mjerenjem apsorbancije otopina za svaku koncentraciju (c) dva puta (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Koncentracije i izmjerene apsorbancije standarda kvercetina

c (K)/( $\mu\text{g/mL}$ )	Apsorbancija 1	Apsorbancija 2
5	0,132	0,152
10	0,306	0,306
15	0,441	0,448
20	0,591	0,600
25	0,725	0,731
30	0,831	0,839



**Slika 15.** Baždarni pravac kvercetina za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida dobiven mjerenjem apsorbancija različitih koncentracija standarda kvercetina

### 4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Mjerenja su provedena tri puta. Mjeri se apsorbancija uzorka, a iz baždarnog pravca se očitava koncentracija (Tablica 6.). Uzorci su razrijeđeni pa se dobivene koncentracije trebaju pomnožiti razrijeđenjem, za podanak vrste *I. illyrica*:

$$c=c'*20,$$

za list vrste *I. illyrica*:

$$c=c'*80,$$

a za podanak i list vrste *I. pseudopallida*:

$$c=c'*10$$

Miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (x) dobiveni su iz sljedeće formule:

$$x=0,001*c*V/m$$

0,001 – čimbenik pretvorbe  $\mu\text{g}$  u mg,

c – koncentracija nerazrijeđenog uzorka ( $\mu\text{g/mL}$ ),

m – masa suhog biljnog materijala (1,25 g),

V – volumen ekstrakta (25 mL).

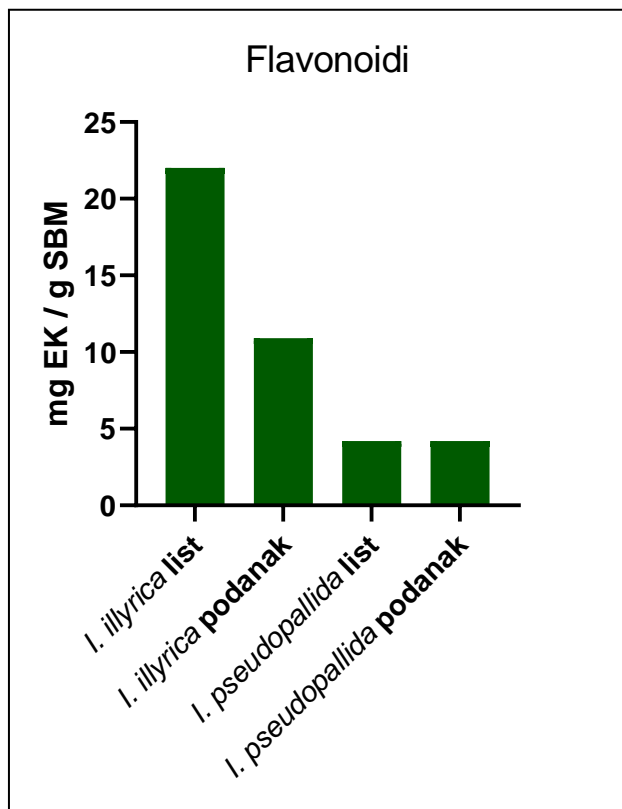
Dobivene su tri vrijednosti iz kojih se izračuna srednja vrijednost:

$$\bar{x}=(x_1+x_2+x_3)/3$$

**Tablica 6.** Sadržaj ukupnih flavonoida u istraživanim uzorcima

Vrsta	Organ	A	c'	c	Masa SBM/g	mg EK/g SBM	$\bar{x}$
<i>I. illyrica</i>	list	0,412	14,1	1068,2	1,251	21,35	22,03
		0,433	14,8	1125,2		22,49	
		0,429	14,7	1114,3		22,27	
	podanak	0,818	28,5	542,4	1,250	10,85	10,93
		0,825	28,8	547,1		10,94	
		0,830	29,0	550,5		11,01	
<i>I. pseudopallida</i>	list	0,575	19,9	188,8	1,168	4,04	4,20
		0,608	21,1	200,0		4,28	
		0,607	21,0	199,7		4,27	
	podanak	0,627	21,7	206,4	1,265	4,08	4,20
		0,655	22,7	215,9		4,27	
		0,652	22,6	214,9		4,25	

Iz rezultata u tablici vidljivo je da list vrste *I. illyrica* ima najveću količinu flavonoida, duplo veću od podanka iste vrste. Vrsta *I. pseudopallida* ima 5,25 puta manju količinu flavonoida od lista vrste *I. illyrica*, a sadržaj flavonoida u listu i podanku je jednak (Slika 16.).



**Slika 16.** Grafički prikaz usporedbe sadržaja ukupnih flavonoida vrsta *I. illyrica* i *I. pseudopallida*

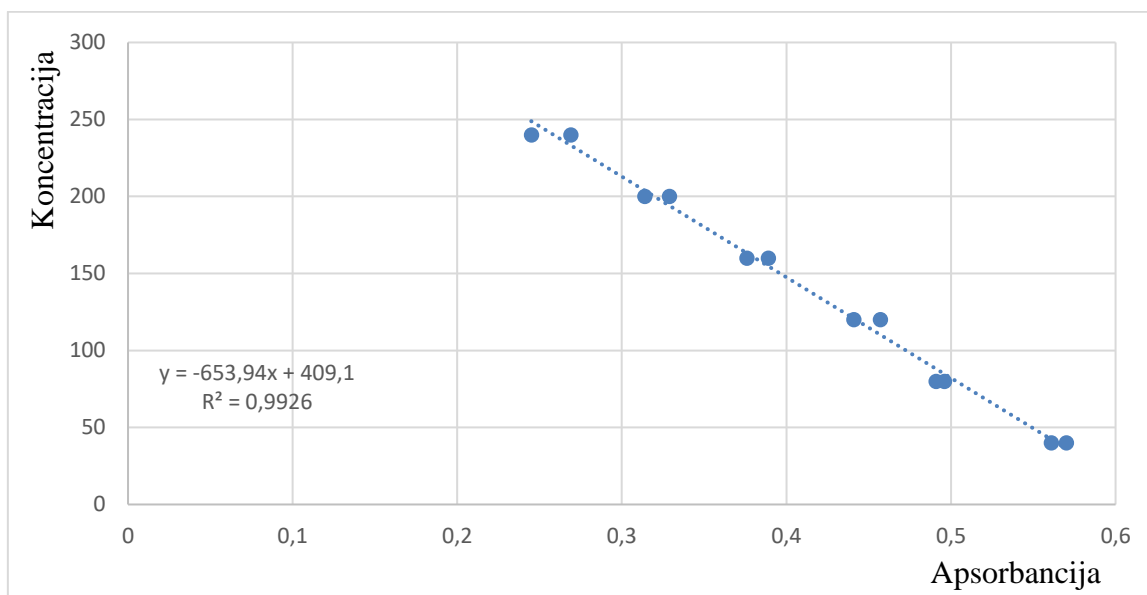
## 4.4. ABTS TEST

### 4.4.1. Baždarni pravac galne kiseline

Sva mjerenja provedena su dva puta. Za otopine svake koncentracije iz niza otopina standarda galne kiseline izmjeri se apsorbancija (Tablica 7.) i iz dobivenih rezultata izradi se baždarni pravac (Slika 17.). Za izradu baždarnog pravca koncentracije u tablici (c) su korigirane čimbenikom (faktorom) korekcije, f, koji iznosi 0,98, odnosno  $c'=c*0,98$ .

**Tablica 7.** Koncentracije i izmjerene apsorbancije standarda galne kiseline

c (GK)/(μg/mL)	Apsorbancija 1	Apsorbancija 2
40	0,561	0,570
80	0,496	0,491
120	0,441	0,457
160	0,389	0,376
200	0,329	0,314
240	0,269	0,245



**Slika 17.** Baždarni pravac galne kiseline za određivanje antioksidativnog učinka dobiven mjerenjem apsorbancije različitih koncentracija standarda galne kiseline

#### 4.4.2. Određivanje antioksidativnog učinka

Mjerenja su provedena tri puta. Mjeri se apsorbancija uzorka, a iz baždarnog pravca se očita koncentracija (Tablica 8.). Svi uzorci osim lista vrste *I. pseudopallida* razrijeđeni su 10 puta. Koncentracije uzoraka koji su razrijeđeni 10 puta dobiju se iz formule:

$$c=c' \cdot 10$$

Miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (x) dobiveni su iz sljedeće formule:

$$x=0,001 \cdot c \cdot V/m$$

0,001 – čimbenik pretvorbe  $\mu\text{g}$  u mg,

c – koncentracija nerazrijeđenog uzorka ( $\mu\text{g/mL}$ ),

m – masa suhog biljnog materijala (1,25 g),

V – volumen ekstrakta (25 mL).

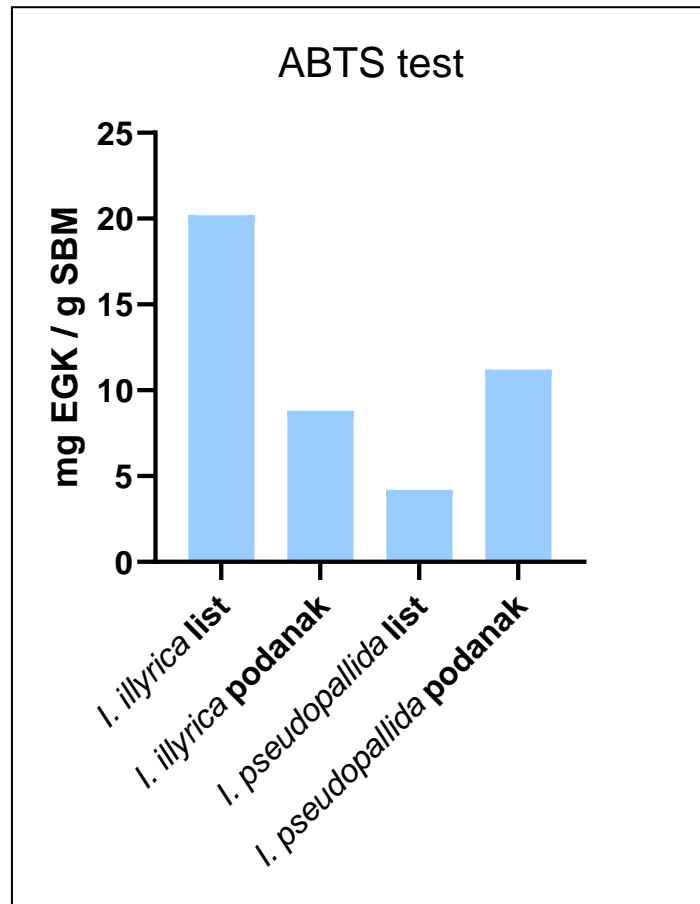
Dobivene su tri vrijednosti iz kojih se izračuna srednja vrijednost:

$$\bar{x}=(x_1+x_2+x_3)/3$$

**Tablica 8.** Podaci dobiveni za određivanje antioksidativnog učinka

Vrsta	Organ	A	c'	c	Masa SBM/g	mg EGK/g SBM	$\bar{x}$
<i>I. illyrica</i>	list	0,472	100,4	1004,4	1,251	20,07	20,16
		0,476	97,8	978,2		19,55	
		0,466	104,4	1043,6		20,86	
	podanak	0,555	46,2	461,6	1,250	9,23	8,80
		0,562	41,6	415,9		8,32	
		0,558	44,2	442,0		8,84	
<i>I. pseudopallida</i>	list	0,313	204,4	204,4	1,168	4,38	4,21
		0,305	209,6	209,6		4,49	
		0,357	175,6	175,6		3,76	
	podanak	0,541	55,3	553,2	1,265	10,93	11,23
		0,534	59,9	599,0		11,84	
		0,541	55,3	553,2		10,93	

List vrste *I. illyrica* pokazuje najbolji antioksidativni učinak, oko 2,3 puta veći nego podanak iste vrste. Kod vrste *I. pseudopallida* podanak pokazuje bolji antioksidativni učinak od lista (Slika 18.).



**Slika 18.** Grafički prikaz usporedbe antioksidativnog učinka vrsta *I. illyrica* i *I. pseudopallida*

## 4.5. KORELACIJA

Za ispitivanje korelacije upotrebljava se Pearsonov test. Vrijednosti Pearsonovog testa korelacije kreću se od -1 do +1. Ukoliko su vrijednosti veće od 0, one pokazuju pozitivnu korelaciju, odnosno sukladan rast vrijednosti obje skupine podataka. U slučaju da koeficijent korelacije zadovoljava postavljenu granicu značajnosti koja obično iznosi  $p < 0,05$ , zaključuje se da je koeficijent korelacije značajan i da se smije tumačiti. Ukoliko je vrijednost  $p > 0,05$ , koeficijent korelacije nije značajan i tada se ne smije tumačiti (Udovičić i sur., 2007). U ovom slučaju je dokazano da postoji korelacija između antioksidativnog učinka, sadržaja polifenola i flavonoida (Tablica 9.). Što je veći sadržaj polifenola i flavonoida, to je veća antioksidativna aktivnost.

**Tablica 9.** Korelacija između sadržaja flavonoida i polifenola i antioksidativnog učinka

Povezanost izmjerenih parametara	Koeficijent korelacije (r)	$p$ vrijednost
Sadržaj flavonoida i polifenola	0,84	$2,88 \times 10^{-7}$
Sadržaj flavonoida i antioksidativni učinak	0,90	$1,72 \times 10^{-9}$
Sadržaj polifenola i antioksidativni učinak	0,93	$2,61 \times 10^{-11}$



## 5. RASPRAVA

Nakon provedene tankoslojne kromatografije na kromatogramu se mogu uočiti svijetloplave mrlje koje predstavljaju izoflavonoide, a više ih ima u podancima nego u listovima. U vrsti *I. germanica* upravo su izoflavonoidi pokazali razne učinke, među kojima su protuupalni i antioksidativni učinak, ali djeluju i kao kemopreventivni i antibakterijski spojevi. Stoga, postoji mogućnost da i ispitivane vrste mogu djelovati na isti način.

Metoda s Folin-Ciocalteuim (FC) reagensom kojom se određivala količina ukupnih polifenola nije specifična samo za njih. Reakciju mogu dati i druge tvari koje mogu promijeniti oksidacijski broj reagensa. U listovima nekih vrsta roda *Iris* nađene su velike količine vitamina C koji zbog svoje strukture može reagirati s FC reagensom i pri tome se oksidirati. Listovi dviju ispitivanih vrsta bi zbog toga mogli pokazivati veći sadržaj polifenola, a time i bolji antioksidativni učinak. Međutim, treba uzeti u obzir da se biljni materijal prije ispitivanja sušio pa postoji mogućnost da se vitamin C tada raspao. Zbog navedenih činjenica, dobiveni sadržaj polifenola ne predstavlja stvarno stanje u biljkama, već predstavlja približnu procjenu količine polifenola.

U provedenim ispitivanjima dokazana je prisutnost polifenola koji imaju razne učinke pa se vrste *I. illyrica* i *I. pseudopallida* potencijalno mogu upotrebljavati kao protuupalna sredstva. Polifenoli su djelotvorni u sprječavanju nastanka karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, kronične upale i poremećaja metabolizma pa je moguće da dvije navedene vrste mogu imati ovakve učinke. Nađene su i velike količine flavonoida koji imaju razne učinke, a među njima su aterosklerotski, antibakterijski i antitumorski učinak. Potrebno je provesti daljnja ispitivanja da bi se dokazale mogućnosti ovakvog djelovanja navedenih vrsta perunika.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitan je sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidativni učinak *in vitro* ekstrakata listova i podanaka vrsta *I. illyrica* i *I. pseudopallida*.

Listovi vrste *I. illyrica* sadrže najveću količinu polifenola i flavonoida pa ne iznenađuje činjenica da pokazuju najbolji antioksidativni učinak od svih ispitanih uzoraka. Iako podanci vrste *I. illyrica* imaju visok sadržaj polifenola i relativno visok sadržaj flavonoida, ne pokazuju tako dobar antioksidativni učinak kao listovi iste vrste. U podancima vrste *I. pseudopallida* dokazana je velika količina polifenola, a količina flavonoida je dosta manja nego kod listova i podanaka vrste *I. illyrica*. Ipak, zbog prisutnosti polifenola imaju jako dobar antioksidativni učinak. Najmanja količina polifenola i flavonoida pronađena je u listovima vrste *I. pseudopallida* pa je i antioksidativni učinak najmanji.

Ispitivane vrste imaju potencijalno dobar učinak na ljudsko zdravlje, ali potrebno je provesti daljnja istraživanja. Ukoliko se sastavnice vrsta *I. illyrica* i *I. pseudopallida* pokažu ekvivalentne sastavnicama pronađenim u drugim vrstama roda *Iris*, moguća je njihova uporaba u dodacima prehrani i biljnim lijekovima.

## 7. LITERATURA

Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *J Pharm Belg*, 1994, 49, 462-468.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 2006, 99, 191-203.

Crişan I, Cantor M. New perspectives on medicinal properties and uses of *Iris* sp. *Hop Med Plants*, 2016, 24, 24-36.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, 15, 7313-7352.

Du S, Liu H, Lei T, Xie X, Wang H, He X, Tong R, Wang Y. Magniferin: An effective therapeutic agent against several disorders. *Mol Med Rep*, 2018, 18, 4775-4786.

Flavonoids: Definition, structure and classification, 2014., <https://www.tuscany-diet.net>, pristupljeno 5. 11. 2019.

Ganesan K, Xu B. A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*, 2017, 9, 455-472.

Glavaš M. Enciklopedija domaćeg ljekovitog bilja. Zagreb, Naklada Ceres, 2019, str. 103.

Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006, str. 51.

Kukula-Koch W, Sieniawska E, Widelski J, Urjin O, Głowniak P, Skalicka-Woźniak K. Major secondary metabolites of *Iris* spp. *Phytochem Rev*, 2013, 14, 51-80.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci World J*, 2013, 2013, 1-16.

Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb, Poljoprivredni nakladni zavod, 1956, str. 566.

Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, Kong M, Li L, Zhang Q, Liu Y, Chen H, Quin W, Wu H, Chen S. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 2016, 21, 1374-1393.

Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 418-425.

Nikolić T. Sistematska botanika, Raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb, ALFA, 2013, str. 424-425.

Nikolić T. ur.: Flora Croatica baza podataka, 2015., <http://hirc.botanic.hr/fcd>, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, pristupljeno 22. 10. 2019.

Nikolić T, Milović M, Bogdanović S, Jasprica N. Endemi u hrvatskoj flori. Zagreb, ALFA, 2015, str. 295-298.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5, 47-62.

Panda SS, Chand M, Sakhuja R, Jain SC. Xanthonas as Potential Antioxidants. *Curr Med Chem*, 2013, 20, 4481-4507.

Perunike – božanski cvjetovi, 2014., <http://www.matica.hr>, pristupljeno 22. 10. 2019.

Rasool SUA, Wani SH, Mir JI. Iris Species: Review and study of phytochemical and genetic diversity of Iris species. Saarbrücken, LAP LAMBERT Academic publishing, 2013, str. 11, 24-25.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26, 1231–1237.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Viticult*, 1965, 16, 144-158.

Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*, 2007, 30, 3268–3295.

Šugar I. Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske. Zagreb, Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša, Zavod za zaštitu prirode, 1994, str. 268.

Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation, *Biochem Med*, 2007, 17, 10–15.

Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Heidelberg, Springer, 1996, str. 349-353.

Wang H, Cui Y, Zhao C. Flavonoids of the Genus *Iris* (Iridaceae). *Mini-Rev Med Chem*, 2010, 10, 643-661.

Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J*, 2005, 46, 585-596.

Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci*, 2016, 8, 33-42.

## 8. SAŽETAK

U ovom radu istraživale su se odabrane vrste roda *Iris*: *Iris illyrica* Tomm. i *Iris pseudopallida* Trinajstić. Biljna vrsta *I. illyrica* skupljena je u Zatonu (Šibenik), a vrsta *I. pseudopallida* u Topićima (Baška Voda).

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida te antioksidativni učinak provedeno je UV-VIS spektrofotometrijskim postupcima. Kao uzorci su upotrebljavani osušeni listovi i podanci navedenih vrsta. Sadržaj ukupnih polifenola izražen je kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM), a sadržaj ukupnih flavonoida kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM). U listovima vrste *I. illyrica* pronađeno je 40,89 mg EGK/g SBM polifenola i 22,03 mg EK/g SBM flavonoida. U podancima iste vrste nađeno je 31,64 mg EGK/g SBM polifenola i 10,93 mg EK/g SBM flavonoida. Listovi vrste *I. pseudopallida* sadrže 13,29 mg EGK/g SBM polifenola i 4,20 mg EK/g SBM flavonoida, a podanci 30,94 mg EGK/g SBM polifenola i 4,20 mg EK/g SBM flavonoida.

Antioksidativni učinak izražen je kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM). U listovima vrste *I. illyrica* iznosi 20,16 mg EGK/g SBM, a u podancima 8,80 mg EGK/g SBM. Antioksidativni učinak listova vrste *I. pseudopallida* iznosi 4,21 mg EGK/g SBM, a podanaka 11,23 mg EGK/g SBM. Dokazana je povezanost sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida s antioksidativnim učinkom. Što je veći sadržaj polifenola i flavonoida, veći je i antioksidativni učinak.

## 8. SUMMARY

In this thesis research was conducted on selected species of the genus *Iris*: *Iris illyrica* Tomm. and *Iris pseudopallida* Trinajstić. *I. illyrica* was collected in Zaton (Šibenik) and *I. pseudopallida* in Topići (Baška Voda).

Quantities of polyphenols and flavonoids were determined by UV-VIS spectrophotometric methods. Antioxidant activity was determined by the same method. The dried leaves and rhizomes of mentioned species were used as samples. Total polyphenols content was expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg GAE/g DPM), and total flavonoids content as milligrams of quercetin equivalent per gram of dry plant material (mg QE/g DPM). In leaves of *I. illyrica* there was 40.89 mg GAE/g DPM of polyphenols and 22.03 mg QE/g DPM of flavonoids. In rhizomes of same species there was 31.64 mg GAE/g DPM of polyphenols and 10.93 mg QE/g DPM flavonoids. Leaves of *I. pseudopallida* contain 13.29 mg GAE/g DPM of polyphenols and 4.20 mg QE/g DPM of flavonoids, and rhizomes contain 30.94 mg GAE/g DPM of polyphenols and 4.20 mg QE/g DPM of flavonoids.

Results of antioxidant activity were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg GAE/g DPM). In leaves of *I. illyrica* antioxidant activity is 20.16 mg GAE/g DPM and in rhizomes 8.80 mg GAE/g DPM. Antioxidant activity of *I. pseudopallida* leaves is 4.21 mg GAE/g DPM and of rhizomes 11.23 mg GAE/g DPM. There is correlation between total polyphenols and flavonoids content and antioxidant activity. The higher the content of polyphenols and flavonoids, the greater antioxidant effect.

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION  
CARD**



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku botaniku  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog učinka u vrstama *Iris illyrica* Tomm. i *Iris pseudopallida* Trinajstić

Danijela Krezić

#### SAŽETAK

U ovom radu istraživale su se odabrane vrste roda *Iris*: *Iris illyrica* Tomm. i *Iris pseudopallida* Trinajstić. Biljna vrsta *I. illyrica* skupljena je u Zatonu (Šibenik), a vrsta *I. pseudopallida* u Topićima (Baška Voda).

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida te antioksidativni učinak provedeno je UV-VIS spektrofotometrijskim postupcima. Kao uzorci su upotrebljavani osušeni listovi i podanci navedenih vrsta. Sadržaj ukupnih polifenola izražen je kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM), a sadržaj ukupnih flavonoida kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM). U listovima vrste *I. illyrica* pronađeno je 40,89 mg EGK/g SBM polifenola i 22,03 mg EK/g SBM flavonoida. U podancima iste vrste nađeno je 31,64 mg EGK/g SBM polifenola i 10,93 mg EK/g SBM flavonoida. Listovi vrste *I. pseudopallida* sadrže 13,29 mg EGK/g SBM polifenola i 4,20 mg EK/g SBM flavonoida, a podanci 30,94 mg EGK/g SBM polifenola i 4,20 mg EK/g SBM flavonoida.

Antioksidativni učinak izražen je kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM). U listovima vrste *I. illyrica* iznosi 20,16 mg EGK/g SBM, a u podancima 8,80 mg EGK/g SBM. Antioksidativni učinak listova vrste *I. pseudopallida* iznosi 4,21 mg EGK/g SBM, a podanaka 11,23 mg EGK/g SBM. Dokazana je povezanost sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida s antioksidativnim učinkom. Što je veći sadržaj polifenola i flavonoida, veći je i antioksidativni učinak.

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

Rad sadrži: 50 stranica, 18 grafičkih prikaza, 9 tablica i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *I. illyrica*, *I. pseudopallida*, polifenoli, flavonoidi, antioksidativni učinak, spektrofotometrija

Mentor: **Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Biljana Nigović**, redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Botany  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

### Quantitative analysis of phenolic compounds and determination of antioxidant effect in species *Iris illyrica* Tomm. and *Iris pseudopallida* Trinajstić

Danijela Krezić

#### SUMMARY

In this thesis research was conducted on selected species of the genus *Iris*: *Iris illyrica* Tomm. and *Iris pseudopallida* Trinajstić. *I. illyrica* was collected in Zaton (Šibenik) and *I. pseudopallida* in Topići (Baška Voda). Quantities of polyphenols and flavonoids were determined by UV-VIS spectrophotometric methods. Antioxidant activity was determined by the same method. The dried leaves and rhizomes of mentioned species were used as samples. Total polyphenols content was expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg GAE/g DPM), and total flavonoids content as milligrams of quercetin equivalent per gram of dry plant material (mg QE/g DPM). In leaves of *I. illyrica* there was 40.89 mg GAE/g DPM of polyphenols and 22.03 mg QE/g DPM of flavonoids. In rhizomes of same species there was 31.64 mg GAE/g DPM of polyphenols and 10.93 mg QE/g DPM of flavonoids. Leaves of *I. pseudopallida* contain 13.29 mg GAE/g DPM of polyphenols and 4.20 mg QE/g DPM of flavonoids, and rhizomes contain 30.94 mg GAE/g DPM of polyphenols and 4.20 mg QE/g DPM of flavonoids. Results of antioxidant activity were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg GAE/g DPM). In leaves of *I. illyrica* antioxidant activity is 20.16 mg GAE/g DPM and in rhizomes 8.80 mg GAE/g DPM. Antioxidant activity of *I. pseudopallida* leaves is 4.21 mg GAE/g DPM and of rhizomes 11.23 mg GAE/g DPM. There is correlation between total polyphenols and flavonoids content and antioxidant activity. The higher the content of polyphenols and flavonoids, the greater antioxidant effect.

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

Thesis includes: 50 pages, 18 figures, 9 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *I. illyrica*, *I. pseudopallida*, polyphenols, flavonoids, antioxidant effect, spectrophotometry

Mentor: **Željko Maleš, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željko Maleš, Ph.D.** Full Professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Biljana Nigović, Ph.D.** Full Professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2020.

