

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta Stachys iva Griseb. i Stachys horvaticii Micevski, Lamiaceae

Vukičević, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:592190>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



Ivana Vukičević

**Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta
Stachys iva Griseb. i *Stachys horvaticii* Micevski,
Lamiaceae**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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

Zahvaljujem:

- mentorici dr.sc. Renati Jurišić Grubešić, na stručnoj pomoći pri izradi ovog rada, na svim savjetima i nesebičnoj pomoći u svakom trenutku;
- dr.sc. Dariju Kremeru na savjetima i pomoći pri izradi ovog rada;
- kolegicama Marini Šimunić i Dariji Vukelić, s kojima sam radila diplomski rad u istom Laboratoriju pod istim uvjetima, na uzajamnoj pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi;
- svim članovima Zavoda na kojem je rad izrađen, na nesebičnoj asistenciji i pomoći u svakom trenutku;

Velika hvala mojim roditeljima i sestri na podršci, ljubavi i strpljenju koje su mi pružali tijekom cijelog školovanja te dečku i prijateljima koji su bili uz mene sve ove godine.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Botanički podaci	2
1.1.1. Porodica Lamiaceae (usnače)	2
1.1.2. Rod <i>Stachys</i> L. (čistac)	3
1.1.3. Vrste <i>Stachys iva</i> Griseb. i <i>S. horvaticii</i> Micevski	3
1.2. Biološki aktivne tvari vrsta <i>Stachys iva</i> i <i>S. horvaticii</i>	6
1.2.1. Polifenoli	6
1.2.2. Trjeslovine ili tanini	9
1.2.3. Flavonoidi	13
1.2.4. Fenolne kiseline	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Biljni materijal	21
3.2. Aparatura i kemikalije	21
3.3. Metode i postupci istraživanja	22
3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola i trjeslovina	22
3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina	23
3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida	24
3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola i trjeslovina	27
4.2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina	28
4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida	32
4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina	34
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37
7. SAŽETAK/SUMMARY	42

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA POLIFENOLA VRSTA *STACHYS IVA* GRISEB. I *S. HORVATICII* MICEVSKI, LAMIACEAE

Ivana Vukičević

SAŽETAK

U ovom je diplomskom radu provedena kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari u nadzemnim dijelovima vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae). Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari za vrstu *Stachys iva* iznosio je: $6,03 \pm 0,03\%$ (UP); $1,70 \pm 0,01\%$ (T); $0,15 \pm 0,00\%$ (F) i $1,65 \pm 0,02\%$ (FK), a za vrstu *S. horvaticii*: $3,80 \pm 0,02\%$ (UP); $0,78 \pm 0,03\%$ (T); $0,43 \pm 0,00\%$ (F) i $0,74 \pm 0,01\%$ (FK). Vrsta *Stachys iva* imala je dvostruko više ukupnih polifenola, trjeslovina i fenolnih kiselina od vrste *S. horvaticii*, dok je u vrste *S. horvaticii* izmjereno više flavonoida. Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Stachys* te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae).

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

- Rad sadrži: 43 stranice, 16 grafičkih prikaza, 8 tablica i 58 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: *Stachys iva* Griseb., *S. horvaticii* Micevski, polifenoli, trjeslovine, flavonoidi, fenolne kiseline, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija
- Voditeljica: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
- Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Jadranka Vuković Rodríguez, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Željka Vanić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj, 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF POLYPHENOLS OF *STACHYS IVA* GRISEB. AND *S. HORVATICII* MICEVSKI, LAMIACEAE

Ivana Vukičević

SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative analysis of polyphenols in aerial parts of *Stachys iva* Griseb. and *S. horvaticii* Micevski was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. Quantitative analyses of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) were carried out using spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds in *Stachys iva* were as follows: 6.03±0.03% (UP); 1.70±0.01% (T); 0.15±0.00% (F), and 1.65±0.02% (FK), and in *S. horvaticii*: 3.80±0.02% (UP); 0.78±0.03% (T); 0.43±0.00% (F), and 0.74±0.01% (FK). *Stachys iva* had twice the total polyphenols, tannins, and phenolic acids than *S. horvaticii*, while *S. horvaticii* had more flavonoids. Performed phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of the genus *Stachys*, and also contributes to the existing knowledge concerning phytotherapeutic potential of *Stachys iva* Griseb. and *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae).

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

Thesis includes: 43 pages, 16 figures, 8 tables, and 58 references. Original is in Croatian language.
Keywords: *Stachys iva* Griseb., *S. horvaticii* Micevski., total polyphenols, tannins, flavonoids, phenolic acids, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry
Mentor: **Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jadranka Vuković Rodríguez, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vanić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2016

1. UVOD

Liječenje biljem ima tisućljetnu tradiciju. Dugo je to bio i jedini način liječenja i ublažavanja boli, a iskustvenim se spoznajama znanje prenosilo s generacije na generaciju.

Stoljeća uporabe ljekovitog bilja u narodnoj medicini potkrijepljena su današnjim znanstvenim i kliničkim istraživanjima o djelotvornosti i neškodljivosti pa modernu fitoterapiju ne treba svrstavati u alternativnu medicinu, već je sagledavati kao dio znanstvene medicine.

U posljednje vrijeme znatno raste interes medicine i farmacije za znanstvena istraživanja terapijskih vrijednosti biljnih tvari. Specifični mehanizmi djelovanja, sastav i sadržaj bioaktivnih tvari u biljkama, kao i njihovi terapijski učinci velik su izazov za znanstvenike i stručnjake različitih područja i prestaju biti nepoznanice.

Biljne droge dokazane učinkovitosti postaju oficinalne u nacionalnim ili regionalnim farmakopejama i time se službeno odobrava njihova terapijska primjena.

Danas je uglavnom poznat kemizam glavne djelatne tvari, a samu primjenu ljekovitog bilja treba racionalizirati i prepustiti stručnjacima, što je posebice važno pri kombiniranju različitog ljekovitog bilja te njegova uzimanja s drugim lijekovima.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari dokazanog biološkog djelovanja iz nadzemnih dijelova vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae), u svrhu njihove fitokemijske karakterizacije te spoznavanja fitoterapijskog potencijala.

1.1. Botanički podaci

1.1.1. Porodica Lamiaceae (usnače)

Porodica Lamiaceae (usnače) obuhvaća 225 rodova sa 6170 vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu, a najviše na području mediterana i u iransko-turskoj regiji (Grdinić i Kremer, 2009). Budući da pripadnici ove porodice vole tople predjele i vapnenačku podlogu, u Hrvatskoj rastu ponajviše u primorskom području, no zastupljene su s mnogo oblika i u flori unutrašnjih krajeva (Kušan, 1956; Forenbacher, 1990).

Porodica Lamiaceae obuhvaća zeljaste jednogodišnje i dvogodišnje biljke ili trajnice, odnosno polugrmove i grmove, često sa sekretornim dlakama koje sadrže eterično ulje koje im daje aromatičan miris. Stabljika je često četverobridna, a listovi jednostavni, bez palistića, unakrsno nasuprotno poredani, cjeloviti, ponekad razdijeljeni, većinom aromatični. Cvjetovi su dvospolni, rjeđe jednospolni, većinom zigomorfni, ponekad gotovo aktinomorfni. Čaška je sastavljena od pet međusobno sraslih listića, cjevasta je ili zvonasta, s 4-5 režnjeva ili dvousnata. Ukoliko je čaška dvousnata, tada je gornja usna trozuba, a donja dvozuba. Vjenčić je sastavljen od pet latica, a ima ljevkastu ili valjkastu cijev i petorežnjasti obod. Obod vjenčića je većinom dvousnat, pri čemu dvije latice čine gornju, a tri donju usnu. Ponekad je gornja usna zakržljala, pa je vjenčić dvousnat ili su dva gornja režnja međusobno srasla, tako da je obod vjenčića skoro pravilan i četverorežnjast. U cvijetu se nalazi jedan tučak. Plodnica tučka je nadrasla, s četiri pretinca, a u svakom pretincu se nalazi po jedan sjemeni zametak. Tučak ima jedan vrat koji je u gornjem dijelu razdijeljen nadvoje. Prašnici su prirasli za cijev vjenčića, ima ih četiri ili ponekad dva, pri čemu su dva kraća, a dva dulja (dvomoćni prašnici). Vrat tučka i prašnici su svijeni i najčešće skriveni ispod gornje usne vjenčića. Cvjetovi su skupljeni u zbijeni dihazijalni ili monohazijalni prividni pršljen u pazušcu zalistaka, koji tvore jednostavne ili sastavljene cvatove nalika na klas, paštitac, gronju, metlicu ili glavicu, rjeđe prave paštitce. Zalisci su nalik na listove (reducirani i neugledni), dok su predlistići mali ili nedostaju. Plod je sitni kalavac s ostacima čaške, koji se pri dozrijevanju raspada na četiri suha, rjeđe mesnata jednosjemena plodića (merikarpa) (Grdinić i Kremer, 2009).

Mnoge vrste porodice Lamiaceae su i začinske biljke, a njihova ulja imaju primjenu u kozmetičkoj industriji (Mägdefrau i Ehrendorfer, 1997).

1.1.2. Rod *Stachys* L. (čistac)

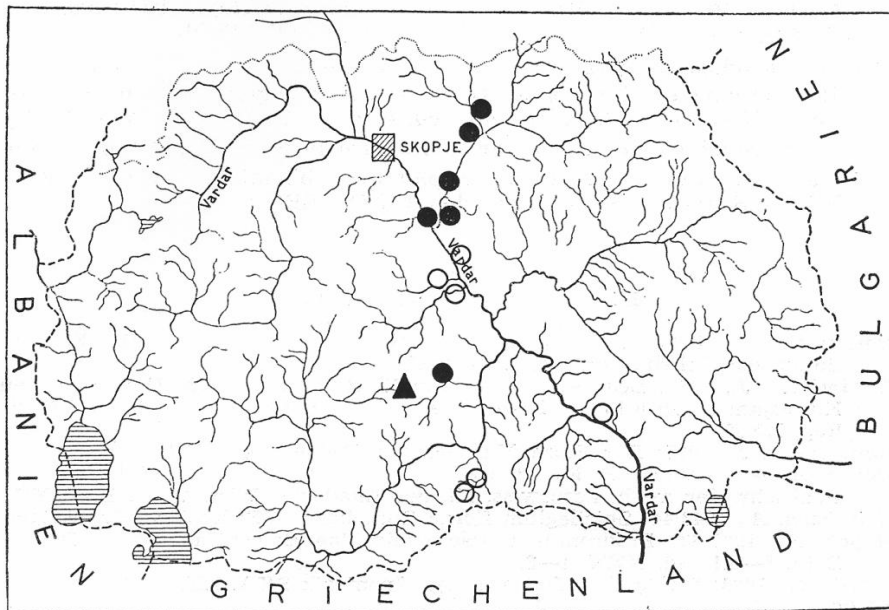
Rod *Stachys* L. obuhvaća oko 300 kozmopolitski rasprostranjenih vrsta i predstavlja jedan od najvećih rodova porodice *Lamiaceae*. Taj je rod zastupljen u hrvatskoj flori s 19 svojti, od kojih su 8 endemične za Balkanski poluotok (Bilušić Vundać, 2006). Vrste roda *Stachys* rasprostranjene su u umjereoju, tropskoj i suptropskoj regiji, s iznimkom Malezije, Australije i Novog Zelanda. Rastu kao jednogodišnje ili višegodišnje biljke ili mali grmovi. Cvjetovi tvore cvatove nalik na pršljenasti paštitac, klas ili su rjeđe nalik glavici. Predlistići su prisutni ili nedostaju. Čaška je cjevasta ili zvonasta, dvousnata, s pet jednakih zubaca i 5 do 10 žila. Vjenčić je dvousnat. Gornja usna sastoji se od dva, a donja od tri latice. Prašnici su prirasli za cijev vjenčića, ima ih četiri, pri čemu su dva kraća, a dva dulja. Plod je kalavac.

1.1.3. Vrste *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski

Vrste *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski su endemične makedonske vrste, koje su isključivo vezane za vapnenac, i to ili za stijene, ili za kamenjare. Vrsta *S. iva* je ograničena samo na malo područje u okolini Prilepa (Pletvar i Sivec), dok areal svojte *S. horvaticii* obuhvaća gotovo čitav sliv rijeke Vardara u širem smislu riječi (Slika 1). Vrsta *S. horvaticii* uglavnom je vezana za niže predjele, od 100 do 850 m nadmorske visine (n.m.), dok se vrsta *S. iva* penje i preko 1000 m n.m. na Pletvaru i Sivecu. Nadalje, *S. horvaticii* se podjednako dobro razvija i na otvorenim vapnenačkim kamenjarima i u klisurama, i to najčešće u zajednici s vrstom *Inula aschersoniana* (Micevski, 1969).

Stabljika vrste *S. iva* je uspravna, prekrivena vunastim dlakama, visine 15-40 cm, pri dnu drvenasta. Listovi su lancetasti ili jajasti, dugi 15-60 mm, široki 4-15 mm, tupi, oblo zupčasti, prekriveni vunastim dlakama. Čaška je duga 8-12mm, a zupci časke su veći od cijevi čaške i na vrhu završavaju golom dugačkom bodljom (Slika 2). Vjenčić je veličine 15-20 mm, žut, pustenast. Gornja usna je duga 4-6 mm, a donja 7-10 mm.

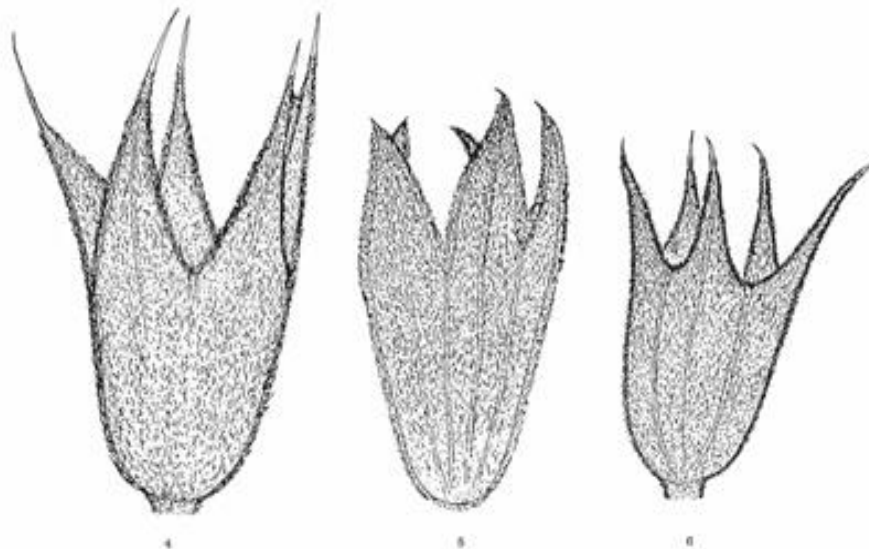
Stabljika vrste *S. horvaticii* također je uspravna, razgranata, prekrivena vunastim dlakama. Listovi su duguljasto lancetasti, tupi, oblo zupčasti. Čaška je bijelo pustenasta, zupci trokutasti, uvijek kraći od cijevi i na vrhu završavaju slabom bodljom koja je gotovo do vrha obrasla kovrčavim dlakama (Slika 2) Cvjetovi su skupljeni u paštitasti cvat. Vjenčić je intenzivno žut, svijetložut, ružičast ili svijetloružičast.



Sl. 7. (Abb. 7)

▲ *Stachys iva*, ● *Stachys horvaticii*, ○ *Stachys horvaticii* var. *macedonica*

Slika 1. Rasprostranjenost vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* (Micevski, 1969).



Sl. 4. (Abb. 4) — *Stachys iva* Griseb.

Sl. 5. (Abb. 5) — *Stachys horvaticii* Micevski

Sl. 6. (Abb. 6) — *Stachys horvaticii* Micevski
var. *horvaticii* f. *lutea* Micevski

Slika 2. Čaška vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* (Micevski, 1969).



Slika 3. *Stachys iva* Griseb., Lamiaceae (Foto: V. Matevski).



Slika 4. *Stachys horvaticii* Micevski, Lamiaceae (Foto: V. Matevski).

1.2. Biološki aktivne tvari vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii*

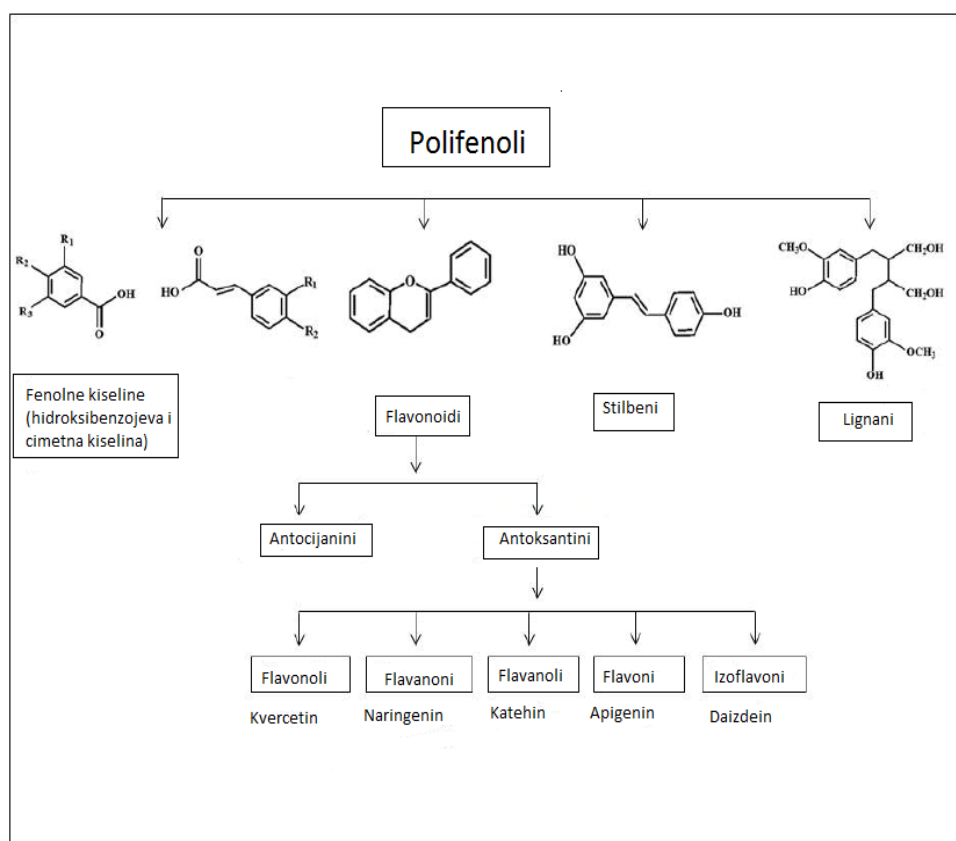
1.2.1. Polifenoli

Struktura i značajke

Polifenoli kao sekundarni metaboliti biljnih organizama čine vrlo raznoliku skupinu kemijskih spojeva, koji se mogu na temelju njihove strukture i sličnih kemijskih svojstava svrstati u nekoliko definiranih grupa, a svi nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora, šikiminske kiseline (Pandey i dr., 2009). Biljkama primarno služe kao molekule uključene u obranu od UV zračenja ili napada patogena, pigmentaciju, rast i razmnožavanje (Manach i dr., 2004). Strukturu polifenola čini aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. U polifenole spadaju fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani, koji se zatim dijele u manje podskupine (Slika 5).

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

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



Slika 5. Podjela polifenola na temelju njihovih kemijskih struktura i primjeri (Manach i sur., 2004).

Rasprostranjenost

Polifenoli su česti sastojci hrane biljnog podrijetla i glavni antioksidansi u našoj prehrani. Najveći izvor polifenola su voće i pića dobivena od biljaka, kao što su voćni sokovi, čaj, kava i crno vino. Jabuke, grožđe, kruške, trešnje i razno bobičasto voće sadrže 200-300 mg polifenola na 100 g svježeg voća. Čaša crnog vina, šalica čaja ili kave sadrže u prosjeku oko 100 mg polifenola. Žitarice, čokolada i suhe mahunarke također pridonose unosu polifenola. Ukupno se dnevno unese oko 1 g tih spojeva, što je mnogo više od svih ostalih poznatih antioksidansa koje unosimo hranom, oko 10 puta više od unosa vitamina C i 100 puta više od unosa vitamina E i karotenoida.

Većina namirnica sadrži kompleksne smjese polifenola pa je tako za mnoge biljne proizvode sastav polifenola slabo poznat. Na njihov sastav utječu okolišni čimbenici, koji mogu biti pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina) ili agronomski (uzgoj u stakleniku ili na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci i dr.). Skladištenje također može

utjecati na sadržaj polifenola ukoliko se radi o polifenolima koji su podložni oksidaciji. Reakcije oksidacije dovode do nastanka jedne ili više polimernih molekula, što dovodi do promjena u kakvoći namirnica i organoleptičkim svojstvima koje mogu biti poželjne (crni čaj) ili nepoželjne (smeđa boja narezanog voća). Priprema hrane također utječe na količinu polifenola prisutnih u namirnicama. Primjerice, guljenje voća i povrća uklonit će značajnu količinu polifenola, budući da su polifenoli često u puno većim koncentracijama prisutni u vanjskim dijelovima voća i povrća nego u unutrašnjim. Znatno gubitak polifenola događa se i termičkom pripremom hrane (Manach i sur., 2004).

Biološki učinci

Pozitivna djelovanja polifenola navedena u znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antiulkusno, analgetsko, antimalarično, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Petrik, 2008).

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

Polifenoli također moduliraju aktivnost velikog broja enzima (telomeraza, ciklooksigenaza, lipooksigenaza i dr.) te staničnih receptora. Mogu stupati i u interakciju s različitim signalnim putovima i tako utjecati na transdukciju signala, a sve je više i dokaza koji govore u prilog utjecaju polifenola na regulaciju staničnog ciklusa te na funkciju trombocita (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004).

Puno dokaza o prevenciji bolesti primjenom polifenola potječe od *in vitro* istraživanja ili pokusa na životinjama, koji se često provode dozama mnogo većim od onih kojima su izloženi ljudi kroz prehranu. Očito je da polifenoli poboljšavaju status različitih biomarkera oksidativnog stresa. No, mnogo nesigurnosti i dalje postoji vezano uz značaj tih biomarkera

kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Također, postoje i studije s kontradiktornim rezultatima koje govore o prooksidativnom učinku polifenola zbog kojega mogu posljedično inducirati apoptozu i inhibirati staničnu proliferaciju. Jedan od razloga kontradiktornih rezultata leži u tome što polifenolne tvari čini velik broj različitih spojeva s različitim biološkim djelovanjem, stoga se učinak jednog polifenolnog spoja ne može generalizirati za ostale spojeve. Kako se istraživanja često provode na puno većim dozama od onih unesenih prehranom, nužno je poznavanje biorasploživosti i metabolizma različitih polifenolnih spojeva, kao i poznavanje rasprostranjenosti te sadržaja tih spojeva u hrani. Ta su znanja neophodna za razumijevanje odnosa između unosa polifenola hranom i rizika za razvoj različitih bolesti. Poznavanje biorasploživosti polifenolnih spojeva, koja značajno varira između različitih vrsta tih spojeva, važna je budući da polifenoli najzastupljeniji u našoj prehrani ne moraju nužno imati i najbolju biorasploživost (Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

1.2.2. Tjeslovine ili tanini

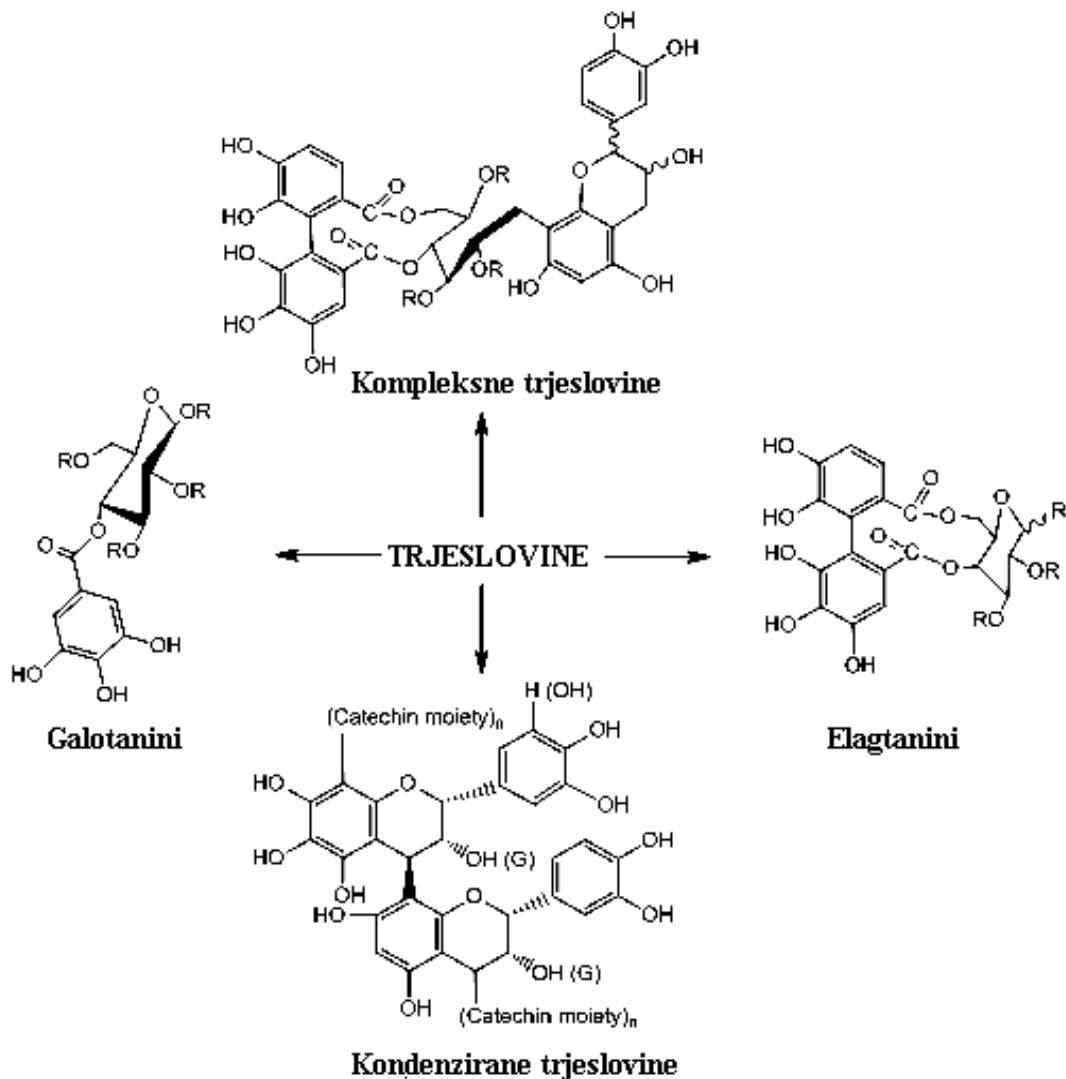
Struktura i značajke

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

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

Izolacija bioaktivnih stilbenoida i raznih oligomera rezveratrola, kao i flortanina iz smeđih algi, proširila je skupinu trjeslovina i povezanih polifenola i na navedene grupe spojeva.

Zbog čestih nemogućnosti provjera strukture trjeslovina opisanih u istraživanjima, a što je neophodno za karakterizaciju bioloških i farmakoloških svojstava nekog spoja, došlo je do uvođenja dodatne kategorizacije trjeslovina i povezanih polifenola u dvije grupe: tip A (s konstantnom strukturom) i tip B (s promjenjivom strukturom) (Okuda i Ito, 2011).



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

Trjeslovine koje hidroliziraju

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

Kondenzirane trjeslovine

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

Rasprostranjenost

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

Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene u biljci, pri čemu ih najviše sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi, i konačno, plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine, Gallae ili sisarke (šiške). Radi se o patološkim izraslinama na listu azijskog hrasta i na listovima ruja koje su nastale razvojem ličinke ose (azijski hrast) ili jedne vrste biljnih uši (kineski ruj), a mogu sadržavati do 75% trjeslovina. Razvija se larva, a biljka zbog podražaja stvara trjeslovine. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, utvrđeno je da se trjeslovine javljaju u većoj količini u mladim dijelovima biljke (lisnim pupoljcima, mladim listovima i cvjetovima), što se objašnjava time da biljka gomila trjeslovine u onim dijelovima koji su joj najvrjedniji. Količina tanina u biljci varira ovisno o različitim okolišnim i sezonskim čimbenicima. Suša, visoka temperatura, velika izloženost svjetlu i slaba kvaliteta zemlje stvaraju uvjete koji pogoduju povećanom sadržaju trjeslovina u biljci. Sezonska varijabilnost sadržaja ovisi o fazi rasta biljke pa je tako sinteza tanina najintenzivnija u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen njezin rast, pa su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalođera, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

Biološki učinci

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

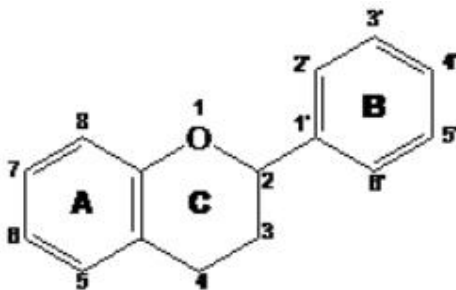
Glavna upotreba trjeslovina povezana je s njihovim adstringentnim učinkom. Djeluju protiv dijareje i antiseptički, štiteći izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Precipitirajući proteine, trjeslovine djeluju antimikrobno i antifungalno. Također, imaju hemostatsko djelovanje i mogu djelovati kao antidoti kod nekih slučajeva trovanja (teškim metalima, crnom kavom i većinom alkaloida). Interno se još mogu koristiti i kod želučanog i crijevnog katara te hiperaciditetnog gastritisa. U procesu cijeljenja rana, opekline, ozeblina i upala, trjeslovine pomažu stvaranjem zaštitnog sloja preko ozlijeđenog

tkiva, omogućavajući da se ispod njega slobodno odvija cijeljenje. Istraživanja su pokazala da mnoge trjeslovine neutraliziraju slobodne radikale, a poznato je da su mnoge degenerativne bolesti (rak, multipla skleroza, ateroskleroza, proces starenja) povezane s visokim koncentracijama slobodnih radikala između stanica. Također, određeni tipovi trimernih proantocijanidina mogu štititi protiv bolesti urinarnog trakta. No, trjeslovine su raznoliki spojevi s velikom varijacijom strukture i koncentracije u biljnom svijetu. Zbog toga su biomedicinska istraživanja pozitivnih i negativnih učinaka na zdravlje pri povećanom unosu trjeslovina znatno ograničena nedostatkom metoda za brzu karakterizaciju i standardizaciju (de Jesus i sur., 2012; Kalodera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

1.2.3. Flavonoidi

Struktura i značajke

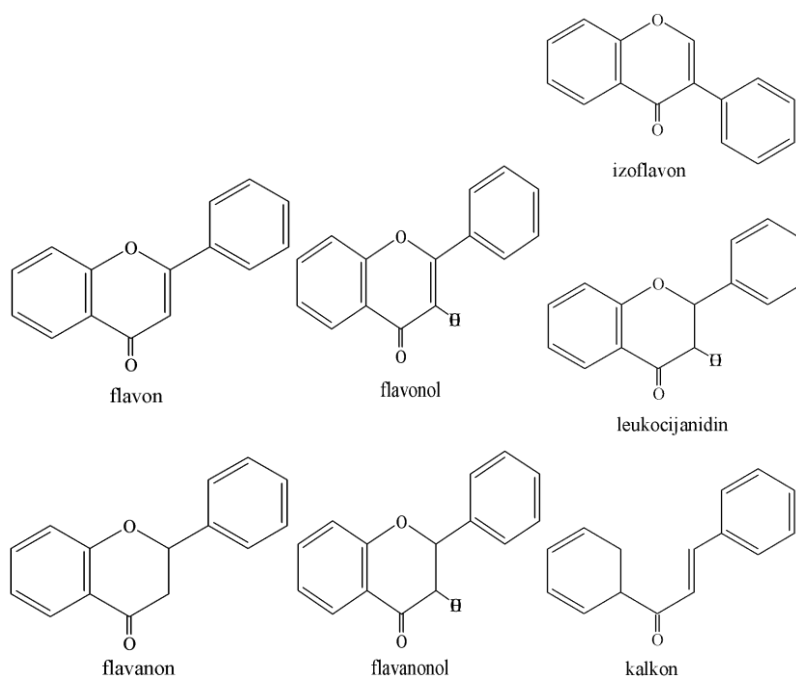
Flavonoidi (Slika 7) su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama te imaju izražena antioksidacijska i antiradikalna svojstva. Dosad je identificirano više od 6400 flavonoida. Flavonoidi su spojevi koji imaju istu osnovnu strukturu, koju tvori difenilpropanski kostur C_{15} ($C_6-C_3-C_6$), tj. dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik. Prema topljivosti se dijele na lipofilne i hidrofilne flavonoide, a najčešće su prisutni u obliku O- i C- glikozida. Međusobno se razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona kod kojih je piranski prsten otvoren. Kod flavonoida postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (Kazazić, 2004).



Slika 7. Osnovna struktura flavonoida (Macheix i sur., 1990)

Flavonoidnim derivatima pripadaju (Slika 8): flavoni, flavonoli (3-hidroksiflavoni), flavanoni (2,3-dihidroflavoni), flavanonoli (3-hidroksi-2,3-dihidroflavoni), izoflavoni (5-fenilbenzo- γ -pironi), antocijanidini (derivati 2-fenil-3,5,7-trihidrobenzopirilijeva hidroksida), leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli), katehini (flavan-3-oli), kalkoni (derivati benzalacetofenona) i auronii (derivati benzalkularan-3-ona) (Wagner, 1993; Maleš, 1990; Steinegger i Hänsel, 1988).

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



Slika 8. Derivati flavonoida.

Rasprostranjenost

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

Rutin je najpoznatiji i vrlo raširen flavonolski glikozid. Izoliran je iz rutvice (*Ruta graveolens* L., Rutaceae). Danas se najčešće dobiva (15-20% rutina) izolacijom iz cvjetnih pupoljaka japanske sofore (*Sophora japonica* L., Fabaceae). Flavanoni su karakteristični za vrste roda *Citrus*, prvenstveno hesperitin i naringenin u obliku glikozida. Izoflavonoidi su zbog karakteristične i rijetke pregradnje molekule ograničeni na porodicu Fabaceae (Vladimir-Knežević, 2008).

Biološki učinci

Postoji mnogo bioloških učinaka flavonoida: protuupalno, antimikrobno, antiviralno, antifungalno, diuretičko, dijaforetičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotoničko, antialergijsko, antiulkusno, analgetičko, antimalaričko, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje; spominje se također citotoksični i citostatični učinak flavonoida te njihovo profilaktičko djelovanje (Jurišić, 2003). Većina tih svojstava flavonoida zasniva se na njihovoj sposobnosti inhibicije i indukcije određenih enzima. Tako, primjerice, flavonoidi inhibiraju hijaluronidazu, aldoza-reduktazu, ksantin-oksidadazu, ciklooksigenazu, lipooksigenazu, fosfolipazu, histidin-dekarboksilazu, cAMP-fosfodiesterazu i dr. Primjeri enzima koje flavonoidi induciraju jesu aril hidrolaza i epoksid hidrolaza. Studije na životinjama pokazale su također citotoksični i citostatični učinak flavonoida te njihovo profilaktičko djelovanje (Kim i sur., 1998; Miller, 1996; Saija i sur., 1995).

U biljnom organizmu flavonoidi sudjeluju u metaboličkim redoks procesima u stanici, njihovom se sintezom uklanjaju štetni fenoli, a postoje zapisi i o njihovom zaštitnom djelovanju od ultraljubičastog zračenja (Vladimir, 1993).

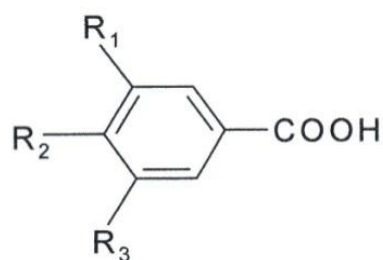
Rutin, najpoznatiji flavonolski glikozid, koristi se kao sredstvo za jačanje kapilara. Listovi i cvjetovi crvenog gloga (*Crataegus oxyacantha* L., Roseaceae) i bijelog gloga (*C. monogyna* Jacq.) sadrže flavonolske glikozide (1-2%). Među flavonolima prevladava hiperozid. Viteksin i njegovi derivati su važni predstavnici flavonskih C-glikozida. Koriste se u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih oboljenja. Oni su tonici za oslabljeno srce, pogotovo kod starijih osoba i u slučajevima kada nije preporučljivo koristiti glikozide digitalisa. Snizuju krvni tlak i poboljšavaju cirkulaciju krvi. Listovi ginka (*Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae) sadrže mono-, di- i tri-glikozide kemferola, kvercetina i izoramnetina, te neglikozidne 3'→8 biflavonoide (amentoflavon). Primjenjuju se u prevenciji i liječenju cerebralne insuficijencije. Plodovi obične sikavice (*Silybum marianum* L. Gaertn., syn. *Cardus marianus* L., Asteraceae) sadrže 1,5-3% silimarina – smjese flavonolignana silibina, silikristina i silidianina koji imaju hepatoprotektivni i antihepatotoksični učinak. Cvijet brđanke (*Arnica montana* L., Asteraceae) sadrži 0,4-0,6% flavonoida koji, pripremljeni u obliku tinkture ili masti, pri eksternoj primjeni pomažu kod upala i bržeg zacjeljivanja rana. Izoflavonoidi imaju različitu primjenu. Tako medikarpin iz lucerne (*Medicago sativa* L., Fabaceae) i pisatin iz graška (*Pisum sativum* L., Fabaceae) imaju antifungalna svojstva, a neki jednostavni izoflavonoidi, kao što su daidzein i kumestrol iz lucerne i djeteline (*Trifolium* spp., Fabaceae) ili izoflavonoidi u soji (*Glycine max* L., Fabaceae) su fitoestrogeni, dok rotenon iz vrsta rodova *Derris* i *Lonchocarpus* djeluje kao insekticid. Udio antocijana u svježem plodu borovnice (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) iznosi oko 0,5% i najčešće su namijenjeni zaštiti kapilarnog sustava (Vladimir-Knežević, 2008).

1.2.4. Fenolne kiseline

Struktura i značajke

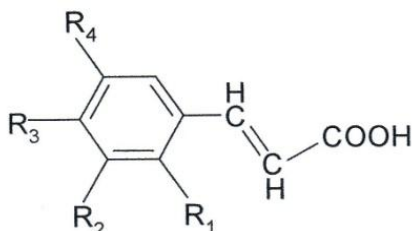
Nakon flavonoida, drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih polifenola čine fenolne kiseline. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Na temelju strukture, razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina (Slike 9 i 10): derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C₆-C₁) i derivati cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline, C₆-C₃) (Robbins i sur., 2003).

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



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

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



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

Rasprostranjenost

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

obliku, osim kod prerađene hrane koja je podvrgnuta smrzavanju, sterilizaciji ili fermentaciji. Vezani su oblici glikozilirani derivati ili esteri kininske ili šikiminske kiseline. Kavena i kininska kiselina zajedno tvore klorogensku kiselinu koja se nalazi u mnogim vrstama voća te u visokim koncentracijama u kavi. Jedna šalica kave može sadržavati 70-350 mg klorogenske kiseline. Borovnice, kivi, šljive, trešnje i jabuke imaju od svih vrsta voća najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina te sadrže 0,5-2 g hidroksicimetnih kiselina po kilogramu svježeg voća. Kavena kiselina, u slobodnom obliku i u obliku estera, najzastupljenija je fenolna kiselina te čini između 75% i 100% ukupnog sadržaja fenolnih kiselina kod većine voća. Hidroksicimetne kiseline se nalaze u svim dijelovima voća, ali u najvećim su koncentracijama prisutne u vanjskom dijelu zrelog voća. Ferulična kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u žitaricama. Njezin se sadržaj u žitaricama kreće između 0,8 g i 2 g po kilogramu suhe žitarice. U vanjskom dijelu zrna žitarice nalazi se čak 98% ukupne ferulične kiseline u zrnu (Manach i sur., 2004).

Biološki učinci

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

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

Objavljena su brojna istraživanja koja opisuju širok raspon bioloških aktivnosti ružmarinske kiseline. Tako, primjerice, ružmarinska kiselina pokazuje snažno antioksidativno, antimutageno, antidepresivno, hepatoprotektivno, protuvirusno, antibakterijsko i antimikotično djelovanje (Furtado i sur., 2008; Tepe, 2008; Swarup i sur., 2007; Vatted i sur., 2006; Widmer i sur., 2006; Qiao i sur., 2005; Bais i sur., 2002; Osakabe i sur., 2002; Takeda i sur., 2002). Nekoliko je istraživanja potvrdilo i protuupalni učinak ružmarinske kiseline, čime je omogućena upotreba te tvari za liječenje različitih upalnih oboljenja. Tako ružmarinska kiselina, zbog svoje antioksidacijske aktivnosti i zbog inhibicije upalnih odgovora, predstavlja vrlo učinkovitu terapiju za alergijski rinokonjuktivitis (Osakabe i sur., 2004). Osim toga, pokazuje i antiangiogeni potencijal koji također može biti povezan s njezinom antioksidacijskom aktivnošću (Huang i sur., 2010).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj je ovoga diplomskog rada kvalitativna i kvantitativna analiza biljnih vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae).

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

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

Svrha kvalitativne i kvantitativne analize provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima spomenutih biljnih vrsta (Kremer i sur., 2016). Radi se o preliminarnim studijama čiji bi rezultati mogli poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala biljnih pripravaka vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae).

3 MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni je materijal prikupljen u Makedoniji tijekom srpnja 2012. godine: lokalitet Pletvar kraj Prilepa (*Stachys iva* Griseb.) i kanjon Raec Reke kod Kavadaraca (*S. horvaticii* Micevski). Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 1994; Šilić, 1990; Tutin i sur., 1972; Micevski, 1969). Analizirani su pulverizirani listovi, cvjetovi i stabljike spomenutih biljnih vrsta.

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparati i pribor:

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

Kemikalije:

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

3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola i trjeslovina

Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

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

Opće reakcije

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

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 3 mL ekstrakta dodaju se 2 kapi otopine formaldehida i 3 kapi 10%-tne klorovodične kiseline. Sadržaj se ugrije do vrenja, ohladi, te zatim profiltrira. Potom se filter papir ispere s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filter papiru koji je netopljiv u toploj 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

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

3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (1976).

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

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

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

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

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

(A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2)

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

3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (1960).

Pulverizirana biljna droga (0,2 g) ekstrahirana je 30 minuta s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne klorovodične kiseline i 1 mL 0,5%-tne otopine heksametilentetramina, zagrijavanjem do vrenja na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Hidrolizat je propušten kroz vatu, a ostaci droge na vati ponovo su ekstrahirani s 20 mL acetona, grijanjem do vrenja 10 minuta. Ta je otopina također propuštena kroz vatu, a prethodno opisana ekstrakcija acetonom ponovljena je još dva puta. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100,0 mL. Potom je 20,0 mL hidrolizata pomiješano s 20 mL vode te ekstrahirano najprije s 15 mL, a zatim tri puta s po 10 mL etil acetata. Sjedinjene etil acetatne faze isprane su dva puta s po 40 mL vode, propuštene kroz vatu i razrijeđene etil acetatom do 50,0 mL. Po 10,0 mL te otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25 mL. U svaku je tikvicu dodano 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijeva citrata. U jednu tikvicu dodano je još 2 mL otopine aluminijskoga klorida (2 g aluminijskoga klorida heksahidrata otopljeno je u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline). Potom su obje tikvice dopunjene do 25,0 mL 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta, izmjerene su apsorbancije otopina s aluminijskim kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus bila je prethodno pripremljena otopina bez aluminijskoga klorida. Maseni udio flavonoida izračunat je kao kvercetin, prema izrazu:

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

(A = apsorbancija; b = masa droge izražena u gramima)

3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina

Količina fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Stachys iva* i *S. horvaticii* određena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium iz Europske farmakopeje (EDQM, 2007).

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

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

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

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

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

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

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola i trjeslovina

Rezultati reakcije dokazivanja polifenola

Dodatkom 0,1 M natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt ispitivanog biljnog uzorka u epruveti je nastalo narančastosmeđe obojenje. Reakcija promjene boje bila je vrlo intenzivna.

Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina

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

Dodatkom 5%-tne otopine željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge nastalo je vrlo intenzivno zelenoplavo zamućenje.

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

Reakcijom trjeslovina sa željezovim(III) amonijevim sulfatom nastalo je vrlo intenzivno zelenoplavo obojenje.

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

Reakcijom trjeslovina s olovovim acetatom nastalo je vrlo intenzivno žutozeleno obojenje.

4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

U reakciji trjeslovina sa želatinom nastalo je slabo blijedožuto zamućenje.

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

Dodatkom 1%-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt droge nastalo je intenzivno narančastocrveno obojenje.

Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina

Nakon dodatka formaldehida i 10%-tne klorovodične kiseline u vodeni ekstrakt droge, sadržaj se ugrije do vrenja te se potom ohladi i profiltrira. Filtar papir se ispere s 1 ml tople vode, a kondenzirane trjeslovine dokazuju se talogom na filter papiru koji je netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida. U ekstraktu vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* nije dokazana prisutnost kondenziranih trjeslovina jer nije nastao talog na filter papiru.

Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu iz reakcije za dokazivanje kondenziranih trjeslovina doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata bez protresivanja, a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U ekstraktu vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* dokazana je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju jer se pojavio jasno vidljiv ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

4.2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina

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

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

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

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

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

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

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina u nadzemnim dijelovima vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* prikazani su u Tablicama 1-4.

Slike 11 i 12 prikazuju primjere spektara dobivenih mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova ispitivanih biljnih vrsta.

Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys iva*.

<i>Stachys iva</i>		Ukupni polifenoli		Sadržaj ukupnih polifenola	
		$A_{720\text{nm}}$ otopine 1	Srednja vrijednost $A_{720\text{nm}}$ otopine 1 \pm SD	%	Srednja vrijednost % \pm SD
ekstrakt	uzorak 1	0,150	0,149 \pm 0,001	6,00	5,96 \pm 0,03
		0,149		5,98	
		0,147		5,88	
	uzorak 2	0,153	0,152 \pm 0,001	6,12	6,07 \pm 0,03
		0,152		6,08	
		0,150		6,00	
	uzorak 3	0,153	0,152 \pm 0,001	6,12	6,07 \pm 0,03
		0,152		6,08	
		0,150		6,00	

Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys horvaticii*.

<i>Stachys horvaticii</i>		Ukupni polifenoli		Sadržaj ukupnih polifenola	
		$A_{720\text{nm}}$ otopine 1	Srednja vrijednost $A_{720\text{nm}}$ otopine 1 \pm SD	%	Srednja vrijednost % \pm SD
ekstrakt	uzorak 1	0,102	0,096 \pm 0,001	4,08	3,83 \pm 0,08
		0,097		3,88	
		0,092		3,68	
		0,092		3,68	
	uzorak 2	0,104	0,098 \pm 0,002	4,16	3,91 \pm 0,08
		0,099		3,96	
		0,094		3,76	
		0,094		3,76	
	uzorak 3	0,103	0,097 \pm 0,002	4,12	3,89 \pm 0,07
		0,098		3,92	
		0,094		3,76	
		0,094		3,76	

Tablica 3. Sadržaj trjeslovina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys iva*.

<i>Stachys iva</i>		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		$A_{720\text{nm}}$ otopine 2	Srednja vrijednost $A_{720\text{nm}}$ otopine 2 \pm SD	A1-A2	Srednja vrijednost (A1-A2) \pm SD	%	Srednja vrijednost % \pm SD
ekstrakt	uzorak 1	0,108	0,107 \pm 0,001	0,042	0,042 \pm 0,001	1,68	1,68 \pm 0,02
		0,106		0,430		1,72	
		0,106		0,041		1,64	
	uzorak 2	0,110	0,109 \pm 0,000	0,043	0,043 \pm 0,001	1,72	1,71 \pm 0,03
		0,108		0,044		1,76	
		0,109		0,041		1,64	
	uzorak 3	0,110	0,109 \pm 0,001	0,043	0,043 \pm 0,000	1,72	1,72 \pm 0,02
		0,108		0,044		1,76	
		0,108		0,042		1,68	

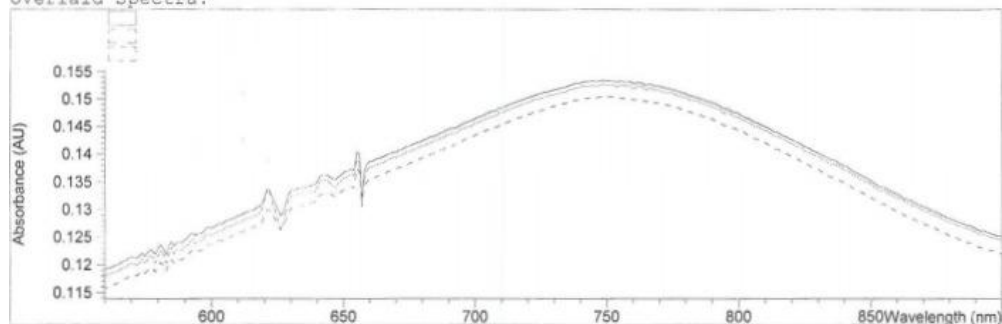
Tablica 4. Sadržaj trjeslovina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys horvaticii*.

<i>Stachys horvaticii</i>		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		$A_{720\text{nm}}$ otopine 2	Srednja vrijednost $A_{720\text{nm}}$ otopine 2 \pm SD	A1-A2	Srednja vrijednost (A1-A2) \pm SD	%	Srednja vrijednost % \pm SD
ekstrakt	uzorak 1	0,076	0,076 \pm 0,000	0,021	0,018 \pm 0,001	0,84	0,72 \pm 0,05
		0,075		0,017		0,68	
		0,076		0,016		0,64	
	uzorak 2	0,079	0,076 \pm 0,001	0,020	0,019 \pm 0,001	0,80	0,77 \pm 0,04
		0,077		0,017		0,68	
		0,073		0,021		0,84	
	uzorak 3	0,077	0,074 \pm 0,002	0,021	0,021 \pm 0,001	0,84	0,84 \pm 0,06
		0,076		0,018		0,72	
		0,070		0,024		0,96	

Sadržaj ukupnih polifenola vrste *Stachys iva* iznosio je 6,03 \pm 0,03%, a sadržaj trjeslovina 1,70 \pm 0,01%. Udio ukupnih polifenola vrste *Stachys horvaticii* bio je 3,88 \pm 0,08%, dok je prosječan sadržaj trjeslovina te biljne vrste iznosio 0,78 \pm 0,03%.

Method file : POLIFEN.M (modified) Last update: Date 7/14/15 Time 10:45:17 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVANAV\SITP1.SD Created : 6/11/15 14:09:55

Overlaid Spectra:

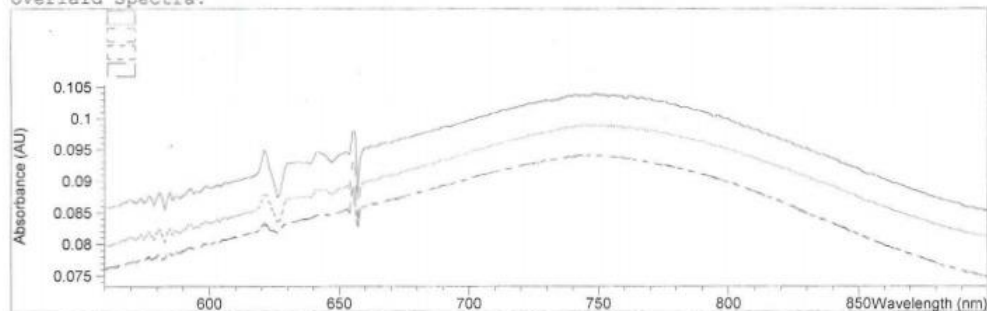


#	Name	Abs<720nm>	Abs<741nm>	Abs<760nm>
1		0.15020	0.15321	0.15284
2		0.14938	0.15249	0.15191
3		0.14712	0.15014	0.14990

Slika 11. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys iva*.

Method file : POLIFEN.M (modified) Last update: Date 7/14/15 Time 10:45:17 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVANAV\SHTP1.SD Created : 6/11/15 14:17:51

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<720nm>	Abs<741nm>	Abs<760nm>
1		0.10192	0.10384	0.10323
2		9.6781E-2	9.8789E-2	9.8491E-2
3		9.2442E-2	9.3999E-2	9.3657E-2
4		9.2444E-2	9.3958E-2	9.3679E-2

Slika 12. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys horvaticii*.

4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru. Metoda se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+} . Tvorbom kompleksa prethodi kisela hidroliza flavonoidnih glikozida kako bi se omogućilo oslobađanje aglikona. Izmjerene su apsorbancije nastalih kompleksa na valnoj duljini od 425 nm te je izračunat udio flavonoida prema formuli: $\% = A \times 0,772 / \text{masa droge (g)}$, izražen kao kvercetin. Slijepe su uzorke predstavljale prethodno pripremljene otopine bez aluminijskoga klorida.

Pripremljen je po jedan ekstrakt svake droge te su pripremljeni uzorci za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Izmjerena je apsorbancija na 425 nm. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* prikazani su u Tablicama 5 i 6, a Slike 13 i 14 predstavljaju spektre dobivene mjerenjem apsorbancije ukupnih flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova ispitivanih biljnih vrsta.

Tablica 5. Sadržaj flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrsta *Stachys iva*.

<i>Stachys iva</i>	Masa uzorka (g)		A_{425nm}	Srednja vrijednost $A_{425nm} \pm SD$	% flavonoida (F)	Srednja vrijednost % F $\pm SD$
ekstrakt	uzorak 1	0,2007	0,038	0,038 \pm 0,001	0,15	0,15 \pm 0,00
			0,038		0,15	
			0,036		0,14	
			0,038		0,15	

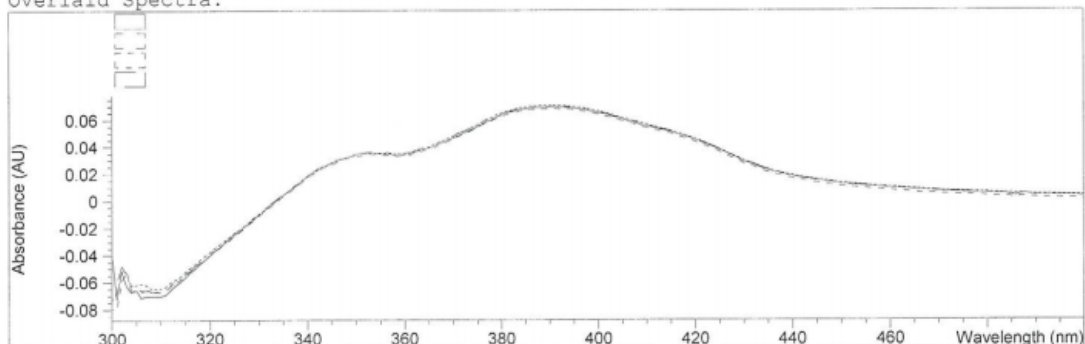
Tablica 6. Sadržaj flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys horvaticii*.

<i>Stachys horvaticii</i>	Masa uzorka (g)		A_{425nm}	Srednja vrijednost $A_{425nm} \pm SD$	% flavonoida (F)	Srednja vrijednost % F $\pm SD$
ekstrakt	uzorak 1	0,2003	0,110	0,112 \pm 0,000	0,42	0,43 \pm 0,00
			0,112		0,43	
			0,113		0,44	

Prosječan sadržaj flavonoida vrste *Stachys iva* iznosio je 0,15%, a vrste *S. horvaticii* 0,43%.

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 7/14/15 Time 10:52:49 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVANAV\SIF.SD Created : 6/15/15 15:26:25

Overlaid Spectra:

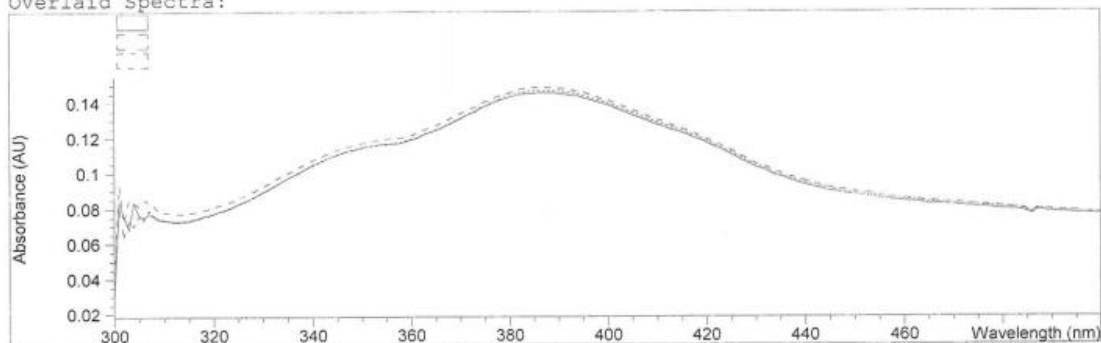


#	Name	Abs<389nm>	Abs<425nm>
1		6.9443E-2	3.7796E-2
2		7.0604E-2	3.8326E-2
3		6.8183E-2	3.6198E-2
4		6.9921E-2	3.8195E-2

Slika 13. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys iva*.

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 7/14/15 Time 10:52:49 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVANAV\SHF.SD Created : 6/15/15 15:38:48

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<389nm>	Abs<425nm>
1		0.14553	0.11063
2		0.14673	0.11175
3		0.14866	0.11292

Slika 14. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys horvaticii*.

4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina

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

Jedanput je pripravljena ekstrakcija biljne droge te je uzet uzorak za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina, a apsorbancija na 505 nm mjerena je tri puta. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* prikazani su u Tablicama 7 i 8, a Slike 15 i 16 prikazuju spektre dobivene mjerenjem apsorbancije ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova ispitivanih biljnih vrsta

Tablica 7. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys iva*.

<i>Stachys iva</i>	Masa uzorka (g)		A_{505nm}	Srednja Vrijednost $A_{505nm} \pm SD$	% fenolnih kiselina (FK)	Srednja vrijednost % FK $\pm SD$
ekstrakt	uzorak	0,2004	0,135	0,133 \pm 0,001	1,68	1,65 \pm 0,02
			0,134		1,67	
			0,129		1,61	

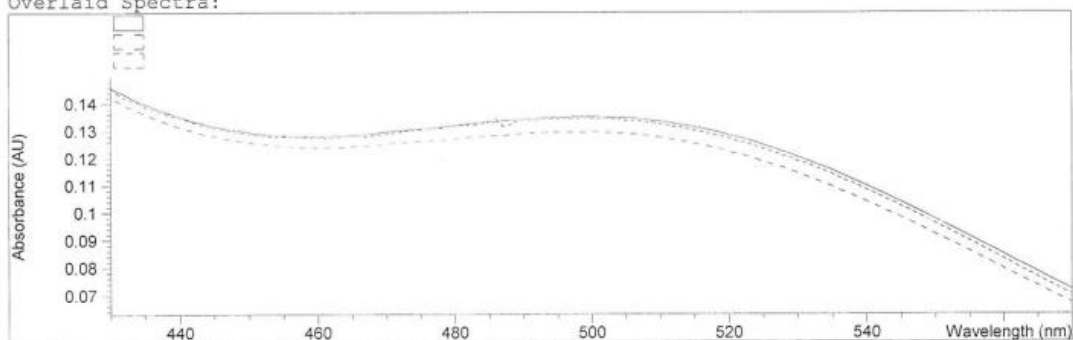
Tablica 8. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys horvaticii*.

<i>Stachys horvaticii</i>	Masa uzorka (g)		A_{505nm}	Srednja Vrijednost $A_{505nm} \pm SD$	% fenolnih kiselina (FK)	Srednja vrijednost % FK $\pm SD$
ekstrakt	uzorak	0,2000	0,063	0,059 \pm 0,001	0,77	0,74 \pm 0,01
			0,057		0,71	
			0,059		0,74	

Prosječan sadržaj fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Stachys iva* iznosio je 1,65 \pm 0,02%, dok je u vrste *S. horvaticii* on bio više od dvostruko niži: 0,74 \pm 0,01%.

Method file : FENKIS.M (modified) Last update: Date 7/14/15 Time 10:49:50 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVANAV\SIPA.SD Created : 6/11/15 15:15:43

Overlaid Spectra:

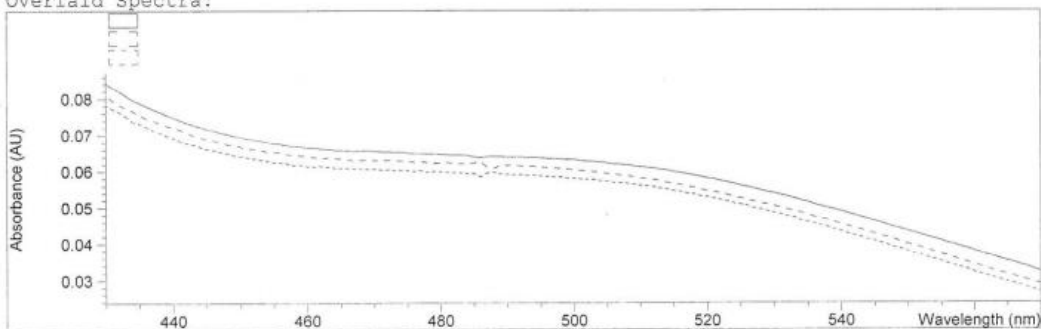


#	Name	Abs<505nm>	#	Name	Abs<505nm>
1		0.13461	3		0.12885
2		0.13370			

Slika 15. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys iva*.

Method file : FENKIS.M (modified) Last update: Date 7/14/15 Time 10:49:50 AM
 Information : Default Method
 Data File : C:\IVANAV\SHPA.SD Created : 6/11/15 15:10:26

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<505nm>	#	Name	Abs<505nm>
1		6.2234E-2	3		5.9303E-2
2		5.7225E-2			

Slika 16. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Stachys horvaticii*.

5 ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski, koja je uključivala kvalitativnu i kvantitativnu analizu ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina.

Dokazivanje polifenola provedeno je općom reakcijom promjene boje, dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge. Trjeslovine su dokazane općim reakcijama stvaranja boje i taloga s metalnim solima i želatinom. Kondenzirane trjeslovine nisu potvrđene jer se nije pojavio talog na filter papiru u reakciji s formaldehidom i 10%-tnom klorovodičnom kiselinom, dok su trjeslovine koje hidroliziraju dokazane pojavom ljubičastog prstena na mjestu prikladnog pH uz dodatak natrijeva acetata trihidrata i 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktu vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* određena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, kojoj prethodi taloženje trjeslovina kazeinom. Sadržaj ukupnih polifenola vrste *Stachys iva* iznosio je $6,03 \pm 0,03\%$, a sadržaj trjeslovina $1,70 \pm 0,01\%$. Prosječan udio ukupnih polifenola vrste *S. horvaticii* iznosio je $3,80 \pm 0,02\%$, a sadržaj trjeslovina $0,78 \pm 0,03\%$.

Kvantitativna analiza flavonoida vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+} , a prosječan je sadržaj flavonoida u nadzemnim biljnim dijelovima vrste *S. iva* iznosio $0,15 \pm 0,00\%$, dok je u nadzemnim dijelovima vrste *S. horvaticii* izmjereno gotovo tri puta više flavonoida, odnosno $0,43\%$.

Fenolne su kiseline u uzorku vrsta *Stachys iva* i *S. horvaticii* određene spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji s nitrit-molibdat reagensom. Sadržaj fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Stachys iva* iznosio je $1,65 \pm 0,02\%$, dok je u vrste *S. horvaticii* izmjereno $0,74 \pm 0,01\%$ fenolnih kiselina.

Općenito se može zaključiti da vrsta *Stachys iva* ima dvostruko više ukupnih polifenola, trjeslovina i fenolnih kiselina od vrste *S. horvaticii*, dok je u vrste *S. horvaticii* zabilježeno gotovo tri puta više flavonoida.

Kvalitativna i kvantitativna analiza biljnih vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski, koja je provedena u okviru ovoga diplomskog rada, predstavlja prilog fitokemijskom istraživanju roda *Stachys*, Lamiaceae.

6 LITERATURA

1. Ascacio-Valdés JA, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilera-Carbo A, Prado-Barragán A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J Med Plant Res*, 2011, 5, 4696-4703.
2. Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.
3. Bilušić Vundać V. Farmakobotanička i kemotaksonomska karakterizacija nekih svojiti roda *Stachys* (Lamiaceae), Doktorski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006.
4. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev*, 1998, 56, 317-333.
5. Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr*, 2011, 30, 490-493.
6. Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)*, 2009, 6, 33.
7. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen des Gehaltes an Flavanol-derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.
8. 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, 348-361.
9. de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 3203-3228.
10. European Pharmacopoeia, Sixth Edition, Vol. 2, Strasbourg: Council of Europe, 2007.
11. Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 587-589.

12. Furtado MA, de Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mut Res*, 2008, 657, 150-154.
13. Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, str. 19-20, 177-178.
14. Gülcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, str. 207, 213-220.
15. Hagerman AE. The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.
16. Harborne JB. Biochemistry of Phenolic Compounds. London-New York, Academic Press, 1964, str. 57-62, 83, 136, 149.
17. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Natr Cancer*, 2010, 61, 1-20.
18. Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyama AH, Yamasaki H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int J Mol Med*, 2011, 28, 595-598.
19. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on dimalindang-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine*, 2004, 11, 424-430.
20. Kalodera Z. Farmakognozija II. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.
21. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arch Industr Hyg Toxicol*, 2004, 55, 279-290.
22. Kremer D, Matevski M, Dunkić V, Bezić N, Stabentheiner E. Essential Oil Contents and Micromorphological Traits of *Stachys iva* Griseb. and *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae). *Records of Nat Prod*, 2016, str. 229-231.
23. Kim HP, Mani I, Ziboh VA. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase from guinea pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1998, 58, 17-24.

24. Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb: Poljoprivredni nakladni zavod, 1956, str. 440-442.
25. Jurišić R. Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L. Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2003.
26. Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*, 2008, 7, 301-311.
27. Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferryl myoglobin: Consumption vs regeneration. *Arch Biochem Biophys*, 1995, str. 323, 373-381.
28. Mägdefrau K, Ehrendorfer F. Udžbenik botanike: za visoke škole: sistematika, evolucija i geobotanika. Zagreb, Školska knjiga, 1997, str. 366-367.
29. Maleš Ž. Izolacija i identifikacija flavonoida drače – *Paliurus spina-christi* Mill., Magistarski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1990, str. 49.
30. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.
31. Miller AL. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1996, 1, 103-111.
32. Micevski K. *Stachys iva* Griseb. I *Stachys horvaticii* Micevski spec. nov. u flori Makedonije. *Acta bot*, 1969, 28, 449-453.
33. Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1993, 21, 833-846.
34. Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants- Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 2011, 16, 2191-2217.
35. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopoly saccharide (LPS) – induced liver injury in d-galactosamine (dGalN) – sensitized mice. *Free Radical Med*, 2002, 33, 798-806.

36. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 2004, 25, 549-557.
37. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.
38. Petrik J, Polifenoli – antioksidansi, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.
39. Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Nisimoto Y, Yoshino M. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Res*, 2005, 39, 995-1003.
40. 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.
41. Rangari VD. Pharmacognosy Tannin Containing Drugs, J.L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.
42. Robards K, Prenzler PD, Tucke G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 1999, 66, 401-436.
43. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agr Food Chem*, 2003, 51, 2866-2887.
44. Russell WR, Burkitt MJ, Provan GJ, Chesson A. Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. *J Sci Food Agric*, 1999, 79, 408-410.
45. Saija A, Scalese M, Lanza M et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19, 481-486.
46. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*, 2011, 403, 136-138.
47. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.
48. Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Arch. Pharm.* 1976, 309, 38-44.

49. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Bio Med*, 2002, 32 , 314-318.
50. Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2007, 51, 3367-3370.
51. Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol*, 2002, 449, 261-267.
52. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea*, Vol. 3, Diapensaceae to Myoporaceae. Cambridge-London-New York-Melbourne, Cambridge University Press, 1972, str. 151-156.
53. Vladimir S. Izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva timijanolisnog vršića–*Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. Magistarski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišt u Zagrebu, Zagreb, 1993, str. 8, 20-30.
54. Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.
55. Vuković R. Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Beuth.). Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2013.
56. Wagner H. *Pharmazentische Biologie, Drogen un ihre Inhaltsstoffe*, 5. neubearbeitete Auflage. Stuttgart-New York, Gustav Fischer Verlag, 1993, str. 39, 147, 244-249, 267.
57. Widmer TL, Laurent N. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. Pathogenic to *Theobroma cacao*. *Eur J Plant Pathol*, 2006, 115, 377-388.
58. Zhang LL, Lin YM. Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 407-415.

7 SAŽETAK

U ovom je diplomskom radu provedena kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari u nadzemnim dijelovima vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae). Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari za vrstu *Stachys iva* iznosio je: $6,03 \pm 0,03\%$ (UP); $1,70 \pm 0,01\%$ (T); $0,15 \pm 0,00\%$ (F) i $1,65 \pm 0,02\%$ (FK), a za vrstu *S. horvaticii*: $3,80 \pm 0,02\%$ (UP); $0,78 \pm 0,03\%$ (T); $0,43 \pm 0,00\%$ (F) i $0,74 \pm 0,01\%$ (FK). Vrsta *Stachys iva* imala je dvostruko više ukupnih polifenola, trjeslovina i fenolnih kiselina od vrste *S. horvaticii*, dok je u vrste *S. horvaticii* izmjereno više flavonoida. Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Stachys* te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrsta *Stachys iva* Griseb. i *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae).

SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative analysis of polyphenols in aerial parts of *Stachys iva* Griseb. and *S. horvaticii* Micevski was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. Quantitative analyses of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) were carried out using spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds in *Stachys iva* were as follows: $6.03 \pm 0.03\%$ (UP); $1.70 \pm 0.01\%$ (T); $0.15 \pm 0.00\%$ (F), and $1.65 \pm 0.02\%$ (FK), and in *S. horvaticii*: $3.80 \pm 0.02\%$ (UP); $0.78 \pm 0.03\%$ (T); $0.43 \pm 0.00\%$ (F), and $0.74 \pm 0.01\%$ (FK). *Stachys iva* had twice the total polyphenols, tannins, and phenolic acids than *S. horvaticii*, while *S. horvaticii* had more flavonoids. Performed phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of the genus *Stachys*, and also contributes to the existing knowledge concerning phytotherapeutic potential of *Stachys iva* Griseb. and *S. horvaticii* Micevski (Lamiaceae).