

# Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina odabranih vrsta roda Veronica L. (Plantaginaceas)

---

Molc, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:261696>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

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



**Nives Molc**

**Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih  
kiselina odabranih vrsta roda *Veronica* L.  
(Plantaginaceae)**

**DIPLOMSKI RAD**

**Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu**

**Zagreb, 2021.**

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

*Zahvaljujem prvenstveno mentorici, prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić, na pomoći, trudu i razumijevanju ukazanima prilikom izrade ovoga diplomskog rada te dr. sc. Dariu Kremeru na pomoći u sabiranju i determiniranju biljnog materijala te pisanju botaničkog dijela rada. Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci tijekom cijelog studija.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Botanički podatci.....	2
1.1.1. Porodica Plantaginaceae (trpučevke).....	2
1.1.2. Rod <i>Veronica</i> L. (čestoslavica).....	2
1.1.3. Odabrane biljne vrste roda <i>Veronica</i> L. (Plantaginaceae) .....	3
1.2. Pregled istraživanja odabranih biljnih vrsta.....	6
1.3. Ispitivane biološki aktivne tvari odabranih biljnih vrsta .....	8
1.3.1. Polifenolni spojevi.....	8
1.3.2. Fenolne kiseline.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Biljni materijal .....	15
3.2. Aparatura i kemikalije .....	16
3.3. Metode i postupci istraživanja .....	17
3.3.1. Kvalitativna analiza polifenolnih spojeva .....	17
3.3.2. Kvalitativna analiza fenolnih kiselina .....	18
3.3.3. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	22
4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenolnih spojeva .....	22
4.2. Rezultati kvalitativne analize fenolnih kiselina .....	28
4.3. Rezultati kvantitativne analize fenolnih kiselina.....	35
5. ZAKLJUČCI.....	44
6. LITERATURA.....	46
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	50
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

Liječenje biljkama predstavlja jedan od najstarijih oblika tretiranja različitih bolesti. Kroz povijest su ljudi širom svijeta primjenjivali ljekovito bilje kao središte umijeća liječenja. U 20. stoljeću dolazi do razvoja potpuno sintetiziranih lijekova, međutim, mnoge biljke i danas imaju definirano mjesto u znanstvenoj farmaciji i medicini te se koriste u terapiji širokog spektra zdravstvenih tegoba i bolesti.

Fitoterapija predstavlja upotrebu pripravaka/lijekova biljnog podrijetla, bilo kao cjelovitih biljaka, njihovih dijelova, sastojaka ili pripremljenih ekstrakata, u liječenju i prevenciji bolesti. Ona uključuje proučavanje biljaka radi utvrđivanja njihova kemizma i ljekovitih svojstava te mogućnosti njihove primjene u tretiranju različitih zdravstvenih tegoba. Fitoterapija ima široku primjenu iz više različitih aspekata. Mnogi pripravci koji se koriste u homeopatiji fitoterapeutskog su porijekla. Isto tako, ekstrakti biljaka koriste se u pripremi nekih komercijalnih farmaceutskih proizvoda, kao i polusintetskih konvencionalnih lijekova koji svoj sastav temelje na spojevima biljnog podrijetla. Različite biljne vrste kontinuirano se znanstveno proučavaju s ciljem otkrivanja novih bioaktivnih spojeva i njihove potencijalne terapijske primjene.

Odgovorna primjena fitoterapije znači da su korišteni pripravci standardizirani, što znači da se uzgajaju, beru i obrađuju na način koji producira pouzdanu i stabilnu dozu aktivnih sastojaka. Mnogi proizvođači redovito testiraju serije preparata kako bi potvrdili da su aktivni sastojci prisutni i da postoje u određenoj koncentraciji. Kvaliteta i sigurnost također su važna pitanja u fitoterapiji. Zbog nedostatka regulative biljnih preparata u mnogim zemljama, renomirani proizvođači moraju biti u mogućnosti potvrditi svoje proizvode sigurnima za upotrebu. Zato danas fitoterapija, od dijela alternativne i konvencionalne medicine, postaje dijelom moderne, znanstveno utemeljene medicine i važan element terapije. Pri tome je vrlo važno razumjeti mehanizme djelovanja, prepoznati indikacije i kontraindikacije, moguće interakcije, kao i doze koje su potrebne za postizanje željenog djelovanja biljnih pripravaka.

Danas smo sve više svjedoci suživota suvremene medicine i fitoterapije. Rod *Veronica* uključuje brojne vrste koje zaokupljaju pozornost znanstvenika kao slabo istraženi potencijalni izvori ljekovitih tvari. U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna analiza polifenolnih tvari i kvantitativna analiza fenolnih kiselina iz nadzemnih dijelova odabranih vrsta roda *Veronica* L. (Plantaginaceae), a u svrhu fitokemijske karakterizacije i spoznavanja njihovog ljekovitog potencijala.

## 1.1. Botanički podatci

### 1.1.1. Porodica Plantaginaceae (trpučevke)

Porodica Plantaginaceae spada u farmaceutski značajan red *Scrophulariales*, koji uključuje još neke važne biljne porodice kao što su Solanaceae i Scrophulariaceae. Prema nekim autorima (npr. Engler), trpučevke se dovoljno razlikuju od ostalih porodica toga reda te ih oni podižu na razinu reda *Plantaginales* (Jurišić Grubešić, 2003).

Trpučevke su raznolika, kozmopolitska porodica koja se uglavnom javlja u zonama umjerenog klimatskog pojasa ([www.worldoffloweringplants.com](http://www.worldoffloweringplants.com)). Radi se o jednogodišnjim ili višegodišnjim (trajnim) zeljastim biljkama ili polugrmovima. Listovi su jednostavni i nerazdijeljeni, rjeđe perasto urezani ili rascijepljeni, većinom skupljeni u prizemnu rozetu. Ponekad se nalaze na stabljikama i tada su nasuprotno ili naizmjenično postavljeni, bez palistića (Hegi, 1954). Cvjetovi su većinom skupljeni na vrhu stabljike u guste cvatove tipa izduženog ili kuglastog klasa. Pravilni su, većinom dvospolni, rijetko jednospolni i jednodomni. Imaju brakteje. Ocvijeće je dvostruko, sastavljeno iz čaške i vjenčića. Čaška dvospolnih cvjetova razdijeljena je na četiri režnja, a u jednospolnih je na ženskim cvjetovima sastavljena većinom iz tri uska lapa. Vjenčić je sulatičan i suhokožičast. Cjevast je i ima četverokrpasti obod koji je samo u ženskih cvjetova nejasno razvijen. Cvijet ima četiri prašnika jednake duljine koji obično strše daleko iz vjenčića i jedan tučak s nadraslom plodnicom koja je razdijeljena na dva do četiri pretinca, s po jednim ili više sjemenih zametaka. Vrat tučka je dugačak i nerazdijeljen. Plod je većinom tobolac koji se otvara zaklopcem i sadrži dvije ili više sjemenaka, a tek vrlo rijetko plod može biti i jednosjemeni nepucavac (Jurišić Grubešić i Vladimir Knežević, 2004; Domac, 1994; Forenbacher, 1990).

### 1.1.2. Rod *Veronica* L. (čestoslavica)

Rod *Veronica* L. najveći je rod unutar reda *Scrophulariales* (porodice Plantaginaceae) s otprilike 450 vrsta. Ekstremna varijabilnost u morfologiji i jako dobra adaptacija na različite uvjete života omogućila je ovom rodu široku rasprostranjenost na velikom rasponu staništa, od vodenih, močvarnih i šumskih staništa do stijena, polja i ruderalnih staništa (Barreira i sur., 2014). Većina predstavnika raste u područjima mediteranske klime (Nazlić i sur., 2020; Albach i sur., 2004).

Rod obuhvaća zeljaste biljke, s polegnutom do uspravnom stabljikom. Listovi su nasuprotno poredani, ponekad skupljeni u prizemnu rozetu. Cvjetovi su u terminalnim ili pazušnim (aksilarnim) grozdastim cvatovima ili pojedinačni u pazušcima listova. Čaška je duboko razdijeljena na četiri (ponekad pet), često međusobno nejednakih segmenata. Vjenčić je zvonast, s obodom koji je duži od cijevi vjenčića i s četiri nejednaka režnja. Prašnika su dva i ona strše iznad ruba vjenčića. Plod je lokulicidni ili ponekad septicidni tobolac (kapsula), više ili manje spljošten na desnim rubovima prema pregradi (septumu). Sjemenke su najčešće brojne (Tutin i sur., 1972).

### 1.1.3. Odabrane biljne vrste roda *Veronica* L. (Plantaginaceae)

*V. serpyllifolia* L. ima pridignutu stabljiku visine 5-20 (-30) cm. Listovi su veličine 25 × 12 mm, jajoliki, kratke peteljke, cijela ili nejasno narovašena ruba, goli ili dlakavi. Grozdovi su rijetko ili gusto dlakavi, cvjetne stapke duge 3-8 mm tako da dužina pricvjetnih listića obično prelazi dužinu stapke. Donji pricvjetni listići su nalik listovima. Čaška je duga 4-6 mm, s 4 duguljasta i međusobno malo nejednaka segmenata. Vjenčić je 6-10 mm u promjeru. Tobolac je veličine 4-5 mm, nešto širi nego dulji i dlakav. Vrat tučka je dug oko 2 mm.

*V. chamaedrys* L. ima pridignutu stabljiku visine 7-25 cm, rijetko ili gusto dlakavu. Listovi su veličine 10-40 × 6-30 mm, duguljasto-kopljasti do jajasto-deltasti, narovašeno-zupčasti do duboko i nepravilno perasti s linearno duguljastim režnjevima, narijetko dlakavi do gotovo goli, sjedeći ili s kratkom peteljkom. Grozdovi su dugi 4-12 (-16) cm, najčešće nasuprotni ili najniži često rasporeni. Cvjetne stapke su duge (2-) 4-8 mm, a pricvjetni listići 3-7 mm. Čaška je duga 4-6 mm, s četiri kopljasta do linearno-duguljasta, dlakava, pomalo nejednaka segmenata. Vjenčić je oko 10 mm u promjeru. Tobolac je 3-4 × 4-5 mm velik, naopako deltast do naopako srcast, trepavičasto dlakav, kraći od čaške.

*V. arvensis* L. ima stabljiku visine (2-) 5-40 cm koja je jednostavna i uspravna do razgranata i polegnuta, dlakava i često u gornjem dijelu žljezdasta. Listovi su veličine 2-15 mm, trokutasto-jajasti, s odrezanom ili blago srcolikom bazom, nazubljeni, dlakavi ili gotovo goli, donji s kratkom peteljkom, gornji sjedeći. Cvjetovi su u grozdovima, pricvjetni listići su duži od peteljki, gornji kopljasti, donji jajoliki. Segmenti čaške su kopljasti, vjenčić promjera 2-3 mm, plav. Tobolac 3 × 3 mm, srcolik, spljošten, gol, osim trepavičastih dlaka. Vrat tučka je dug oko 1 mm. Sjemenke dimenzija 1 × 0,75 mm eliptične su i plosnate (Slika 1. a).

*V. polita* L. ima narovašeno-pilaste listove od koji su donji listovi često širi nego dulji. Segmenti čaške su široko jajoliki, često međusobno preklapljeni pri osnovici. Vjenčić je plav, a tobolac je s dugim žljezdastim i kratkim neseekretornim, valovitim dlakama. Vrat tučka je dug oko 1,5 mm.

*V. persica* L. je maljava biljka. Stabljika je duga (5-) 10-60 cm, polegnuta. Listovi su veličine 5-25 mm, s kratkom peteljkom, široko jajasti, s više ili manje odrezanom osnovicom, većinom naizmjenično poredani, odnosno najdonji nasuprotni. Cvjetovi su pojedinačni u pazušcima listova, sa stapkama dugim 5-30 mm koje su povijene u plodu i premašuju donji list. Segmenti čaške su dugi (4-) 6-7 mm, jajasto-kopljasti, u pravilu se ne preklapaju ili se samo blago preklapaju pri osnovici. Vjenčić je promjera 8-12 mm, plav. Tobolac je veličine 4-5 × 7-10 mm, s 2 režnja koja su jasno odvojena i širokim, plitkim sinusom i neseekretornim dlakama na stranama te dugim žljezdastim dlakama na hrptu. Vrat tučka je dug 2,5-3 mm. Široko eliptične sjemenke su dimenzija 1,75 × 1,25 mm, s jedne strane udubljene (Slika 1. b).

*V. hederifolia* L. je također maljava biljka. Stabljika je duga 10-60 cm, polegnuta. Listovi su dugi 5-15 mm, s peteljkom, gotovo okruglasti, s 3-7 režnjeva od kojih je terminalni režanj najveći. Naizmjenično su poredani, odnosno najdonji su nasuprotni. Cvjetovi su smješteni pojedinačno na stapkama u pazušcima listova, sa stapkom koja ne nadvisuje ili malo nadvisuje listove. Segmenti čaške su dugi 4-5 mm, srcoliko-jajasti, šiljati, trepavičasti, uspravni ili gotovo uspravni na plodu. Vjenčić je promjera 4-9 mm plav ili ljubičast. Tobolac je dimenzija 4 × 4 mm, kuglast, s plitka četiri režnja, gol. Vrat tučka je dug 0,3-1,1 mm. Sjemenke su dimenzija 2,5 × 2,25 mm, gotovo su okruglaste i šaličaste.

*V. cymbalaria* L. ima listove duge 5-15 mm, s 5-9 podjednakih režnjeva. Cvjetne stapke znatno nadvisuju listove. Segmenti čaške su dugi 3-4 mm, jajoliki i tupi. Vjenčić je promjera 6-10 mm, bijel, dok je tobolac s 2 plitka režnja i trepavičast. Vrat tučka je dug oko 1,5 mm. Sjemenke su dimenzija 2 × 2 mm.

*V. longifolia* L. ima stabljiku visoku 40-120 cm, robusnu, podignutu, голу ili dlakavu. Listovi su dimenzija 30-120 × 5-20 mm, kopljasti do linearno-kopljasti, ušiljeni, odrezani do klinaste osnovice, oštro pilasta ruba, goli ili narijetko dlakavi, nasuprotni ili po 3-4 u pršljenu, s peteljka najčešće kraćim od 10 mm. Cvat je dug do 25 cm, vrlo gust, često s jednim ili više manjih postranih ogranaka. Cvjetne stapke su duge 1-2 mm, kraće od linearno-nitastih pricvjetnih listića. Segmenti čaške su dugi 2-3 mm, trokutasto-jajoliki, šiljati, međusobno nejednaki. Vjenčić je promjera 6-8 mm, ljubičast ili blijedo plav. Tobolac je dimenzija 3 × 3 mm, široko-jajolik do kuglast, gol. Vrat tučka je dug 4-10 mm (Tutin i sur., 1972).





**Slika 1.** *V. arvensis* L. (a) i *V. persica* L. (b) ([www.montereywildflowers.com](http://www.montereywildflowers.com)).

#### *Upotreba i farmakološko djelovanje*

Znamo da su biljke izložene mnogim stresnim uvjetima iz okoliša. Zbog njihovog sedimentarnog načina života, razvile su specijalizirane metabolite kao odgovor na ekstremne vremenske uvjete (Thomford i sur., 2018) i biološki stres, poput infekcije patogenima. Specijalizirani metaboliti biljaka imaju različite biološke aktivnosti koje se mogu koristiti u medicini, farmaciji i konzerviranju hrane, s obzirom na to da mikroorganizmi postaju sve više rezistentni na sintetičke komponente koje ujedno mogu biti i kancerogene kada se koriste u konzerviranoj hrani (Dunkic i sur., 2015).

Vrste roda *Veronica* ekstenzivno su filogenetski istraživane te je zabilježena poveznica između distribucije iridoidnih glikozida i filogenije (Albach i sur., 2005). Flavonoidne i fenolne komponente također su opsežno istraživane, vjerojatno zbog njihove važnosti u biološkoj aktivnosti biljaka. Spomenute komponente poznate su po svojim antialergijskim, antivirusnim, protuupalnim, kardioprotektivnim i vazodilatacijskim svojstvima i, povrh svega, po antioksidativnom i radikal hvatajućem potencijalu (Ganzera i sur., 2018).

Vrste roda *Veronica* primjenjuju se u tradicionalnoj medicini za terapiju različitih bolesti, uključujući gripu, respiratorne bolesti i rak te kao diuretici (Dunkic i sur., 2015) zbog svog prirodnog bogatstva fenolnim spojevima i iridoidima. Posljednjih godina, neka istraživanja pokazuju da vrste ovog roda mogu također biti korištene u terapiji mentalnih poremećaja (Zivkovic i sur., 2017) i nekih tipova dijabetesa (Sharifi-Rad i sur., 2016, Nazlić i sur., 2020).

## 1.2. Pregled istraživanja odabranih biljnih vrsta

Odabrane biljne vrste roda *Veronica* tradicionalno se koriste u medicini za zacjeljivanje rana, u terapiji reume i različitih bolesti u ljudi. Kemijski sastav vrsta roda *Veronica* omogućava ekstraktima ovih vrsta primjenu u konzerviranju hrane, kao komponente hrane, ali i određuje njihova funkcionalna svojstva. Vrste roda *Veronica* predstavljaju vrijedan izvor biološki aktivnih sekundarnih metabolita, uključujući iridoidne glikozide i fenolne komponente. Zbog prisutnosti takvih fitokemikalija, spomenute vrste posjeduju širok spektar biološke aktivnosti, uključujući antimikrobni i antioksidativni učinak. Neke studije sugeriraju da ekstrakti određenih vrsta mogu inhibirati patogene iz hrane kao što je *Listeria monocytogenes*. Također, antikancerogena, protuupalna i druga biološka djelovanja uočena su *in vitro* i *in vivo*. Iako je dokazana bioaktivnost vrsta roda *Veronica*, potrebne su daljnje studije na prehranbenim sustavima i ljudima (Salehi i sur., 2019).

Mitodepresivni, antioksidativni, antifungalni i protuupalni učinci zabilježeni su kod vrste *V. persica*. Vodeno-alkoholni ekstrakti korijena i nadzemnih dijelova vrsta *V. persica* i *V. lappa* L. analizirani su HPLC metodom. Kvantificirano je 13 komponenata u ekstraktu vrste *V. persica* i potvrđena prisutnost arktina i arktigenina. Antioksidacijski potencijal ekstrakata procijenjen je koristeći dvije metode: DPPH i fosfomolibdat metodu. Utvrđeno je da su ekstrakti aktivni protiv oba korištena gljivična soja sa zonama inhibicije od 17.1 i 13.1 mm za *Penicillium hirsutum* i otprilike 22 mm za *Aspergillus niger*. Citogenetički učinci otkrili su niz kromosomskih i jezgrinih aberacija induciranih u meristemskim stanicama korijena. Protuupalni učinci, procijenjeni u dva inflamacijska eksperimentalna modela, pokazali su značajnu aktivnost. Dobiveni rezultati ukazuju na ispitivane ekstrakte kao obećavajući izvor biološki aktivnih komponenata (Fierascu i sur., 2018).

Inhibicijska aktivnost na ključne enzime odgovorne za tip 2 dijabetesa i hipertenziju, kao i antioksidativni kapacitet, uočeni su u fenolima bogatom ekstraktu vrste *V. persica*. Procijenjena je inhibitorna aktivnost slobodnih topljivih i konjugiranih fenolnih ekstrakata vrste *V. persica* na ključne enzime povezane s dijabetesom tipa 2 ( $\alpha$ -glukozidaza i  $\alpha$ -amilaza) i hipertenzijom (angiotenzin I konvertirajući enzim, ACE), kao i njihova antioksidativna snaga. Oba ekstrakta inhibirala su navedene enzime ovisno o dozi. Slobodni fenolni ekstrakt značajno je inhibirao  $\alpha$ -glukozidazu, dok je konjugirani fenolni ekstrakt značajno inhibirao  $\alpha$ -amilazu i ACE. Enzimski inhibitorna aktivnost ekstrakata nije bila povezana s fenolnim sadržajem. Svakako, inhibicija  $\alpha$ -amilaze,  $\alpha$ -glukozidaze i ACE, zajedno s antioksidativnim kapacitetom

fenolno bogatih ekstrakata mogu predstavljati mogući mehanizam pomoću kojeg *V. persica* iskazuje svoj antidijabetički i antihipertenzivni učinak (Sharifi-Rad i sur., 2016).

Regulacijom JAK2/STAT3 i Nf- $\kappa$ B signalnih puteva, *V. polita* ublažava mišji kolitis induciran dekstran sulfat natrijem. Ulcerozni kolitis upalna je bolest crijeva koja je postala rasprostranjena širom svijeta. *V. polita* L. medicinska je biljka sa snažnim antioksidacijskim i protuupalnim učincima. Ispitivan je protektivni učinak vrste *V. polita* na dekstran sulfat natrij (DSS)-induciran ulcerozni kolitis u miša. Fitokemijsko ispitivanje ekstrakta pokazalo je prisutnost visokog sadržaja ukupnih fenola i flavonoida. U usporedbi s DSS-grupom, *V. polita* značajno je smanjila kliničke simptome s manje gubitka tjelesne težine, krvavih stolica, skraćivanja kolona te je težina bolesti značajno inhibirana što je zabilježeno smanjenim indeksom aktivnosti bolesti (DAI) i stupnjem histološkog oštećenja kolona i slezene. Također, terapija ekstraktom vrste *V. polita* značajno je smanjila razinu NO i malonaldehida. Smanjena je i ekspresija TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS i COX-2 u tkivu kolona. Isto tako, signalni prijenosnik i aktivator transkripcije 3 (STAT3) te nuklearni faktor-kappa B (Nf- $\kappa$ B) učinkovito su blokirani. Dakle, navedeni rezultati pokazuju da *V. polita* ima učinak na upalnu bolest crijeva posredovanu modulacijom oksidativnog stresa i upalnih medijatora, suprimirajući JAK2/STAT3 i Nf- $\kappa$ B signalne puteve (Akanda i sur., 2018).

Neobični „helix-turn-helix“ proteaza inhibitorni motiv prisutan je u tripsin inhibitoru iz sjemenki vrste *V. hederifolia*. Skladišna tkiva mnogih biljaka sadrže inhibitore proteaze za koje se smatra da imaju važnu ulogu u obrani biljke od štetočina i patogena. Ove proteinske inhibicijske molekule pripadaju strukturalno različitim porodicama. Peptid iz vrste *V. hederifolia* (VhTI) inhibira tripsin sa submikromolarnim fragmentom  $K_i$  i pretpostavlja se da je specifičan za tripsinu-slične serinske proteaze. VhTI se dramatično razlikuje u strukturi od svih prethodno opisanih porodica tripsin inhibitora. Sadrži „helix-turn-helix“ motiv s 2  $\alpha$  heliksa usko povezana disulfidnim vezama. Neobično, kristalizirani kompleks je u formi stabiliziranog intermedijera acil-enzima s peptidnom vezom s VhTI inhibitorom koja cijepanjem daje N-terminalni ostatak inhibitora koji ostaje vezan za tripsin katalitički serin 195 esterskom vezom. Sintetska, krnja verzija VhTI peptida također je producirana i kokristalizirana s tripsinom, ali iznenađujuće, ostaje nepocijepana i posljedično formira nekovalentni kompleks s tripsinom. VhTI peptid pokazuje da učinkoviti enzim inhibitori mogu biti proizvedeni iz jednostavnog heliksnog oblika i osigurava kalup kao bazu za dizajn novih inhibitora serin proteaza (Connors i sur., 2007).

## 1.3. Ispitivane biološki aktivne tvari odabраних biljnih vrsta

### 1.3.1. Polifenoli

#### *Strukturne značajke polifenola*

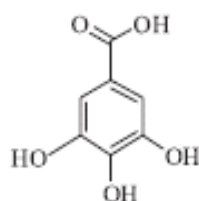
Jedni od najbrojnijih i najrasprostranjenijih prirodnih spojeva koji se mogu naći u biljaka jesu fenolni spojevi, odnosno polifenoli. Osnovna je strukturna značajka polifenola prisutnost jednog ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova. Poznato je preko 8000 ovih spojeva, od kojih većinu čine flavonoidi, oko 4000 (D'Archivio i sur., 2007; Bravo, 1998).

Polifenoli nisu izravno uključeni u razvoj biljnog organizma, dakle radi se o sekundarnim metabolitima biljaka, no njihova ekološka i zaštitna uloga je značajna. Dva su glavna puta biosinteze iz kojih nastaju: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je glavna tvar u nastanku aromatskih prirodnih spojeva i univerzalni prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) te višim biljkama, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).

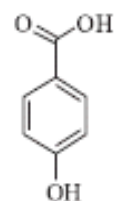
U polifenole spadaju fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. Od fenolnih kiselina razlikujemo derivate benzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida, tj. flavonoidi bez vezanih šećera, imaju strukturu tipa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Atomi ugljika raspoređeni su na način da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem koji može ili ne mora formirati treći prsten. Stilbeni su polifenoli koji sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu i nemaju osnovnu strukturu flavonoida (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

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

FENOLNE KISELINE  
PHENOLIC ACIDS

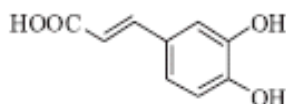


galna kiselina  
gallic acid

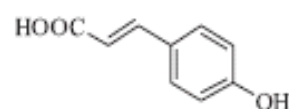


p-hidroksibenzojeva kiselina  
p-hydroxybenzoic acid

Hidroksibenzojeve kiseline  
Hydroxybenzoic acids



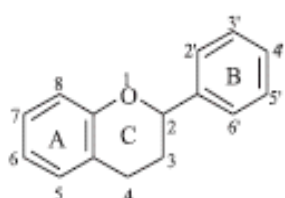
kavena kiselina  
caffeic acid



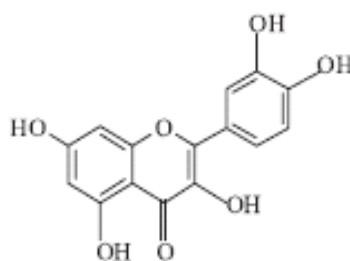
p-kumarinska kiselina  
p-coumaric acid

Hidroksicimetne kiseline  
Hydroxycinnamic acids

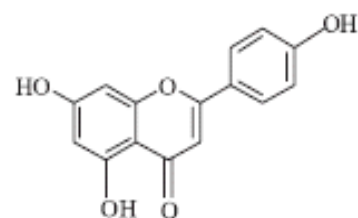
FLAVONOIDI  
FLAVONOIDS



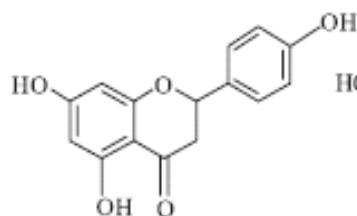
osnovna struktura flavonoida  
basic flavonoid structure



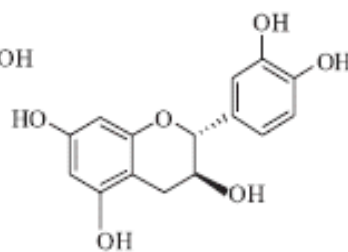
kvercetin (flavonol)  
quercetin (flavonol)



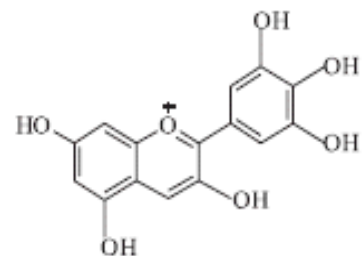
apigenin (flavon)  
apigenin (flavone)



naringenin (flavanon)  
naringenin (flavanone)

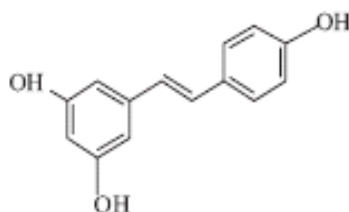


katehin (flavanol)  
catechin (flavanol)



delfinidin (antocijanidin)  
delphinidin (anthocyanidin)

STILBENI  
STILBENES



resveratrol  
resveratrol

Slika 2. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

## *Rasprostranjenost*

Hrana (voće, povrće, žitarice, mahunarke, orašasto voće) i pića biljnog podrijetla (vino, pivo, čaj, kakao) bogati su polifenolnim spojevima. Ovi spojevi prisutni su u različitim količinama čak i među kultivarima iste biljne vrste. Nastanak flavonskih i flavonolskih glikozida znatno ovisi o svjetlosti pa se tako u listovima i ostalim nadzemnim dijelovima nalaze najveće količine tih spojeva, dok su u podzemnim dijelovima biljke oni prisutni svega u tragovima. Genetski čimbenici i okolišni uvjeti određuju prisutnost polifenola u biljkama. Na sadržaj polifenola u biljnom materijalu također utječu i ostali čimbenici, poput klijanja, vegetacijskog razdoblja, varijeteta, obrade i skladištenja.

U žitaricama i mahunarkama, glavni polifenolni spojevi su flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine. Polifenolni spojevi žitarica čine manje od 1 % suhe tvari. Tamnije vrste mahunarki, poput graha (*Phaseolus vulgaris*), sadrže veće količine polifenola. Mahunarke također sadržavaju izoflavonoide, za razliku od povrća koje pretežito sadrži flavonoidne glikozide. Flavonoidi su većinom prisutni u nadzemnim dijelovima biljke, a rijetko kada u korijenu i lukovici. Pojedine biljne vrste, poput luka i sladića, su iznimke. Voće poput jabuka bogato je fenolnim kiselinama, vrste roda *Citrus* flavonoidima, dok bobičasto voće karakterizira visok sadržaj antocijanidina. Predominantan polifenolni spoj prisutan u plodovima je flavanol, a najveće koncentracije dolaze u kori. Trjeslovinama su bogati orašasti plodovi. Ulje sjemenki pretežno sadrži fenolne kiseline, a maslinovo ulje sadrži i fenolne kiseline i trjeslovine koje hidroliziraju.

U različitim vrstama čaja fermentacija uzrokuje različit sadržaj polifenola: zeleni čaj bogat je flavanolima, dok crni čaj sadrži velike količine oksidiranih polifenola (teaflavin i tearubigin). Glavni polifenolni sastojak zrna kave je klorogenska kiselina. Flavanol epikatehin glavni je polifenolni spoj ploda kakaovca, a osim njega prisutni su još antocijani i trjeslovine. Polifenolni spojevi vina uključuju fenolne kiseline, antocijane, tanine i ostale polifenole poput fitoaleksina resveratrola. Postoje znatne razlike u polifenolnom sastavu između crvenih i bijelih vina, kao i između mladih i odležanih vina te svježeg soka grožđa (Bravo, 1998).

## *Djelovanje i upotreba*

U biljkama se u velikim količinama akumuliraju polifenolni spojevi koji imaju mnoštvo uloga u životnom ciklusu biljke, kao što je sudjelovanje u obrambenim strategijama i strukturne uloge u različitim potpornim ili zaštitnim tkivima. Spomenuti spojevi također imaju važnu

ulogu u privlačenju oprašivača i životinja koje raznose sjemenke, zaštiti od UV zračenja, a služe i kao signalne molekule u interakciji biljaka i njihovog okoliša. Antocijanidini, jedna od najsvestranijih skupina flavonoida, apsorbiraju kvante visoke energije, hvataju slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve te tako štite kloroplast od fotorazgradnje. Flavonoli štite biljku od djelovanja UV-B zračenja, a uključeni su i u poticanje razvoja prašničke cijevi u svrhu oprašivanja. Nadalje, važna uloga izoflavonoida je u zaštiti od patogena i kukaca te služe kao signalne molekule pri stvaranju dušik-fiksirajućih kvržica mahunarki (leguminoza). Polifenolni spojevi zaostaju u tlu tjednima ili mjesecima nakon smrti biljke i utječu na razgradne organizme i proces razgradnje u tlu, pri čemu proširuju svoje djelovanje sa same biljke na cijeli eko sustav (Jaganath i Crozier, 2010).

Polifenolni spojevi, osim što služe biljkama kao načini preživljavanja i prilagodbe na uvjete okoline, pokazuju i širok raspon farmakoloških učinaka povezanih s njihovim antioksidativnim svojstvima (Brahmi i sur., 2017). Prirodni su nusprodukti ljudskog organizma reaktivni kisikovi spojevi u obliku superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ), vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i hidrosilnog radikala ( $HO\cdot$ ). No, kada su prisutni u suvišku, oni postaju opasni 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. Metabolizam sisavaca posjeduje zaštitne mehanizme za borbu protiv i za smanjenje štete nastale djelovanjem reaktivnih kisikovih spojeva, no, epidemiološka ispitivanja ukazuju na to 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).

Stanje neravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i reaktivnih metabolita te njihove eliminacije pomoću zaštitnih mehanizama podrazumijeva oksidativni stres. Posljedično nastaloj neravnoteži, dolazi do oštećenja biomolekula i organa, s potencijalnim djelovanjem na cijeli organizam. Polifenoli inhibiraju oksidaciju biomolekula hvatanjem slobodnih radikala. Upravo je funkcija antioksidansa da reagiraju sa slobodnim radikalima brže nego što slobodni radikali reagiraju sa supstratom. Za njihovo antioksidativno djelovanje zaslužan je redoks potencijal polifenolnih spojeva jer im omogućuje da brzo djeluju kao reducirajući agensi, tj. donori vodikovih atoma (Vladimir-Knežević i sur., 2011; Amić, 2008).

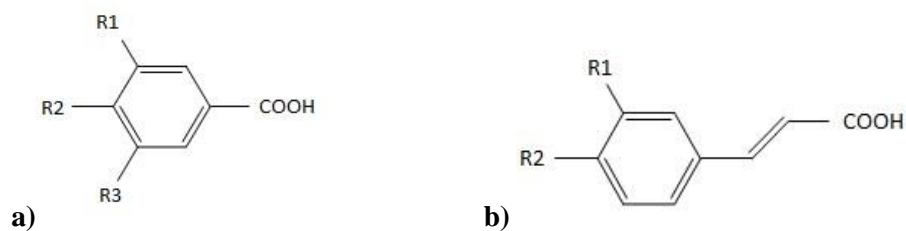
### 1.3.2. Fenolne kiseline

#### *Strukturne značajke fenolnih kiselina*

Fenolne kiseline, tj. fenilkarboksilne kiseline mogu se podijeliti na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Dolaze u slobodnom obliku, obliku estera ili glikozida.

Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina je C6-C1 jedinica, a međusobne razlike proizlaze iz hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (npr. galna i vanilinska kiselina). Hidroksibenzojeve kiseline mogu se naći u malom broju biljaka pa se stoga ne smatra da ova skupina kiselina ima značajan nutritivni potencijal (D'Archivio i sur., 2007).

U biljnim drogama zastupljenije su hidroksicimetne kiseline, s osnovnom strukturnom jedinicom C6-C3, koje se također međusobno razlikuju prema hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena. Najučestalije među njima su kavena i kumarinska kiselina. Nalaze se uglavnom u obliku estera (npr. klorogenska i ružmarinska kiselina), a rjeđe u slobodnom obliku (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).



**Slika 3.** Osnovne strukture hidroksibenzojevih (a) i hidroksicimetnih (b) kiselina (Bival Štefan, 2015).

Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su elaginska, galna, gentistinska, protokatehinska, siringinska i vanilinska kiselina. Ove kiseline mogu nastati izravno iz međuprodukata puta šikiminske kiseline, ali u biljkama češće nastaju razgradnjom derivata cimetne kiseline (Russell i sur., 1999).

Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su ferulična, kavena, kumarinska i sinapična kiselina. Često dolaze u obliku specifičnih estera, kao npr. klorogenska kiselina i ružmarinska kiselina te predstavljaju važne gradivne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva (Russell i sur., 1999; Ralph i sur., 1994). U slobodnom obliku javlja se manji broj fenolnih kiselina, dok su većinom u biljkama prisutne konjugirane (ponajviše esterifikacijom) sa strukturnim biljnim dijelovima (celulozom, proteinima i ligninom) ili s različitim molekulama, uključujući jednostavne šećere i organske kiseline (Vuković, 2013).



## *Rasprostranjenost*

Gotovo sva hrana biljnog podrijetla (voće, povrće i žitarice), kao i gotovo svi biljni dijelovi (sjemenka, list, korijen i stabljika) sadrže fenolne kiseline. Zbog njihove široke rasprostranjenosti u biljnom svijetu, a ovisno o prehrambenim navikama pojedinca, procjenjuje se da se od 25 mg do 1 g fenolnih kiselina dnevno unosi hranom. U slobodnom obliku prisutno je vrlo malo fenolnih kiselina. Većina ih je vezana za strukturne komponente biljke (celuloza, proteini, lignin), veće polifenole (flavonoidi), manje organske molekule (glukoza, kina kiselina) ili druge prirodne spojeve (terpeni) esterskim, eterskim ili acetalnim vezama. Mnogi čimbenici utječu na sadržaj fenolnih kiselina u biljnom materijalu, a najveći utjecaj imaju klima, uvjeti uzgoja i vegetacijsko razdoblje (Bival Štefan, 2015; Robbins, 2003).

## *Djelovanje i upotreba*

Još uvijek nije u potpunosti razjašnjena uloga fenolnih kiselina kao sekundarnih metabolita u biljkama. Smatra se da sudjeluju u različitim procesima, kao što su unos hranjivih tvari, sinteza proteina, aktivnost enzima, fotosinteza i alelopatija. Povezuje ih se također s bojom, okusom, mirisom, nutritivnim i antioksidativnim svojstvima hrane.

Dosadašnja su istraživanja bioloških učinaka fenolnih kiselina pokazala da ferulinska i ružmarinska kiselina smanjuju aktivnost lipooksigenaze i sprječavaju lančane reakcije slobodnih radikala koji nastaju u organizmu. Istraživanja su također pokazala da bi kavena kiselina 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. Kao potencijalna antivirusna terapija kod infekcija HIV-om, pokazali su se derivati kavene kiseline, s obzirom na to da selektivno i potentno inhibiraju HIV-integrazu, enzim koji katalizira ugradnju virusne DNA u DNA stanica domaćina. Pojačano lučenje žuči potiču klorogenska kiselina i cinarin te na taj način pospješuju detoksikaciju organizma (Maleš i sur., 2013; Robbins, 2003).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovoga diplomskog rada je kvalitativna analiza ukupnih polifenolnih spojeva i fenolnih kiselina, kao i kvantitativna analiza fenolnih kiselina u uzorcima nadzemnih dijelova odabranih vrsta roda *Veronica* L.

Kvalitativna analiza polifenolnih spojeva provedena je općim reakcijama stvaranja boje i taloga.

Kvalitativna analiza fenolnih kiselina postignuta je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC).

Određivanje fenolnih kiselina provedeno je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja, a koja se temelji na reakciji nitrit-molibdat reagensa s o-dihidroksifenolnom skupinom u strukturi hidroksicimetnih derivata (fenolnih kiselina).

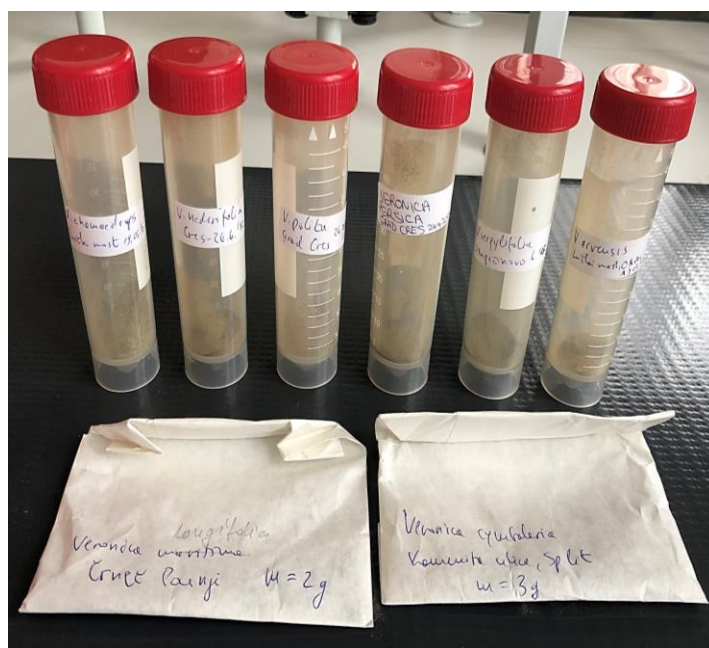
Svrha fitokemijske karakterizacije provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima odabranih vrsta roda *Veronica* L., a dobiveni rezultati mogu poslužiti kao osnova daljnjih istraživanja sadržaja farmakološki aktivnih komponenata te biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala biljnih pripravaka navedenih vrsta.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

Istraživanju su podvrgnuti na zraku osušeni nadzemni dijelovi odabranih vrsta roda *Veronica* L.: 1. *Veronica longifolia* L. (Črneč Polje, 5. 6. 2012.), 2. *V. cymbalaria* L. (Kamenita ulica, Split), 3. *V. chamaedrys* L. (Lučki most, Otočac, 19. 5. 2012.), 4. *V. hederifolia* L. (Cres, 24. 4. 2013.), 5. *V. polita* L. (Grad Cres, 24. 4. 2013.), 6. *V. persica* L. (Grad Cres, 24. 4. 2013.) i 7. *V. serpyllifolia* L. (Stupačinovo, Velebit, 8. 6. 2015.) i 8. *V. arvensis* L. (Lučki most, Otočac, 19. 5. 2012.). Prije analize, nadzemni dijelovi odabranih vrsta roda *Veronica* L. usitnjeni su u prah u mlinu za mljevenje biljnih droga.

Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 1994).



Slika 4. Ispitivani biljni materijal.

## 3.2. Aparatura i kemikalije

### Aparati i pribor:

- TLC ploče SIL G-25 UV<sub>254</sub> i 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije;
- ultraljubičasta lampa za detekciju (Camag, Muttentz);
- kromatografske komore, Eppendorf epruvete, kalibrirane kapilare;
- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453E (Hewlett Packard, Njemačka)
- kiveta za spektrofotometar (1 cm)
- epruvete, čaše, menzure, pipete, propipete, lijevci, kapaljke, filter papir, stakleni štapić;
- plamenik, tronožac, keramička mrežica, stalak, kleme;
- povratna hladila;
- tikvice s okruglim dnom i odmjerne tikvice.

### Reagensi i standardi:

- etanol (Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska);
- etil acetat (Carlo Erba, Val de Reuil);
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- klorovodična kiselina, konc. (Kemika, Zagreb);
- metanol (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska);
- mravlja kiselina (TTT, Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb)
- natrijev nitrit (Gram-Mol, Zagreb)
- Naturstoff reagens (NST) (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- octena kiselina, led. (Panreac, Barcelona, Španjolska);
- olovov acetat (Kemika, Zagreb);
- polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- standardne tvari: ferulična, kavena, klorogenska i ružmarinska kiselina (Roth, Karlsruhe, Njemačka);
- vanilin (Kemika, Zagreb);
- želatina (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje);
- željezov(III) klorid (Sigma-Aldrich, Njemačka).

### 3.3. Metode i postupci istraživanja

#### 3.3.1. Kvalitativna analiza polifenolnih spojeva

*Dokazivanje polifenolnih spojeva kemijskim reakcijama stvaranja boja i taloga*

##### 1. Priprava ekstrakta

Po 0,1 g ispitivanog uzorka vrsta roda *Veronica* L. pojedinačno se ekstrahira s 2 mL metanola 10 minuta na vodenoj kupelji (60 °C).



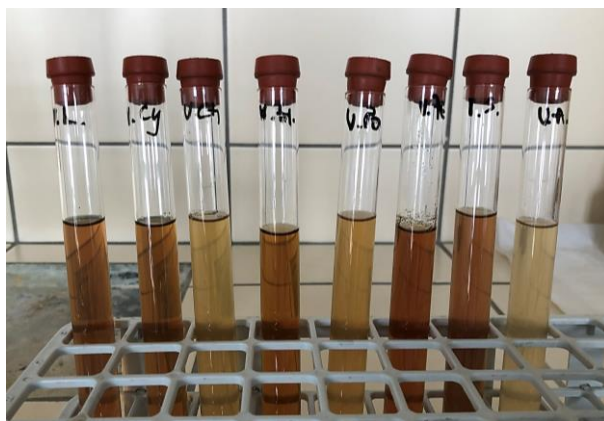
**Slika 5.** Ekstrakti za 1. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

##### Opća reakcija

Reakcija promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge.

##### 2. Priprava ekstrakta

Po 0,2 g ispitivanog uzorka pojedinačno se ekstrahira 10 minuta s 20 mL destilirane vode na ultrazvučnoj kupelji (80 °C). Ohlađeni ekstrakti se profiltriraju.



**Slika 6.** Ekstrakti za reakcije 2.a.-2.e. dokazivanja polifenolnih spojeva.

### Opće reakcije

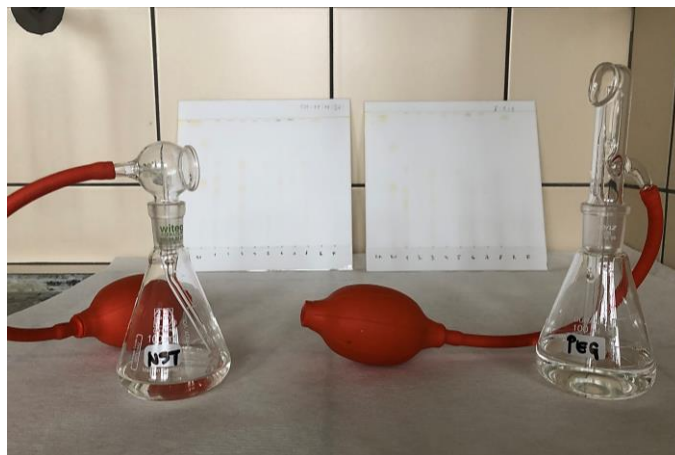
- a. U 2 mL filtrata dodaju se dvije kapi 5 %-tne otopine željezova(III) klorida.
- b. U 2 mL filtrata dodaju se 2-3 kapi 1 %-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata.
- c. U 5 mL filtrata doda se 0,5 mL 10 %-tne otopine olovova acetata.
- d. U 2 mL filtrata doda se 2 mL 1 %-tne otopine želatine.
- e. U 1 mL filtrata doda se 2 mL 1 %-tne otopine vanilina u konc. klorovodičnoj kiselini.

### **3.3.2. Kvalitativna analiza fenolnih kiselina**

#### *Tankoslojna kromatografija (TLC) fenolnih kiselina*

Biljni su uzorci pripremljeni pojedinačnom ekstrakcijom 0,1 g praškaste droge s po 2 mL metanola, tijekom 10 min na vodenoj kupelji zagrijanoj na 60 °C. Ispitivanje prisutnosti fenolnih kiselina provodi se na tankom sloju SIL G-25 UV<sub>254</sub> i Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije, primjenom dviju mobilnih faza različitih sastava i omjera. Prva mobilna faza sastavljena je od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V). Druga mobilna faza sastavljena je od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5 %-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami se promatraju pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i sur., 1983). Naturstoff-reagens se pripremi otapanjem 1 g β-etilaminoestera difenilborne kiseline u 100 mL metanola.

Za dobivanje referentnih kromatograma, pripravljene su metanolne otopine (1 mg/mL) standarda fenolnih kiselina: kavena, klorogenska, ružmarinska i ferulična kiselina.



**Slika 7.** Prskanje ploča Naturstoff-reagensom i 5 %-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000.

### 3.3.3. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina, tj. hidroksicimetnih derivata, u vrstama roda *Veronica* L., provedena je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja, i to u monografiji Rosmarini folium (EDQM, 2018), gdje je sadržaj izražen kao ružmarinska kiselina, te prema monografiji Fraxini folium (EDQM, 2018), gdje je sadržaj izražen kao klorogenska kiselina.

#### *Kvantitativna analiza fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina*

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u uzorcima vrsta roda *Veronica* L. 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 odmjerne tikvici (osnovna otopina).



**Slika 8.** Ekstrakcija biljnog materijala.

*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 odmjerne tikvici.

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

Apsorbancija dobivenih otopina odmah je izmjerena na 505 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao ružmarinska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 2,5 / m$$

A – izmjerena apsorbancija na 505 nm

m – masa droge izražena u gramima

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



*Kvantitativna analiza fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina*

Ispitivana otopina pripravljena je na isti način kao i za određivanje hidroksicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina. Apsorbancija dobivenih otopina odmah je izmjerena na 525 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao klorogenska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 5,3 / m$$

A – izmjerena apsorbancija na 525 nm

m – masa droge izražena u gramima

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenolnih spojeva

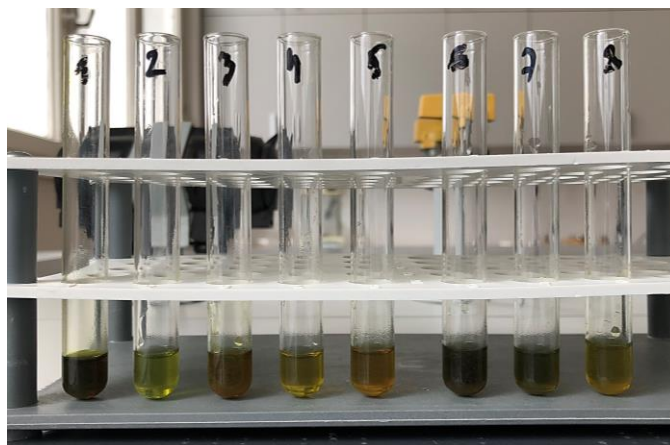
*Dokazivanje polifenolnih spojeva kemijskim reakcijama stvaranja obojenja i taloga*

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

Dodatkom natrijevog hidroksida u metanolni ekstrakt ispitivanih biljnih uzoraka, u epruveti je nastalo smeđenarančasto obojenje različitog intenziteta, ovisno o biljnoj vrsti. Kod vrsta *V. longifolia* L., *V. persica* L. i *V. serpyllifolia* L. nastalo je narančasto obojenje najvećeg intenziteta, nešto slabilji intenzitet reakcije pokazale su vrste *V. chamaedrys* L. i *V. arvensis* L., dok je spomenuta reakcija kod vrsta *V. cymbalaria* L. i *V. hederifolia* L. imala najmanji intenzitet. Jači intenzitet reakcije ukazuje na veći sadržaj polifenolnih tvari u uzorku (Slika 9, Tablica 1).

**Tablica 1.** Intenzitet obojenja za 1. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

VRSTA	INTENZITET OBOJENJA
<i>V. longifolia</i>	+++
<i>V. cymbalaria</i>	+
<i>V. chamaedrys</i>	++
<i>V. hederifolia</i>	+
<i>V. polita</i>	++
<i>V. persica</i>	+++
<i>V. serpyllifolia</i>	+++
<i>V. arvensis</i>	++



**Slika 9.** Intenzitet obojenja za 1. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

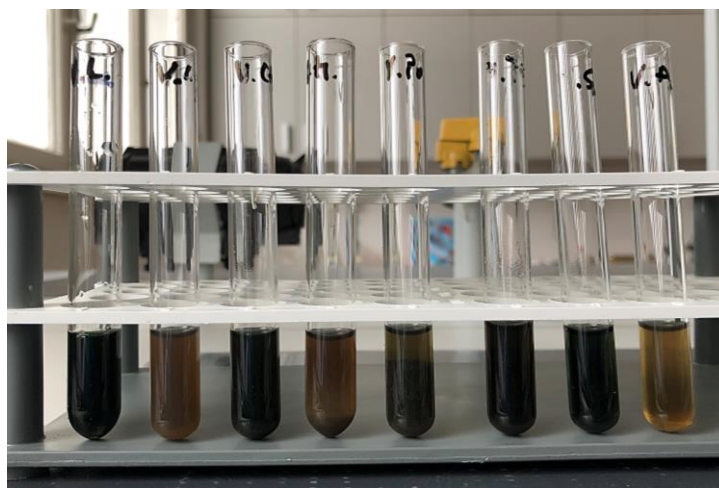
Uzorci: **1-***V. longifolia* L., **2-***V. cymbalaria* L., **3-***V. chamaedrys* L., **4-***V. hederifolia* L., **5-***V. polita* L., **6-***V. persica* L., **7-***V. serpyllifolia* L., **8-***V. arvensis* L.

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

Dodatkom 5 %-tne otopine željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge nastaje plavozeleno obojenje koje je najizraženije kod vrsta *V. longifolia* L., *V. chamaedrys* L., *V. persica* L. i *V. serpyllifolia* L., dok je kod vrsta *V. polita* L. i *V. arvensis* L. uočeno najsvjetlije zamućenje (Slika 10, Tablica 2).

**Tablica 2.** Intenzitet obojenja za 2.a. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

VRSTA	INTENZITET OBOJENJA
<i>V. longifolia</i>	+++
<i>V. cymbalaria</i>	++
<i>V. chamaedrys</i>	+++
<i>V. hederifolia</i>	++
<i>V. polita</i>	+
<i>V. persica</i>	+++
<i>V. serpyllifolia</i>	+++
<i>V. arvensis</i>	+



**Slika 10.** Intenzitet obojenja u 2.a. reakciji dokazivanja polifenolnih spojeva.

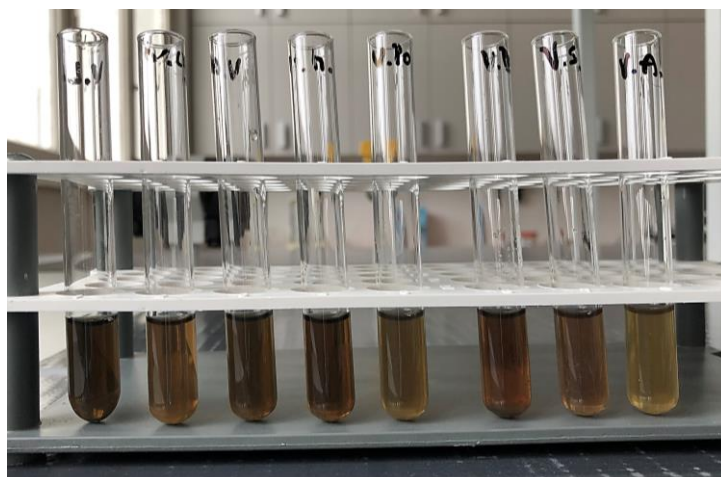
Uzorci: **V.L.**-*V. longifolia* L., **V.CY.**-*V. cymbalaria* L., **V.CH.**-*V. chamaedrys* L., **V.H.**-*V. hederifolia* L., **V.PO.**-*V. polita* L., **V.PE.**-*V. persica* L., **V.S.**-*V. serpyllifolia* L., **V.A.**-*V. arvensis* L.

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

Reakcijom polifenola sa željezovim(III) amonijevim sulfatom nastaje zelenkasto obojenje najvećeg intenziteta kod vrsta *V. longifolia* L. i *V. hederifolia* L., a najmanjeg intenziteta kod vrsta *V. polita* L. i *V. arvensis* L. (Tablica 3, Slika 11).

**Tablica 3.** Intenzitet obojenja za 2.b. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

VRSTA	INTENZITET OBOJENJA
<i>V. longifolia</i>	+++
<i>V. cymbalaria</i>	++
<i>V. chamaedrys</i>	++
<i>V. hederifolia</i>	+++
<i>V. polita</i>	+
<i>V. persica</i>	++
<i>V. serpyllifolia</i>	++
<i>V. arvensis</i>	+



**Slika 11.** Intenzitet obojenja za 2.b. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

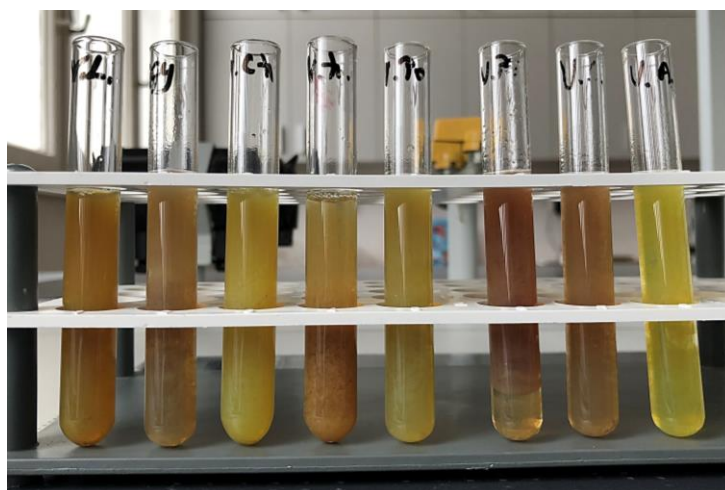
Uzorci: **V.L.**-*V. longifolia* L., **V.CY.**-*V. cymbalaria* L., **V.CH.**-*V. chamaedrys* L., **V.H.**-*V. hederifolia* L., **V.PO.**-*V. polita* L., **V.PE.**-*V. persica* L., **V.S.**-*V. serpyllifolia* L., **V.A.**-*V. arvensis* L.

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

Polifenoli s olovovim acetatom stvaraju pahuljasto zamućenje narančastožute boje koje je najvećeg intenziteta kod vrsta *V. persica* L. i *V. serpyllifolia* L., dok je kod vrsta *V. chamaedrys* L., *V. polita* L. i *V. arvensis* L. uočeno najsvjetlije obojenje (Tablica 4, Slika 12).

**Tablica 4.** Intenzitet obojenja za 2.c. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

VRSTA	INTENZITET OBOJENJA
<i>V. longifolia</i>	++
<i>V. cymbalaria</i>	++
<i>V. chamaedrys</i>	+
<i>V. hederifolia</i>	++
<i>V. polita</i>	+
<i>V. persica</i>	+++
<i>V. serpyllifolia</i>	+++
<i>V. arvensis</i>	+



**Slika 12.** Intenzitet obojenja za 2.c. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

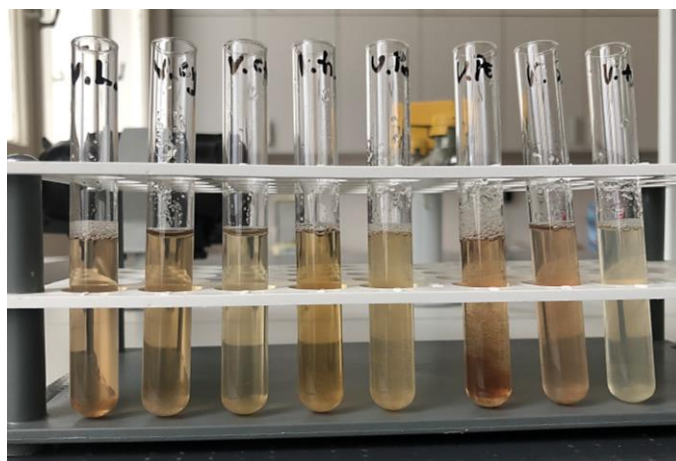
Uzorci: **V.L.**-*V. longifolia* L., **V.CY.**-*V. cymbalaria* L., **V.CH.**-*V. chamaedrys* L., **V.H.**-*V. hederifolia* L., **V.PO.**-*V. polita* L., **V.PE.**-*V. persica* L., **V.S.**-*V. serpyllifolia* L., **V.A.**-*V. arvensis* L.

#### 2.d. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

U reakciji s 1 %-tnom otopinom želatine nastaje blijedožuto zamućenje, pri čemu je kod vrsta *V. hederifolia* L. i *V. persica* L. obojenje najintenzivnije, a kod vrsta *V. chamaedrys* L., *V. polita* L. i *V. arvensis* L. intenzitet obojenja je najmanji (Tablica 5, Slika 13).

**Tablica 5.** Intenzitet obojenja za 2.d. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

VRSTA	INTENZITET OBOJENJA
<i>V. longifolia</i>	++
<i>V. cymbalaria</i>	++
<i>V. chamaedrys</i>	+
<i>V. hederifolia</i>	+++
<i>V. polita</i>	+
<i>V. persica</i>	+++
<i>V. serpyllifolia</i>	++
<i>V. arvensis</i>	+



**Slika 13.** Intenzitet obojenja za 2.d. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

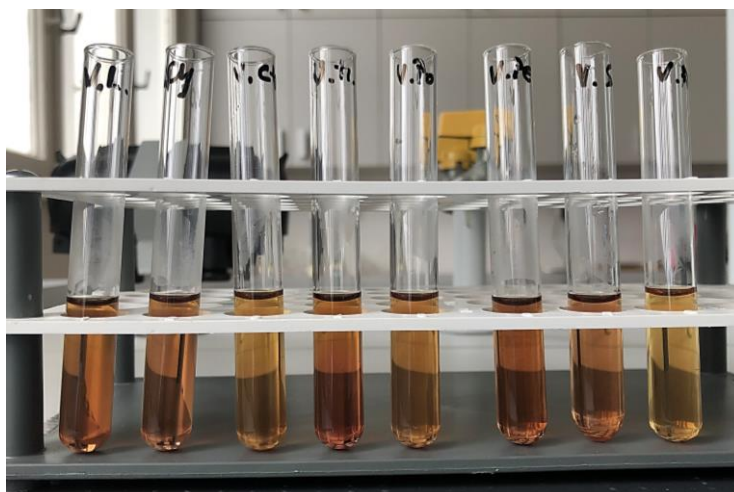
Uzorci: **V.L.**-*V. longifolia* L., **V.CY.**-*V. cymbalaria* L., **V.CH.**-*V. chamaedrys* L., **V.H.**-*V. hederifolia* L., **V.PO.**-*V. polita* L., **V.PE.**-*V. persica* L., **V.S.**-*V. serpyllifolia* L., **V.A.**-*V. arvensis* L.

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

Dodatkom 1 %-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt droge nastaje crvenosmeđe замуćenje: od najizraženije reakcije kod vrsta *V. hederifolia* L. i *V. persica* L., do najmanje izraženog obojenja kod vrsta *V. chamaedrys* L., *V. polita* L. i *V. arvensis* L. (Tablica 6, Slika 14).

**Tablica 6.** Intenzitet obojenja za 2.e. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

VRSTA	INTENZITET OBOJENJA
<i>V. longifolia</i>	++
<i>V. cymbalaria</i>	++
<i>V. chamaedrys</i>	+
<i>V. hederifolia</i>	+++
<i>V. polita</i>	+
<i>V. persica</i>	+++
<i>V. serpyllifolia</i>	++
<i>V. arvensis</i>	+



**Slika 14.** Intenzitet obojenja za 2.e. reakciju dokazivanja polifenolnih spojeva.

Uzorci: **V.L.**-*V. longifolia* L., **V.CY.**-*V. cymbalaria* L., **V.CH.**-*V. chamaedrys* L., **V.H.**-*V. hederifolia* L., **V.PO.**-*V. polita* L., **V.PE.**-*V. persica* L., **V.S.**-*V. serpyllifolia* L., **V.A.**-*V. arvensis* L.

Moguće je zaključiti da su kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga, kao dio kvalitativne analize polifenola, oni dokazani u svim ispitanim uzorcima. Najjači intenzitet zamućenja uglavnom je uočavan za uzorak vrste *V. persica* L. što ukazuje na veći udio polifenola u tom uzorku, a najmanji intenzitet većinom je zabilježen za uzorke vrsta *V. polita* L. i *V. arvensis* L., što ukazuje na najmanji udio polifenola u tim uzorcima.

## 4.2. Rezultati kvalitativne analize fenolnih kiselina

Tankoslojna kromatografija zasniva se na raspodjeli između krutog adsorbensa (stacionarne faze) i tekuće mobilne faze. Uzorak se nanosi na tanki sloj adsorbensa kao točka ili linija, a razvijanje se provodi u zatvorenoj komori s mobilnom fazom. Pokretna faza prolazi kroz tanki sloj adsorbensa nošena kapilarnim silama. Do razlučivanja sastojaka smjese dolazi zbog različitog afiniteta pojedinih sastavnica smjese prema nepokretnoj i pokretnoj fazi, što uzrokuje različite faktore zaostajanja odijeljenih tvari ( $R_f$  vrijednosti). Karakterizacija odijeljenih sastavnica provodi se pomoću  $R_f$  vrijednosti i/ili usporedbom s kromatogramom poredbene tvari.  $R_f$  vrijednost predstavlja omjer udaljenosti koju prijeđe ispitivana tvar i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).

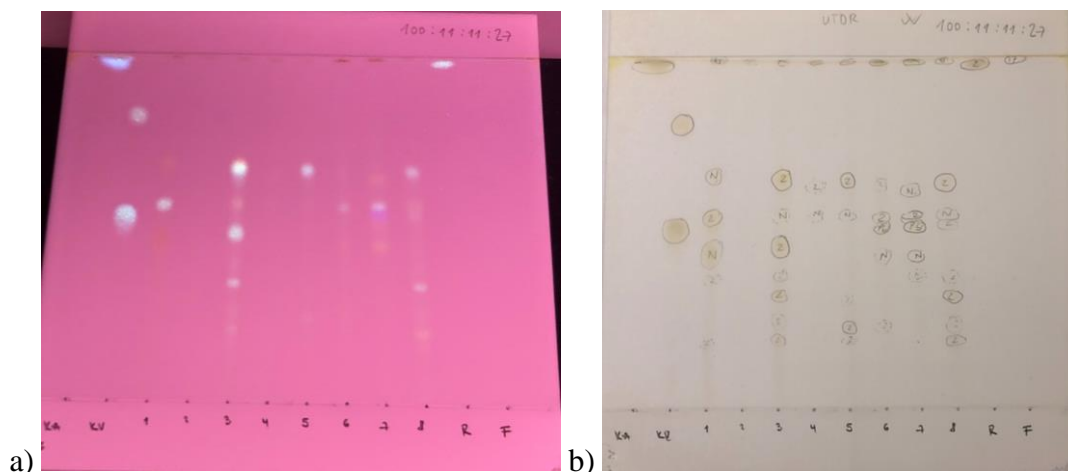


Provedena je analiza primjenom dviju stacionarnih faza, SIL G-25 UV<sub>254</sub> i Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije na koju su naneseni metanolni ekstrakti droge te standardne otopine fenolnih kiselina (kavena, klorogenska, ružmarinska i ferulična kiselina). Kao mobilne faze, korištene su dvije različite smjese otapala, **razvijatelj 1**: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i **razvijatelj 2**: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Ploče su prskane Naturstoff-reagensom i 5 %-tnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG) te su potom kromatogrami promatrani pod UV svjetlom valne duljine 365 nm (Wagner i sur., 1983).

Na kromatogramima su uočene narančaste fluorescirajuće zone karakteristične za flavonoide, kao i zelene fluorescirajuće zone karakteristične za fenolne kiseline i/ili iridoidne tvari. Narančastocrvene mrlje na vrhu kromatograma obilježja su nepolarnih flavonoidnih tvari i pripadaju aglikonima kvercetinškog tipa.

*Rezultati TLC analize s razvijateljem 1: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V)*

Na kromatogramima s razvijateljem 1 vidljivo je da su se uzorci razdvojili u 11 zona različitih boja i različitih intenziteta obojenja, bez većih razlika među kromatogramima različitih nepokretnih faza. Svi uzorci pokazuju uglavnom zone zelene i narančaste boje, osim uzorka *V. cymbalaria* L. u kojemu one nisu uočene. Pri vrhu kromatograma, u svakom su uzorku vidljive narančastocrvene zone, a u uzorcima *V. persica* L. i *V. serpyllifolia* L. uočene su i plavoljubičaste zone. Standardna otopina kavene kiseline daje zonu plave boje, standardna otopina klorogenske kiseline dvije zeleno obojene zone, standardna otopina ružmarinske kiseline zelenu zonu, dok standardna otopina ferulične kiseline pokazuje tamno plavo obojenu zonu (Slika 15 i 16, Tablica 7).



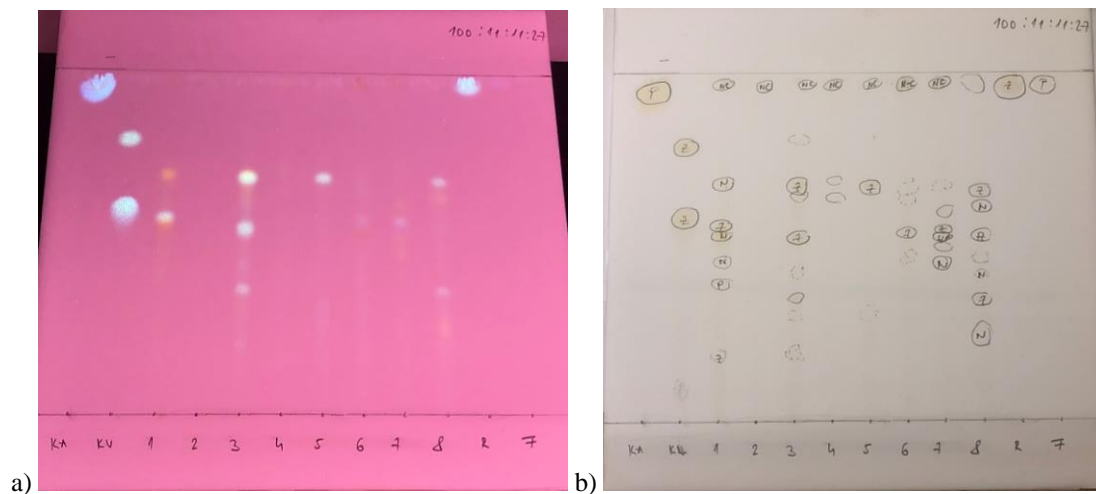
**Slika 15.** Kromatogram standardnih otopina fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Veronica* L.

Nepokretna faza: TLC ploča Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije

Pokretna faza: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **KA**-kavena kiselina, **KL**-klorogenska kiselina, **1**-*V. longifolia*, **2**-*V. cymbalaria*, **3**-*V. chamaedrys*, **4**-*V. hederifolia*, **5**-*V. polita*, **6**-*V. persica*, **7**-*V. serpyllifolia*, **8**-*V. arvensis*, **R**-ružmarinska kiselina, **F**-ferulična kiselina



**Slika 16.** Kromatogram standardnih otopina fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Veronica* L.

Nepokretna faza: TLC ploča SIL G-25 UV<sub>254</sub>

Pokretna faza: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **KA**-kavena kiselina, **KL**-klorogenska kiselina, **1**-*V. longifolia*, **2**-*V. cymbalaria*, **3**-*V. chamaedrys*, **4**-*V. hederifolia*, **5**-*V. polita*, **6**-*V. persica*, **7**-*V. serpyllifolia*, **8**-*V. arvensis*, **R**-ružmarinska kiselina, **F**-ferulična kiselina

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). Izračunate su  $R_f$  vrijednosti za kromatogram sa stacionarnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije. U ovom slučaju, b iznosi 15 cm.

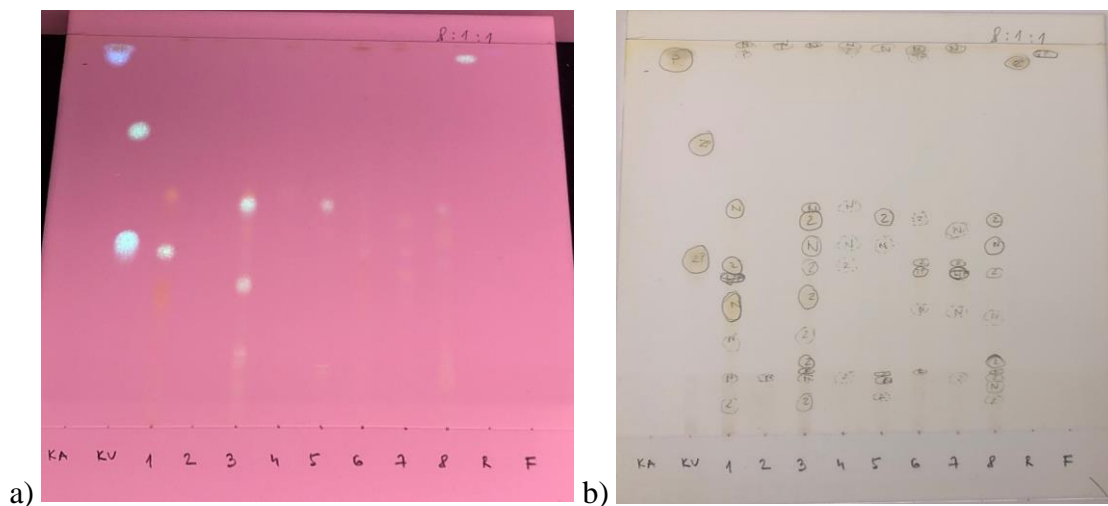
**Tablica 7.** Prikaz kromatografskih zona (a) i pripadajućih  $R_f$  vrijednosti za TLC sustav s **razvijačem 1** (etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i stacionarnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije.

UZORCI		KA	KL	1	2	3	4	5	6	7	8	R	F
ZONE													
1	a	-	-	2,8	-	2,8	-	2,8	-	-	2,8	-	-
	$R_f$	-	-	0,19	-	0,19	-	0,19	-	-	0,19	-	-
2	a	-	-	-	-	3,6	-	3,3	3,4	-	3,5	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,24	-	0,22	0,23	-	0,23	-	-
3	a	-	-	-	-	4,6	-	4,4	-	-	4,6	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,31	-	0,29	-	-	0,31	-	-
4	a	-	-	5,3	-	5,4	-	-	-	5,5	5,4	-	-
	$R_f$	-	-	0,35	-	0,36	-	-	-	0,37	0,36	-	-
5	a	-	-	6,4	-	-	-	-	6,3	6,3	-	-	-
	$R_f$	-	-	0,43	-	-	-	-	0,42	0,42	-	-	-
6	a	-	-	-	-	6,7	-	-	-	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,45	-	-	-	-	-	-	-
7	a	-	7,4	-	-	-	-	-	7,5	7,5	7,7	-	-
	$R_f$	-	0,49	-	-	-	-	-	0,50	0,50	0,51	-	-
8	a	-	-	7,9	-	8,0	8,0	8,0	7,9	8,0	8,1	-	-
	$R_f$	-	-	0,53	-	0,53	0,53	0,53	0,53	0,53	0,54	-	-
9	a	-	-	9,6	-	9,5	9,3	9,5	9,3	9,1	9,4	-	-
	$R_f$	-	-	0,64	-	0,63	0,62	0,63	0,62	0,61	0,63	-	-
10	a	-	11,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$R_f$	-	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	a	14,4	-	14,7	14,6	14,7	14,6	14,6	14,6	14,6	14,7	14,6	14,7
	$R_f$	0,96	-	0,98	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,97	0,98

Temeljem položaja kromatografskih zona uzoraka i standarda te usporedbe izračunatih  $R_f$  vrijednosti, kao dio kvalitativne analize fenolnih kiselina, moguće je zaključiti sljedeće: najveći intenzitet razvijenih kromatografskih zona uočen je za uzorke *V. longifolia* L. i *V. chamaedrys* L., dok je najmanji intenzitet uočen za uzorke *V. cymbalaria* L. i *V. hederifolia* L. Mrlje koje odgovaraju  $R_f$  vrijednostima standardnih otopina kavene, ružmarinske i ferulične kiseline podudaraju se s narančastim mrljama kvercetinog aglikona. To su nepolarni spojevi koji visoko putuju u primijenjenom razvijaču te je moguće međusobno prekrivanje plavozelenih (kavena, ružmarinska i ferulična kiselina) i narančastih mrlja (kvercetin). Zona klorogenske kiseline je zelene boje, no  $R_f$  vrijednosti uzoraka *V. persica* L. i *V. serpyllifolia* L. koje odgovaraju klorogenskoj kiselini uočene su kao plavoljubičaste mrlje stoga nije moguće sa sigurnošću potvrditi prisutnost spomenute fenolne kiseline u navedenim uzorcima.  $R_f$  vrijednost vezane zone u uzorku *V. arvensis* L. odgovara klorogenskoj kiselini po položaju i boji, iako slabijeg intenziteta i veličine, stoga možemo ustvrditi prisutnost spomenute fenolne kiseline u navedenom uzorku.

#### *Rezultati TLC analize s razvijačem 2: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V)*

Na kromatogramima s razvijačem 2 vidljivo je da su se uzorci razdvojili u 13 zona različitih boja te različitih intenziteta obojenja. Nema većih razlika među kromatogramima različitih nepokretnih faza. U svim uzorcima ponovno su prisutne uglavnom mrlje zelene i narančaste boje, osim uzorka *V. cymbalaria* L. u kojem takve zone nisu vidljive. Pri vrhu kromatograma u svakom uzorku vidljive su narančastocrvene zone, a u uzorcima *V. persica* L. i *V. serpyllifolia* L. uočene su i plavoljubičaste mrlje. Standardna otopina kavene kiseline daje zonu plave boje, standardna otopina klorogenske kiseline dvije zeleno obojene zone, standardna otopina ružmarinske kiseline jednu zelenu zonu, dok standardna otopina ferulične kiseline pokazuje tamno plavo obojenu zonu (Slika 17 i 18, Tablica 8).



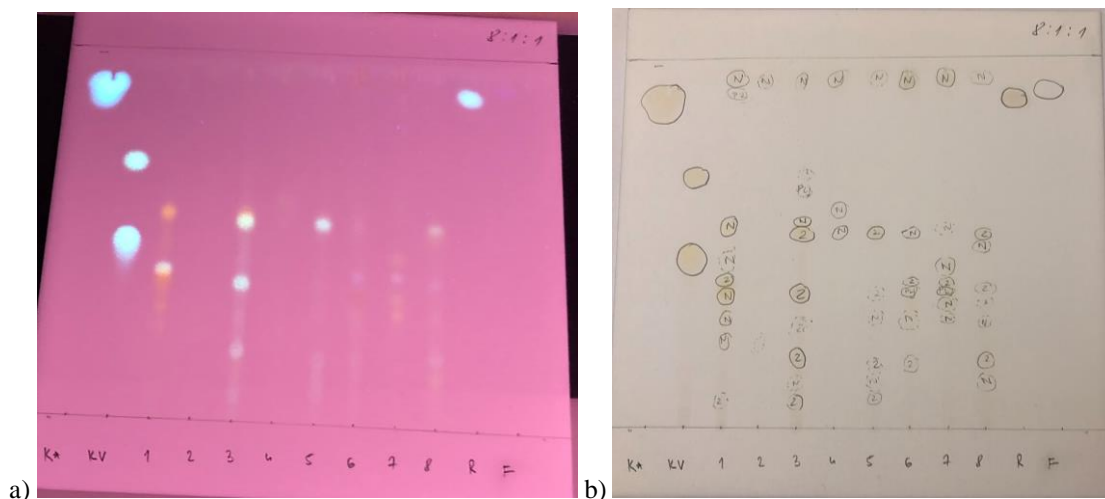
**Slika 17.** Kromatogram standardnih otopina fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Veronica* L.

Nepokretna faza: TLC ploča Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije

Pokretna faza: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **KA**-kavena kiselina, **KL**-klorogenska kiselina, **1**-*V. longifolia*, **2**-*V. cymbalaria*, **3**-*V. chamaedrys*, **4**-*V. hederifolia*, **5**-*V. polita*, **6**-*V. persica*, **7**-*V. serpyllifolia*, **8**-*V. arvensis*, **R**-ružmarinska kiselina, **F**-ferulična kiselina



**Slika 18.** Kromatogram standardnih otopina fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Veronica* L.

Nepokretna faza: TLC ploča SIL G-25 UV<sub>254</sub>

Pokretna faza: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **KA**-kavena kiselina, **KL**-klorogenska kiselina, **1**-*V. longifolia*, **2**-*V. cymbalaria*, **3**-*V. chamaedrys*, **4**-*V. hederifolia*, **5**-*V. polita*, **6**-*V. persica*, **7**-*V. serpyllifolia*, **8**-*V. arvensis*, **R**-ružmarinska kiselina, **F**-ferulična kiselina

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). Izračunate su  $R_f$  vrijednosti za kromatogram sa stacionarnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije. U ovom slučaju, b iznosi 15 cm.

**Tablica 8.** Prikaz kromatografskih zona (a) i pripadajućih  $R_f$  vrijednosti za TLC sustav s **razvijanjem 2** (etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V) i stacionarnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije.

UZORCI		KA	KL	1	2	3	4	5	6	7	8	KLO	R
ZONE													
1	a	-	-	1,0	-	1,0	-	1,1	-	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	0,07	-	0,07	-	0,07	-	-	-	-	-
2	a	-	-	-	-	1,7	-	1,7	-	-	1,8	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,11	-	0,11	-	-	0,12	-	-
3	a	-	-	-	-	2,7	-	2,5	2,5	-	2,7	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,18	-	0,17	0,17	-	0,18	-	-
4	a	-	-	3,4	-	4,0	-	4,2	4,2	4,2	4,2	-	-
	$R_f$	-	-	0,23	-	0,27	-	0,28	0,28	0,28	0,28	-	-
5	a	-	-	4,3	-	-	-	-	-	4,8	4,8	-	-
	$R_f$	-	-	0,29	-	-	-	-	-	0,32	0,32	-	-
6	a	-	-	5,3	-	5,3	-	5,3	5,4	5,4	5,5	-	-
	$R_f$	-	-	0,35	-	0,35	-	0,35	0,36	0,36	0,37	-	-
7	a	-	-	5,8	-	-	-	-	5,9	5,9	-	-	-
	$R_f$	-	-	0,39	-	-	-	-	0,39	0,39	-	-	-
8	a	-	6,6	6,6	-	-	-	-	-	6,4	7,2	-	-
	$R_f$	-	0,44	0,44	-	-	-	-	-	0,43	0,48	-	-
9	a	-	-	-	-	7,7	7,7	7,7	7,7	-	7,7	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,51	0,51	0,51	0,51	-	0,51	-	-
10	a	-	-	8,0	-	8,2	8,6	-	-	7,9	-	-	-
	$R_f$	-	-	0,53	-	0,55	0,57	-	-	0,53	-	-	-
11	a	-	-	-	-	9,4	-	-	-	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,63	-	-	-	-	-	-	-
12	a	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$R_f$	-	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	a	13,2	-	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1	14,2	14,2	13,4	13,8
	$R_f$	0,88	-	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,95	0,95	0,89	0,92

Na temelju položaja kromatografskih zona uzoraka i standarda te usporedbe izračunatih  $R_f$  vrijednosti dobivenih u kromatografskim uvjetima s razvijanjem 2, moguće je izvesti zaključke analogne onima dobivenim pri tumačenju kromatograma s razvijanjem 1. Ovoga puta  $R_f$  vrijednosti uzoraka *V. longifolia* L., *V. serpyllifolia* L. i *V. arvensis* L. koje odgovaraju klorogenskoj kiselini uočene su kao narančaste mrlje stoga nije moguće sa sigurnošću potvrditi prisutnost spomenute fenolne kiseline u navedenim uzorcima jer je moguće da su narančaste zone flavonoida prekrile zelenkastu klorogensku kiselinu.

S razvijanjem 2 nisu uočene veće razlike u razdvajanju i intenzitetu fluorescencije razvijenih kromatografskih zona u odnosu na kromatogram dobiven s razvijanjem 1.

### 4.3. Rezultati kvantitativne analize fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u biljnim uzorcima vrsta roda *Veronica* L. provedena je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja u monografijama *Rosmarini folium* i *Fraxini folium* (EDQM, 2018).

Određivanje se temelji na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidoksicimetnih derivata koji s nitrit-molibdat reagensom daju žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine, žuta boja prelazi u narančastocrvenu. Apsorbancija je izmjerena na 505 nm (ružmarinska kiselina), odnosno na 525 nm (klorogenska kiselina) te je sadržaj ukupnih hidoksicimetnih derivata izražen pomoću specifične apsorbancije koja za ružmarinsku kiselinu iznosi 400, a za klorogensku kiselinu 188.

Sadržaj ružmarinske kiseline računa se prema izrazu:

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

A – izmjerena apsorbancija na 505 nm;

m – masa droge izražena u gramima.

Analogno prethodnom, apsorbancija je izmjerena i na 525 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata izražen je kao klorogenska kiselina prema izrazu:

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

Napravljena je jedna ekstrakcija droge za svaki uzorak odabranih vrsta te su uzete tri otopine za spektrofotometrijsko određivanje. Svako je mjerenje izvedeno tri puta, dakle ukupno devet mjerenja (A1, A2, ..., A9) te je izračunata srednja vrijednost mjerenja ( $\bar{A}$ ). Također je provedena i statistička analiza, tako da se izračunalo standardno odstupanje (SD) prema izrazu

$SD = \sqrt{\frac{\sum(A-\bar{A})^2}{N-1}}$ , gdje je N broj podataka koji u ovom slučaju iznosi 9, te u obliku relativnog standardnog odstupanja (RSD) koje se računa prema izrazu  $\frac{SD}{\bar{A}}$ .

#### *Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina*

Postotak fenolnih kiselina izračunat je prema iznad objašnjenim izrazima, a rezultati su prikazani Tablicama 9 i 10.

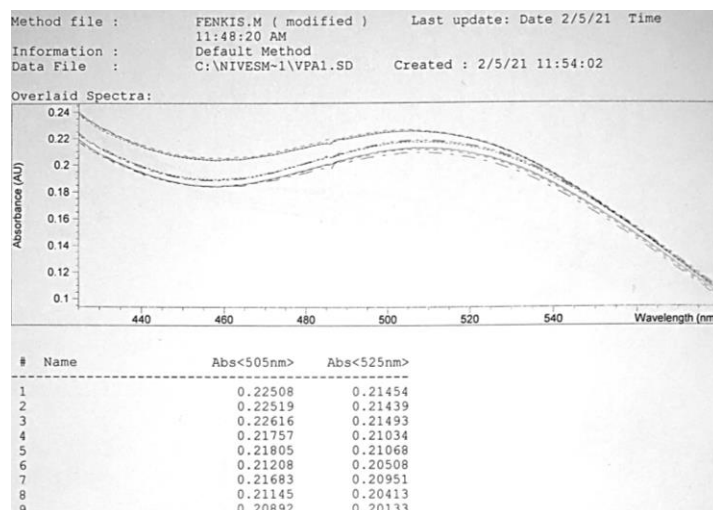
Dobivene UV-Vis-spektre donose Slike 19 do 26.



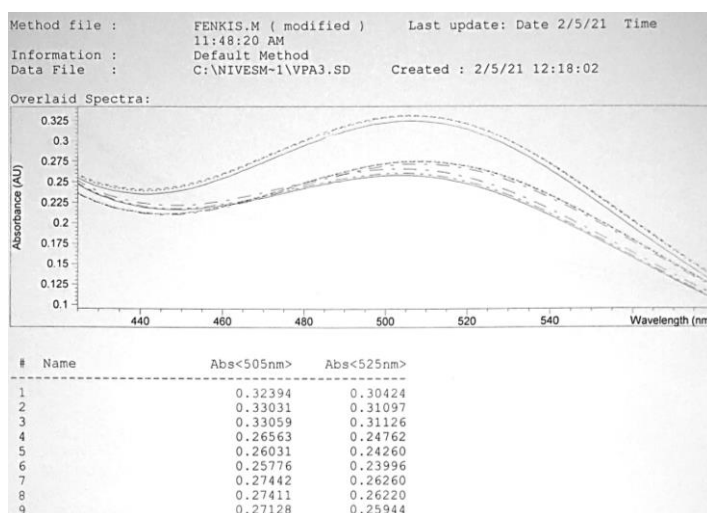
**Tablica 9.** Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu odabranih vrsta roda *Veronica* L. izražen kao ružmarinska kiselina (505 nm).

Uzorak	Odvaga(g)	1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje	$\bar{A}$	SD	RSD	%
<i>V. longifolia</i>	0,2000	0,22508	0,21757	0,21683	0,21793	0,00643	2,94854	2,72
		0,22519	0,21805	0,21145				
		0,22616	0,21208	0,20892				
<i>V. cymbalaria</i>	0,2001	0,03914	0,03330	0,03836	0,03508	0,00314	8,95091	0,44
		0,03503	0,03199	0,03849				
		0,03267	0,03057	0,03614				
<i>V. chamaedrys</i>	0,2001	0,32394	0,26563	0,27442	0,28759	0,03109	10,81040	3,59
		0,33031	0,26031	0,27411				
		0,33059	0,25776	0,27128				
<i>V. hederifolia</i>	0,2000	0,04778	0,04274	0,05276	0,04803	0,00446	9,28035	0,60
		0,04704	0,04257	0,05457				
		0,04703	0,04486	0,05292				
<i>V. polita</i>	0,2000	0,09387	0,09059	0,09195	0,09027	0,00296	3,27393	1,13
		0,09377	0,08903	0,09022				
		0,09127	0,08618	0,08553				
<i>V. persica</i>	0,2001	0,10296	0,08734	0,11101	0,09630	0,00958	9,94619	1,20
		0,10059	0,08933	0,10610				
		0,09805	0,08595	0,08536				
<i>V. serpyllifolia</i>	0,2000	0,09553	0,10285	0,10088	0,09915	0,00375	3,78373	1,24
		0,09524	0,10290	0,09933				
		0,09332	0,10354	0,09875				
<i>V. arvensis</i>	0,2000	0,09681	0,09081	0,08609	0,08859	0,00451	5,08811	1,11
		0,09218	0,08720	0,08262				
		0,09139	0,08591	0,08431				

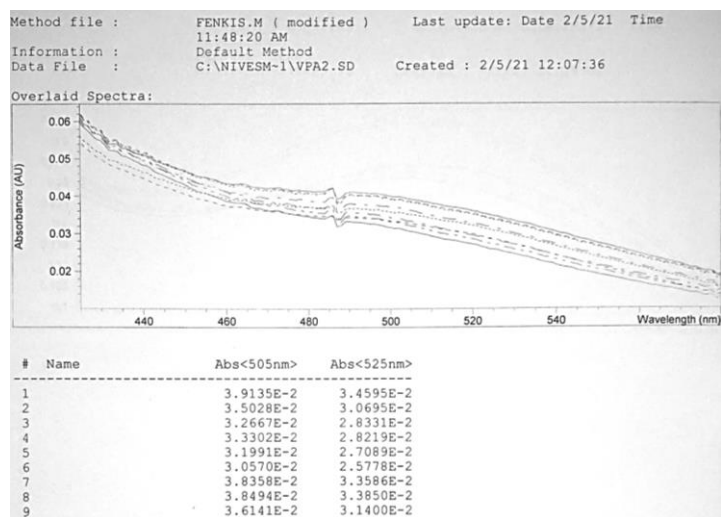
Najveći postotak fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina zabilježen je u uzorcima *V. longifolia* L. i *V. chamaedrys* L. koji su iznosili  $2,72 \pm 0,006$  %, odnosno  $3,59 \pm 0,031$  %, dok je najmanji postotak fenolnih kiselina zabilježen u uzorcima *V. cymbalaria* L. i *V. hederifolia* L. koji su iznosili  $0,44 \pm 0,003$  %, odnosno  $0,60 \pm 0,004$  %, što potvrđuje kvalitativne rezultate dobivene TLC analizom fenolnih kiselina.



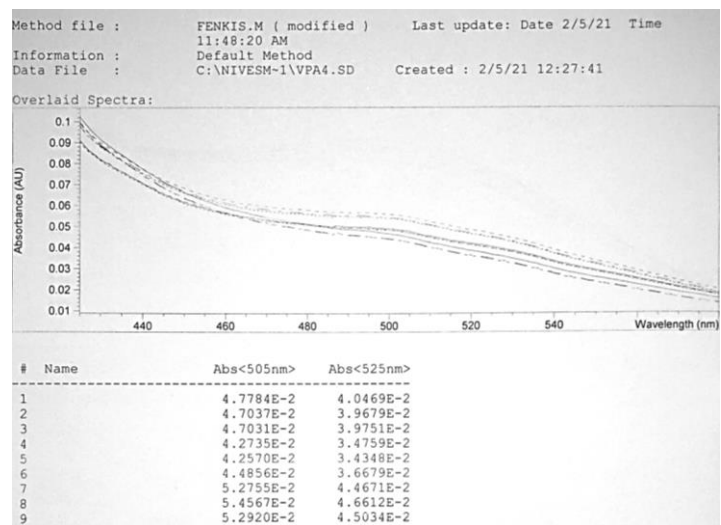
Slika 19. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. longifolia* L.



Slika 20. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. chamaedrys* L.



Slika 21. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. cymbalaria* L.



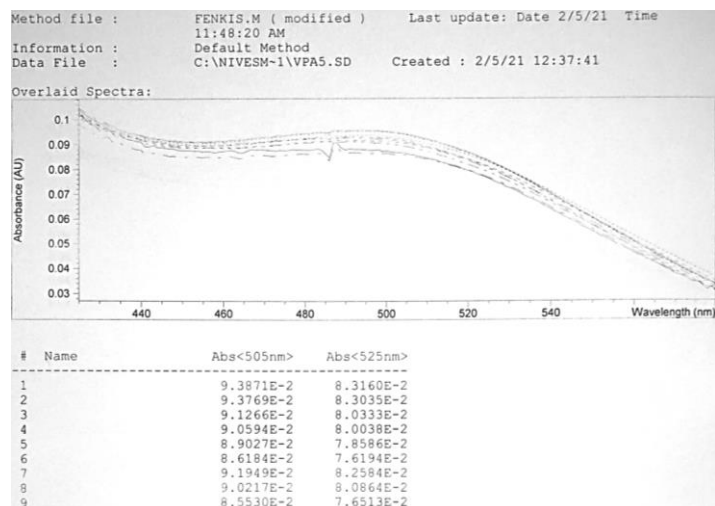
Slika 22. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. hederifolia* L.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina

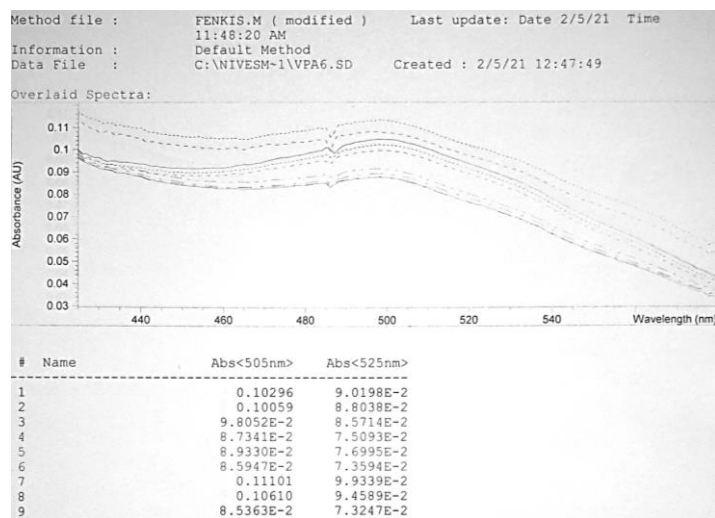
**Tablica 10.** Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu odabranih vrsta roda *Veronica* L. izražen kao klorogenska kiselina (525 nm).

Uzorak	Odvaga(g)	1. mjerenje	2. mjerenje	3. mjerenje	$\bar{A}$	SD	RSD	%
<i>V. longifolia</i>	0,2000	0,21454	0,21034	0,20951	0,20944	0,00495	2,36326	5,55
		0,21439	0,21068	0,20413				
		0,21493	0,20508	0,20133				
<i>V. cymbalaria</i>	0,2001	0,03460	0,02822	0,03359	0,03040	0,00320	10,54238	0,81
		0,03070	0,02709	0,03385				
		0,02833	0,02578	0,03140				
<i>V. chamaedrys</i>	0,2001	0,30424	0,24762	0,26260	0,27121	0,02941	10,84531	7,18
		0,31097	0,24260	0,26220				
		0,31126	0,23996	0,25944				
<i>V. hederifolia</i>	0,2000	0,04047	0,03476	0,04467	0,04022	0,00449	11,15831	1,07
		0,03968	0,03435	0,04661				
		0,03975	0,03668	0,04503				
<i>V. polita</i>	0,2000	0,08316	0,08004	0,08258	0,080104	0,00263	3,27846	2,12
		0,08304	0,07859	0,08086				
		0,08033	0,07619	0,07651				
<i>V. persica</i>	0,2001	0,09020	0,07509	0,09934	0,08409	0,00973	11,57103	2,23
		0,08804	0,07700	0,09459				
		0,08571	0,07359	0,07325				
<i>V. serpyllifolia</i>	0,2000	0,08445	0,09115	0,08939	0,08775	0,00350	3,98266	2,33
		0,08419	0,09121	0,08797				
		0,08217	0,09183	0,08743				
<i>V. arvensis</i>	0,2000	0,08770	0,08161	0,07674	0,07941	0,00455	5,73495	2,10
		0,08304	0,07812	0,07337				
		0,08227	0,07680	0,07506				

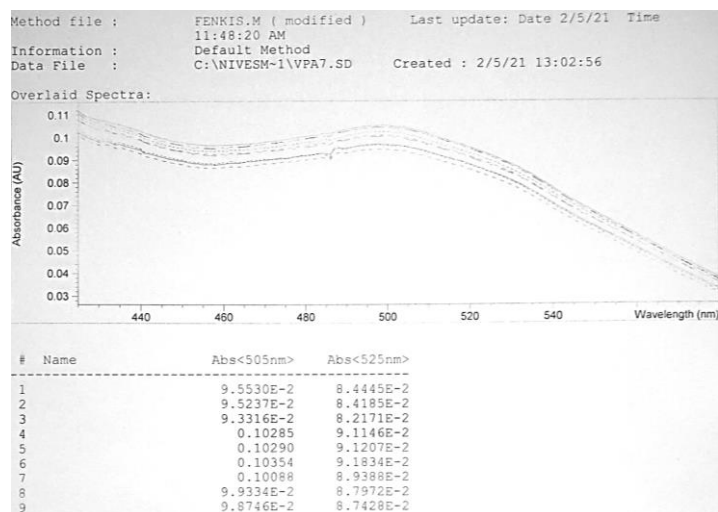
Najveći postotak fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina zabilježen je u uzorcima *V. longifolia* L. i *V. chamaedrys* L. koji su iznosili  $5,55 \pm 0,005$  %, odnosno  $7,18 \pm 0,029$  %, dok je najmanji postotak fenolnih kiselina zabilježen u uzorcima *V. cymbalaria* L. i *V. hederifolia* L., koji su iznosili  $0,81 \pm 0,003$  %, odnosno  $1,07 \pm 0,004$  %, što potvrđuje kvalitativne rezultate dobivene TLC analizom fenolnih kiselina.



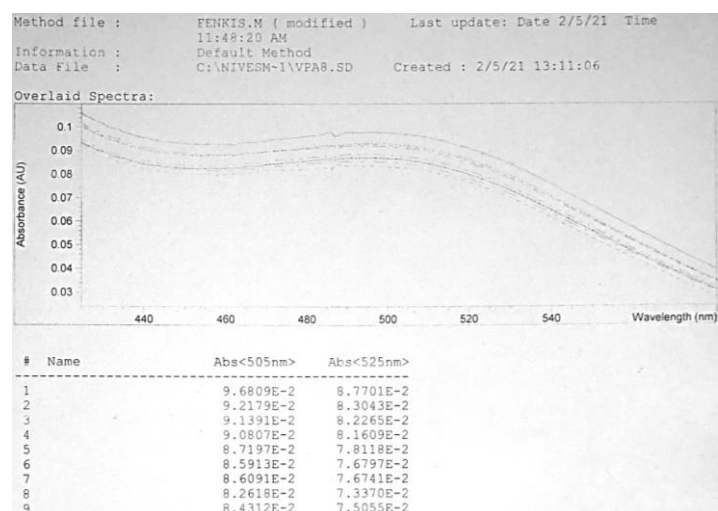
Slika 23. Spektar dobiven mjerenjem apsorbcije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. polita* L.



Slika 24. Spektar dobiven mjerenjem apsorbcije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. persica* L.



**Slika 25.** Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. serpyllifolia* L.



**Slika 26.** Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu *V. arvensis* L.

Usporedbom rezultata dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem na 505 nm (fenolne kiseline izražene kao ružmarinska kiselina) i 525 nm (fenolne kiseline izražene kao klorogenska kiselina), uočljivo je kako je postotak fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina bitno manji nego postotak fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina, što se može vidjeti u Tablici 11.

**Tablica 11.** Usporedba rezultata dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem fenolnih kiselina na 505 nm (izraženi kao ružmarinska kiselina) i 525 nm (izraženi kao klorogenska kiselina).

Uzorak	%R	%K	%K - %R	%K - %R (avg)	SD
<i>V. longifolia</i>	2,72	5,55	2,83	1,42	1,15467
<i>V. cymbalaria</i>	0,44	0,81	0,37		
<i>V. chamaedrys</i>	3,59	7,18	3,59		
<i>V. hederifolia</i>	0,60	1,07	0,47		
<i>V. polita</i>	1,13	2,12	0,99		
<i>V. persica</i>	1,20	2,23	1,03		
<i>V. serpyllifolia</i>	1,24	2,33	1,09		
<i>V. arvensis</i>	1,11	2,10	0,99		

Oznake: **%K** – fenolne kiseline (FK) izražene kao klorogenska kiselina (%); **%R** – FK izražene kao ružmarinska kiselina (%); **%K-%R** – razlika prosjeka mjerenja na 525 nm i 505 nm, te prosjek i standardna devijacija postotaka.

Oba načina mjerenja, kao dio kvantitativne analize fenolnih kiselina, pokazala su kako najveću koncentraciju fenolnih kiselina imaju uzorci *V. longifolia* L. i *V. chamaedrys* L., a najmanju koncentraciju fenolnih kiselina uzorci *V. cymbalaria* L. i *V. hederifolia* L. Odnosi sadržaja fenolnih kiselina iz ostalih uzoraka su također pokazali analogne rezultate, odnosno u oba načina kvantitativnog određivanja, postotak fenolnih kiselina slijedio je rastući niz: *V. cymbalaria* L., *V. hederifolia* L., *V. arvensis* L., *V. polita* L., *V. persica* L., *V. serpyllifolia* L., *V. longifolia* L. i *V. chamaedrys* L.

U prosjeku je mjerenjem fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina dobiven za  $1,42 \pm 1,15$  veći postotak od postotka dobivenog određivanjem fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina.

Sukladno navedenom, moguće je pretpostaviti da uzorci odabranih vrsta roda *Veronica* L. imaju veći udio klorogenske nego ružmarinske kiseline.

## 4. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedeno je fitokemijsko istraživanje nadzemnih dijelova odabranih vrsta roda *Veronica* L., a koje je uključivalo kvalitativnu analizu polifenolnih sastavnica te kvantitativnu analizu fenolnih kiselina.

Kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga, kao dio kvalitativne analize polifenolnih spojeva, oni su dokazani u svim ispitanim uzorcima. Najjači intenzitet zamućenja uglavnom je uočavan za uzorak vrste *V. persica* L., što ukazuje na veći udio polifenola u tom uzorku, a najmanji intenzitet zabilježen je većinom za uzorke vrsta *V. polita* L. i *V. arvensis* L., što ukazuje na najmanji udio polifenola u tim uzorcima.

Kvalitativnom analizom koja je provedena primjenom metode tankoslojne kromatografije (TLC) dokazana je prisutnost fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima odabranih biljnih vrsta. Analiza je provedena s dvije stacionarne faze: SIL G-25 UV<sub>254</sub> i Kieselgel 60 F<sub>254</sub> sa zonom koncentracije te s dva razvijaača: (1) etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i (2) etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Korištene su standardne otopine fenolnih kiselina (kavene, klorogenske, ružmarinske i ferulične kiseline). Kromatografske zone su detektirane prskanjem Naturstoff-reagensom i 5 %-tnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG) te promatranjem kromatograma pod UV svjetlom valne duljine 365 nm; na kromatogramu s razvijaačem (1) uočeno je 11 odvojenih zona koje su se međusobno razlikovale u bojama i intenzitetima. Najjači intenzitet razvijenih kromatografskih zona uočen je u uzorcima vrsta *V. longifolia* L. i *V. chamaedrys* L., a najmanji u uzorcima vrsta *V. cymbalaria* L. i *V. hederifolia* L. Nije bilo moguće sa sigurnošću potvrditi prisutnost svih ispitanih fenolnih kiselina, iako se usporedbom dobivenih  $R_f$  vrijednosti može pretpostaviti njihova prisutnost. Vrlo slični rezultati s 13 odvojenih zona dobiveni su s razvijaačem (2). Nisu uočene veće razlike dobivenih kromatograma s različitim stacionarnim fazama.

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima odabranih vrsta roda *Veronica* provedena je spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji s nitrit-molibdat reagensom u lužnatom mediju i mjerenjem apsorbancije na 505 nm (sadržaj izražen kao ružmarinska kiselina) te na 525 nm (sadržaj izražen kao klorogenska kiselina). Najveći udio fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina zabilježen je u uzorcima vrsta *V. longifolia* L. (2,72 %) i *V. chamaedrys* L. (3,59 %), a najmanji udio zabilježen je u uzorcima vrsta *V. cymbalaria* L. (0,44 %) i *V. hederifolia* L. (0,60 %), što potvrđuje rezultate dobivene kvalitativnom TLC analizom fenolnih kiselina. Analogni rezultati dobiveni su i



spektrofotometrijskom metodom preko klorogenske kiseline, tj. najveći udio zabilježen je u uzorcima vrsta *V. longifolia* L. (5,55 %) i *V. chamaedrys* L. (7,18 %), a najmanji sadržaj u uzorcima vrsta *V. cymbalaria* L. (0,81 %) i *V. hederifolia* L. (1,07 %). Usporedbom rezultata utvrđen je veći sadržaj klorogenske nego ružmarinske kiseline u ispitivanim uzorcima odabranih vrsta.

Istraživanja provedena u okviru ovoga diplomskoga rada proširila su saznanja o polifenolnom sadržaju, kao i sastavu i sadržaju fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima odabranih biljnih vrsta te općenito pridonose istraživanjima polifenolnih spojeva u vrstama roda *Veronica* L.

## 5. LITERATURA

- Akanda MR, Nam HH, Tian W, Islam A, Choo BK, Park BY. Regulation of JAK2/STAT3 and NF- $\kappa$ B signal transduction pathways; *Veronica polita* alleviates dextran sulfate sodium-induced murine colitis, 2018; <https://www.sciencedirect.com/>, pristupljeno 12.2.2021.
- Albach D.C., Grayer R.J., Kite G.C., Jensen S.R. *Veronica*: Acylated flavone glycosides as chemosystematic markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 2005, 33, 1167-1177.
- Albach D.C., Jensen S.R., Özgökçe F., Grayer R.J. *Veronica*: Chemical characters for the support of phylogenetic relationships based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequence data. *Biochem. Syst. Ecol.* 2005, 33, 1087-1106.
- Albach D.C., Martínez-Ortega M.M., Chase M.W. *Veronica*: Parallel morphological evolution and phylogeography in the Mediterranean. *Plant Syst. Evol.* 2004, 246, 177-194.
- 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.
- Barreira J.C.M., Dias M.I., Zivkovic J., Stojkovic D., Sokovic M., Santos-Buelga C., Ferreira I.C.F.R. Phenolic profiling of *Veronica* spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments. *Food Chem.* 2014, 163, 275-283.
- Bival Štefan M. Biološki učinci fenolnih kiselina iz odabranih vrsta porodice Lamiaceae. Doktorski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism, and Nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 1998, 56(11), str. 317-333.
- Connors R, Konarev AV, Forsyth J, Lovegrove A, Marsh J, Joseph-Horne T, Shewry P, Brady RL. An Unusual Helix-Turn-Helix Protease Inhibitory Motif in a Novel Trypsin Inhibitor from Seeds of *Veronica* (*Veronica hederifolia* L.), 2007; <https://www.sciencedirect.com/>, pristupljeno 12.2.2021.
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 2007, 43, str. 348-361.

Domac R. Flora Hrvatske, Priručnik za određivanje bilja, Školska knjiga, Zagreb 1994, 303-305.

Dunkic V., Kosalec I., Kosir I.J., Potocnik T., Cerenak A., Zovko Koncic M., Vitali D., Dragojevic Muller I., Koprivanec M., Bezic N., et al. Antioxidant and antimicrobial properties of *Veronica spicata* L. (Plantaginaceae). *Curr. Drug Targets*, 2015, 16, 1660-1670.

EDQM. European Pharmacopoeia. 9 ed. Strasbourg, Council of Europe, 2018; <http://online6.edqm.eu/>, pristupljeno 15.2.2021.

Fierascu RC, Georgiev MI, Fierascu I, Ungureanu C, Avramescu SM, Ortan A, Georgescu MI, Sutan AN, Zangfirescu A, Dinu-Pirvu CE, Valescu BS, Anuta V. Mitodepressive, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory effects of wild-growing Romanian native *Arctium lappa* L. (Asteraceae) and *Veronica persica* Poiret (Plantaginaceae), *Cellular and Molecular Biology*, 2018, 64(8), 50–56; <http://europepmc.org>, pristupljeno 12.2.2021.

Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet, Školska knjiga, Zagreb 1990, 619.

Ganzera, M., Strum S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis – An update covering 2011–2016. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 147, 211-233.

Harborne JB. *Biochemistry of Phenolic Compounds*. London-New York: Academic Press, 1964, str. 57-62, 83, 136, 149.

Hegi G, *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, Band VI/1, Carl Hanser Verlag, München 1954, 591-593.

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

Jurišić Grubešić R., Vladimir Knežević S. Kvalitativna fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L., *Farmaceutski glasnik*, 2004, 191-192.

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.

Maleš Ž. *Farmaceutska botanika*, interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2011, str. 153-154.

Nazlić M., Kremer D., Jurišić Grubešić R., Soldo B., Vuko E., Stabentheiner E., Ballian D., Bogunić F., Dunkić V. Endemic *Veronica saturejoides* Vis. ssp. *satuejoides*—Chemical Composition and Antioxidant Activity of Free Volatile Compounds, *Plants*, 2020, 9, 1646.

Plantaginaceae-*Veronica* – MonFlora, <https://montereywildflowers.com/plantaginaceae-veronica/>, pristupljeno 11.2.2021.

Ralph J., Quideau S., Grabber JH., Hatfield RD. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1994, 1, 3485-3498.

Plantaginaceae | World of Flowering Plants, <https://worldoffloweringplants.com/>, pristupljeno 15.2.2021.

Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 2009, 58, str. 121-128.

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

Russell WR., Burkitt MJ., Provan GJ., Chesson A. Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. *J Sci Food Agric*, 1999, 79, 408-410.

Salehi B, Shetty MS, Kumar NVA, Živković J, Calina D, Docea AO, Emamzadeh-Yazdi S, Kılıç CS, Goloshvili T, Nicola S, Pignata G, Sharopov F, Contreras MDM, Cho WC, Martins N, Sharifi-Rad J. *Veronica* Plants-Drifting from Farm to Traditional Healing, Food Application, and Phytopharmacology, 2019; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 12.2.2021.

Sharifi-Rad M, Tayeboon GS, Sharifi-Rad J, Iriti M, Varoni EM, Razazi S. Inhibitory activity on type 2 diabetes and hypertension key-enzymes, and antioxidant capacity of *Veronica persica* phenolic-rich extracts, 2016; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 12.2.2021.

Sharifi-Rad M., Tayeboon G.S., Sharifi-Rad J., Iriti M., Varoni E.M., Razazi S. Inhibitory activity on type 2 diabetes and hypertension key-enzymes, and antioxidant capacity of *Veronica persica* phenolic-rich extracts. *Cell. Mol. Biol.* 2016, 62, 80-85.

Thomford N.E., Senthebane D.A., Rowe A., Munro D., Seele P., Maroyi A., Dzobo K. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1578.

Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. *Flora Europaea*, Vol. 3, Cambridge University Press, Cambridge 1972, 242-251.

Vladimir-Knežević S., Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije, Interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 20-21.

Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Alegro A., Kószegi 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, nastavni materijal. Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.

Vuković R. Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidativni status transgenog korijenja ukrasne koprive (*Colleus blumei* Benth.). Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2013.

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

Wagner H. Pharmazeutische Biologie, Drogen und ihre Inhaltsstoffe, 5. neubearbeitete Auflage. Stuttgart-New York, Gustav Fischer Verlag, 1983, str. 39, 147, 244-249, 267.

Zivkovic J.C., Barreira J.C.M., Savikin K.P., Alimpic A.Z., Stojkovic D.S., Dias M.I., Santos-Buelga C., Duletic-Lausevic S.N., Ferreira I.C.F.R. Chemical profiling and assessment of antineurodegenerative and antioxidant properties of *Veronica teucrium* L. and *Veronica jacquinii* Baumg. *Chem. Biodivers.* 2017, 14, e1700167.

## 6. SAŽETAK / SUMMARY

### Sažetak

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina odabranih vrsta roda *Veronica* L. (Plantaginaceae). Prisutnost polifenolnih spojeva dokazana je kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Kvalitativna analiza fenolnih kiselina (kavene, klorogenske, ružmarinske i ferulične) primjenom tankoslojne kromatografije nije sa sigurnošću potvrdila njihovu prisutnost, iako se ona može pretpostaviti. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijski te je sadržaj mjeren kao ružmarinska kiselina (505 nm) i klorogenska kiselina (525 nm). Maseni udio analiziranih fenolnih kiselina odabranih biljnih vrsta izraženih kao ružmarinska kiselina kretao se u rasponu od 0,44 % (*V. cymbalaria* L.) do 3,59 % (*V. chamaedrys* L.), odnosno, izraženih kao klorogenska kiselina u rasponu od 0,81 % (*V. cymbalaria* L.) do 7,18 % (*V. chamaedrys* L.). Provedena kvalitativna i kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju odabranih vrsta roda *Veronica* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu ovih biljnih vrsta, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih fenolnih tvari.

## Summary

In this graduate thesis, qualitative and quantitative analysis of phenolic acids of selected species of the genus *Veronica* L. (Plantaginaceae) was carried out. The presence of polyphenols has been demonstrated by general chemical reactions of developing colored products and precipitates. Qualitative analysis of phenolic acids (caffeic, chlorogenic, rosmarinic, and ferulic acid) using thin layer chromatography did not confirmed their presence with certainty, although it can be assumed. Quantitative analysis of phenolic acids was carried out using the spectrophotometric method. Phenolic acids were analyzed on 505 nm (expressed as rosmarinic acid) and 525 nm (expressed as chlorogenic acid). The contents of analyzed compounds from selected species varied from 0.44 % (*V. cymbalaria* L.) to 3.59 % (*V. chamaedrys* L.), when expressed as rosmarinic acid, and from 0.81 % (*V. cymbalaria* L.) to 7.18 % (*V. chamaedrys* L.), when expressed as chlorogenic acid. Conducted qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of selected species of the genus *Veronica* L. and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of these species, especially in relation to the content of bioactive phenolic substances.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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 FENOLNIH KISELINA ODABRANIH VRSTA RODA *VERONICA* L. (PLANTAGINACEAE)

Nives Molc

#### SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina odabranih vrsta roda *Veronica* L. (Plantaginaceae). Prisutnost polifenolnih spojeva dokazana je kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Kvalitativna analiza fenolnih kiselina (kavene, klorogenske, ružmarinske i ferulične) primjenom tankoslojne kromatografije nije sa sigurnošću potvrdila njihovu prisutnost, iako se ona može pretpostaviti. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijski te je sadržaj mjereno kao ružmarinska kiselina (505 nm) i klorogenska kiselina (525 nm). Maseni udio analiziranih fenolnih kiselina odabranih biljnih vrsta izraženih kao ružmarinska kiselina kretao se u rasponu od 0,44 % (*V. cymbalaria* L.) do 3,59 % (*V. chamaedrys* L.), odnosno, izraženih kao klorogenska kiselina u rasponu od 0,81 % (*V. cymbalaria* L.) do 7,18 % (*V. chamaedrys* L.). Provedena kvalitativna i kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju odabranih vrsta roda *Veronica* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu ovih biljnih vrsta, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih fenolnih tvari.

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

Rad sadrži: 51 stranicu, 26 slika, 11 tablica i 43 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Veronica* L., polifenoli, fenolne kiseline, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, TLC, UV-Vis, kemijske reakcije stvaranja obojenih produkata i taloga

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. Željka Vanić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2021.



## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC ACIDS OF SELECTED SPECIES OF THE GENUS *VERONICA* L. (PLANTAGINACEAE)

Nives Molc

#### SUMMARY

In this graduate thesis, qualitative and quantitative analysis of phenolic acids of selected species of the genus *Veronica* L. (Plantaginaceae) was carried out. The presence of polyphenols has been demonstrated by general chemical reactions of developing colored products and precipitates. Qualitative analysis of phenolic acids (caffeic, chlorogenic, rosmarinic, and ferulic acid) using thin layer chromatography did not confirmed their presence with certainty, although it can be assumed. Quantitative analysis of phenolic acids was carried out using the spectrophotometric method. Phenolic acids were analyzed on 505 nm (expressed as rosmarinic acid) and 525 nm (expressed as chlorogenic acid). The contents of analyzed compounds from selected species varied from 0.44 % (*V. cymbalaria* L.) to 3.59 % (*V. chamaedrys* L.), when expressed as rosmarinic acid, and from 0.81 % (*V. cymbalaria* L.) to 7.18 % (*V. chamaedrys* L.), when expressed as chlorogenic acid. Conducted qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of selected species of the genus *Veronica* L. and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of these species, especially in relation to the content of bioactive phenolic substances.

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

Thesis includes: 51 pages, 26 figures, 11 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Veronica* L. polyphenols, phenolic acids, qualitative analysis, quantitative analysis, TLC, UV-Vis, chemical reactions of developing colored products and precipitates

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  
**Željka Vanić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2021