Fitokemijska karakterizacija polifenola vrste Micromeria frivaldszkyana (Deg.) Vel. (Lamiaceae)

Vukelić, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:700685

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Daria Vukelić

Fitokemijska karakterizacija polifenola vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. (Lamiaceae)

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

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

ZAHVALA

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

Zahvaljujem se svojoj sestri i roditeljima na nesebičnoj podršci.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Botanički podaci 2

1.1.1. Porodica Lamiaceae (usnače) 2

1.1.2. Rod *Micromeria* L. (bresina) 3

1.1.3. *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. 4

1.2. Biološki aktivne tvari vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. 5

1.2.1. Polifenoli 5

1.2.1.1. Struktura i značajke 5

1.2.1.2. Rasprostranjenost 9

1.2.1.3. Biološki učinci 10

1.2.2. Trjeslovine ili tanini 11

1.2.3. Flavonoidi 15

1.2.3.1. Struktura i značajke 15

1.2.3.2. Rasprostranjenost 16

1.2.3.3. Biološki učinci 17

1.2.4. Fenolne kiseline 18

1.2.4.1. Struktura i značajke 18

1.2.4.2. Rasprostranjenost 19

1.2.4.3. Biološki učinci 20

2. OBRAZLOŽENJE TEME 21

3.1. Biljni materijal 22

3.2. Aparatura i kemikalije 23

3.3. Metode i postupci istraživanja 24

3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola 24

3.3.1.1. Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 24

3.3.1.2. Tankoslojna kromatografija (TLC) flavonoida 24

3.3.2. Kvalitativna analiza trjeslovina 24

3.3.2.1. Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 24

3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina 25

3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida 27

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina 28

4. REZULTATI I RASPRAVA 29

4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola 29

4.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja polifenola 29

4.1.2. Rezultati tankoslojne kromatografije (TLC) flavonoida 29

4.2. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina 32
4.2.1. Rezultati reakcija dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 32
4.2.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina 32
4.2.1.2. Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina 33
4.2.1.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju 33
4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina 33
4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida 36
4.5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina 37
5. ZAKLJUČCI 39
6. LITERATURA 40
7. SAŽETAK/SUMMARY 46

1. UVOD

Ljekovito bilje i pripravci od ljekovitog bilja najstariji su način liječenja različitih bolesti. Biljke su sastavni dio našeg svijeta i čovjek je o njima ovisan unatoč napretku znanosti i medicine. Općenito se smatra da biljni lijekovi, ako se pravilno primjenjuju, ne izazivaju neželjene reakcije u organizmu, ili ih je puno manje od onih koje pokazuje konvencionalna terapija. Pučka medicina od svog postanka koristi mnoge prirodne tvari u liječenju, ali je relativno mali broj njih odabran i prihvaćen u suvremenoj terapiji. U posljednje vrijeme znatno raste interes medicine i farmacije za znanstvena istraživanja terapijske vrijednosti biljnih tvari. Biljne droge dokazane učinkovitosti postaju oficinalne u nacionalnim i regionalnim farmakopejama ili srodnim dokumentima i time se službeno odobrava njihova terapijska primjena. Potencijalno ljekovite biljke, dakle biljke koje se tradicionalno široko primjenjuju u narodnoj medicini ili biljke s dokazano ljekovitim srodnicima, podvrgavaju se opsežnim znanstvenim istraživanjima u svrhu utvrđivanja njihove ljekovitosti i, u konačnici, njihova pridruživanja skupini djelotvornih neškodljivih fitoterapeutika.

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

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari dokazanog biološkog djelovanja iz nadzemnih dijelova vrste *Micromeria*

frivaldszkyana (Deg.) Vel. (Lamiaceae), u svrhu njezine fitokemijske karakterizacije te spoznavanja fitoterapijskog potencijala.

1.1. Botanički podaci

1.1.1. Porodica Lamiaceae (usnače)

Porodica *Lamiaceae* obuhvaća oko 3500 biljnih vrsta. Najviše su rasprostranjene u zemljama Sredozemlja i Južnoj Aziji, premda ih možemo naći po čitavom svijetu. U Hrvatskoj rastu ponajviše u primorskom području, budući da pripadnici ove porodice vole tople predjele i vapnenačku podlogu, no zastupljene su s mnogo vrsta i u flori unutrašnjih krajeva (Kušan, 1956; Forenbacher, 1990).

Porodica *Lamiaceae* (usnače) obuhvaća zeljaste (jednogodišnje i dvogodišnje biljke ili trajnice) ili drvenaste biljke, četverostranih stabljika, vrlo često razvijene u obliku grmova. Obično imaju jednostavne listove, smještene unakrsno nasuprotno na stabljici i ograncima. Cvjetovi se razvijaju u pazušcima listova i čine paštitaste cvatove. Cvjetovi su većinom dvospolni, jednosimetrični. Čaška i vjenčić su 4 – 5-člani. Vjenčić je srastao u cijev, koja se na vrhu proširuje i razdvaja u dvije nejednake usne: gornja je vrlo kratka i ravna, s dva režnjića, a donja puno dulja, duboko trokrpasta, izrubljenog srednjeg režnjića. Od četiri prašnika, dva su obično dulja, a dva kraća. Plodnica tučka je nadrasla i sastoji se od dva plodna lista koji čine četiri pretinca (Anić, 1946). Plod je jajasti kalavac koji se najčešće raspada u četiri suha (rijetko mesnata) jednosjemena plodića (Herman, 1971).

Jedno od važnih obilježja usnača jest prisutnost eteričnog ulja koje izlučuju žljezdane dlake stabljike, listova i cvjetova. Upravo to im daje svojstven, aromatičan miris i uvjetuje fitoncidno djelovanje. Mnoge vrste ove porodice su i začinske biljke, a njihova ulja imaju primjenu u kozmetičkoj industriji (Mägdefrau i Ehrendorfer, 1997).

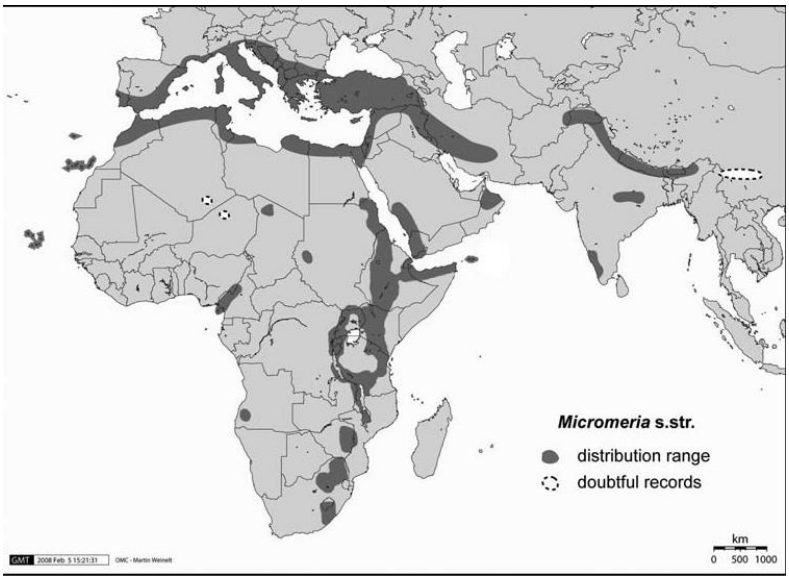
1.1.2. Rod *Micromeria* L. (bresina)

Rod bresina obuhvaća oko 70 vrsta, od čega je 21 vrsta rasprostranjena u Europi, a devet u Hrvatskoj (Kremer i sur., 2011b). Raprostire se od makaronezijsko-mediteranske regije sve do južne Afrike, Indije i Kine. Potvrđena nalazišta kreću se od područja cijelog Mediterana, Kanarskih otoka, Zelenortskog otočja, u Africi od Kameruna, Čada i Eritreje, pa sve do južnog dijela kontinenta, Lesota i Južnoafričke Republike. Na arapskom poluotoku to su rubni dijelovi Yemena i Omana, Saudijske Arabije, te sjever poluotoka u Iraku (Kurdistan). U Aziji su vrste roda *Micromeria* rasprostranjene u Iranu, Afganistanu, Pakistanu, Nepalu, Butanu, jugozapadnom dijelu Indije, Mjanmaru i Kini. Izvješća iz Alžira i Nigera su upitna i potrebno je potvrditi nalazišta ponovnim prikupljanjem biljnog materijala (Bräuchler i sur., 2008).

Vrste roda *Micromeria* su mali, razgranjeni polugrmovi. Listovi su sitni, široko jajasti ili okruglasti ili pak kopljasti do linearni, te manje-više previnutog ruba. Cvjetovi su sjedeći ili na kratkim stapkama. Mogu biti crvene, ljubičaste, blijedoljubičaste ili bijele boje (Forenbacher, 1990). Skupljeni su u rastresite prividne metlice ili grade dugačak isprekidan grozd.

Čaška je cjevasta ili cjevasto zvonasta, pravilna, s 5 jednakih ili gotovo jednakih, ušiljenih zubaca i s 13 – 15 uzdužnih žila. Aktinomorfna je i ravna, odnosno zigomorfna i malo svinuta, rjeđe trbušasto proširena, slabije dvousnata s prilično nejednakim zupcima, u ždrijelu gola ili dlakava (Chater i Guinea, 1972). Ogranci vrata tučka su podjednaki, dok su šiljati prašnici zakrivljeni, divergentni, kraći od vjenčića i ima ih najviše 4.

Vjenčić je dvousan s plosnatom gornjom i trorežnjastom donjom usnom. Pod gornjom se usnom nalaze 4 dvomoćna prašnika koja ne izviru iz vjenčića. Plodovi oraščići su vretenasti ili jajasto-vretenasti, pretežno tamnosmeđe boje, goli ili samo pri vrhu s čuperkom dlačica (Kalođera i Vladimir, 1992).



Slika 1. Rasprostranjenost roda *Micromeria* u svijetu (Bräuchler et al., 2008).

1.1.3. *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

Micromeria frivaldszkyana (Deg.) Vel. je endemična vrsta Bugarske koja raste na svijetlim, većinom silikatnim, stjenovitim staništima između 900 i 1500 m nadmorske visine.

Zeljasta je trajnica s više stabljika visine 15 – 30 cm te s dobro razvijenim, razgranatim korijenom. Stabljika je narijetko dlakava, ponekad blijedocrvenkastosmeđa. Listovi su jajasti, dugi 12 – 20 mm, široki 7 – 15 mm, prema osnovici suženi, tupa vrha, zupčasta ruba, sa svake strane s po 3 – 5 zubaca. S gornje strane listovi su goli ili dlakavi, s donje prozirno žljezdavo točkasti, a uz rub goli ili trepavičavo dlakavi. Listovi su gotovo sjedeći ili s 1,5 – 3 mm dugim peteljkama. Po 2 – 4 cvijeta skupljena su u paštitaste cvatove, a 6 do 14 cvjetova tvori prividne pršljenove koji su po nekoliko zajedno smješteni jedan iznad drugoga. Prividni pršljenovi formiraju kratke, rahle ili gušće, usko piramidalne metličaste cvatove. Sami cvjetovi su na stapkama dugim 2 – 3 mm. Čaška je duga 3,5 – 4,5 mm, s 13 žila i obodom čija duljina iznosi od 1/3 do 1/2 dužine cijevi čaške. Šiljati zupci oboda čaške su međusobno jednaki ili su tri gornja zupca nešto kraća od dva donja. Čaška je gola ili duž žila kratko dlakava. Vjenčić je dug 5 – 6 mm, dvousnat, bjelkast ili blijedoružičast, izvana dlakav, dok se s unutrašnje strane cijevi vjenčića nalaze dva uzdužna reda dlačica. Gornja usna vjenčića je na vrhu zaobljena i plitko

urezana, dok je donja trorežnjasta, a režnjevi međusobno podjednaki. Duguljasti, na krajevima suženi plodovi (oraščići) su dugi 0,9 – 1,0 mm, smeđi, glatki i goli (Anchev, 1989).




Slika 2. *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel., Lamiaceae (Foto: D. Ivanova).

1.2. Biološki aktivne tvari vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

1.2.1. Polifenoli

1.2.1.1. Struktura i značajke

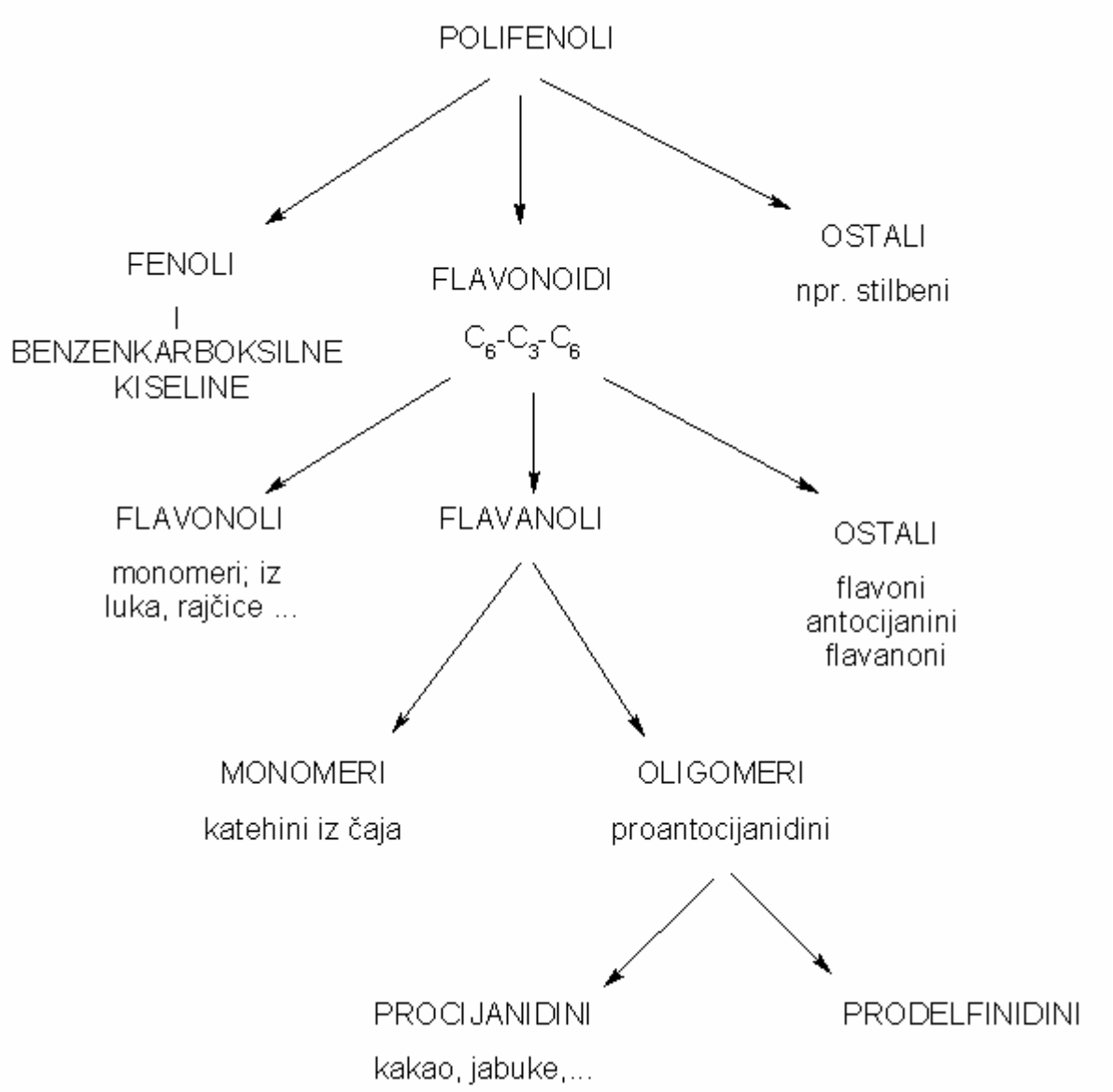
Polifenoli su jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari. U skupinu polifenola ubrajamo više od 8000 spojeva različite kemijske strukture. Osnovno je obilježje polifenola prisutnost jednog ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova (Bravo, 1998). Sekundarni su metaboliti biljnog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

Polifenole sačinjavaju fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida, tj. flavonoidi bez vezanih molekula šećera, posjeduju strukturu tipa C_6-C_3-C_6. Pritom su atomi ugljika raspoređeni tako da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem koji može ili ne mora formirati treći prsten. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difenileten kao funkcionalnu skupinu (Rastija i Medić-Šarić, 2009; Haslam i Cai, 1994).

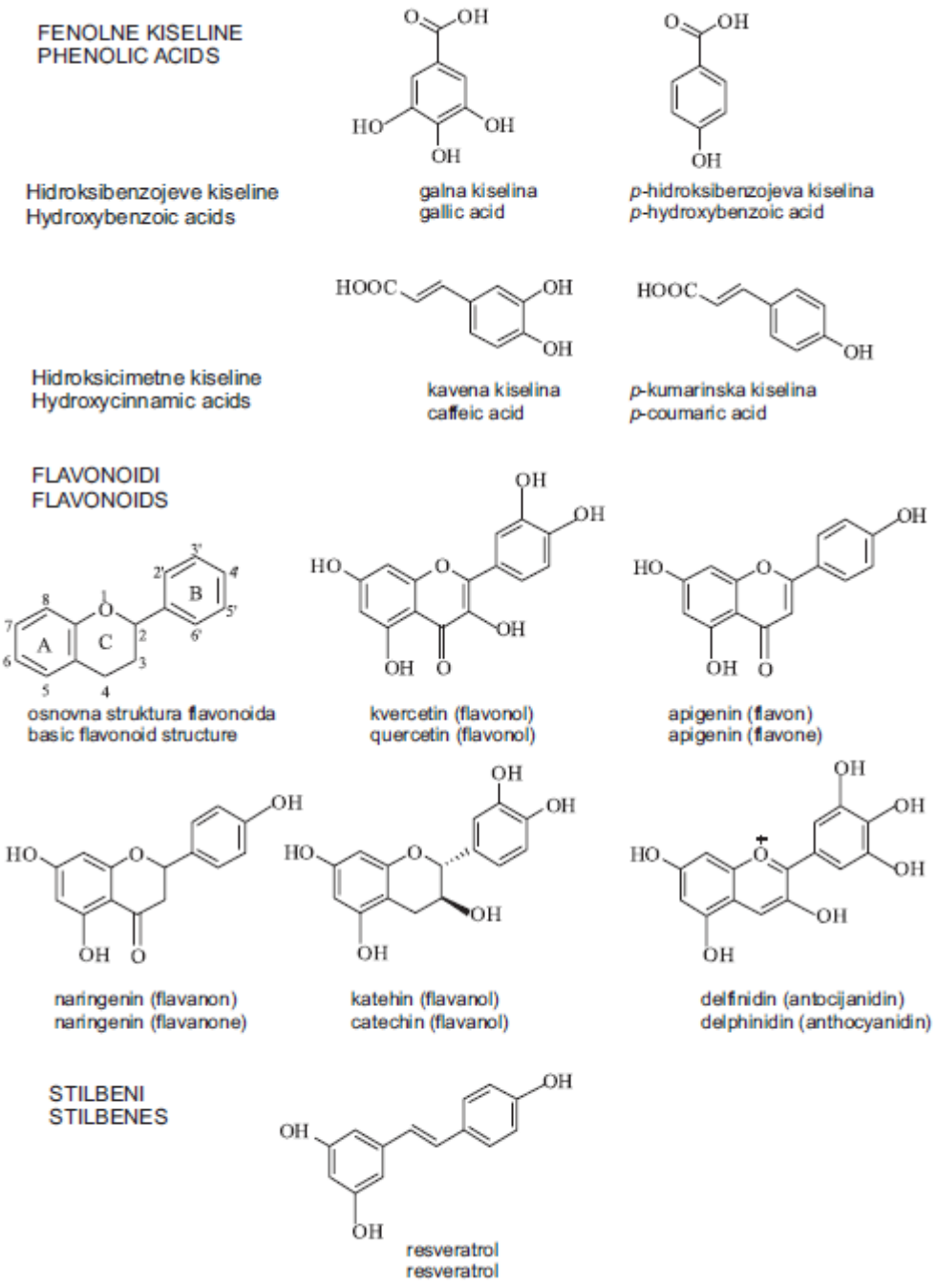
Polifenoli se sintetiziraju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je ključna tvar u nastanku aromatskih prirodnih spojeva. Univerzalni je prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama)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

U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida, a najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukoronsku 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 3. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 4. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

1.2.1.2. Rasprostranjenost

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

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

1.2.1.3. Biološki učinci

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

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

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

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

Puno dokaza o prevenciji bolesti primjenom polifenola potječe od *in vitro* istraživanja ili pokusa na životinjama, koji se često provode dozama mnogo većim od onih kojima su izloženi ljudi kroz prehranu. Očito je da polifenoli poboljšavaju status različitih biomarkera oksidativnog stresa. No, mnogo nesigurnosti i dalje postoji vezano uz značaj tih biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Također, postoje i studije s kontradiktornim rezultatima, koje govore o prooksidativnom učinku polifenola zbog kojega mogu posljedično inducirati apoptozu i inhibirati staničnu proliferaciju. Jedan od razloga kontradiktornih rezultata leži u tome

što polifenolne tvari čini veliki broj različitih spojeva s različitim biološkim djelovanjem, stoga se učinak jednog polifenolnog spoja ne može generalizirati za ostale spojeve. Kako se istraživanja često provode na puno većim dozama od onih unesenih prehranom, nužno je poznavanje bioraspoloživosti 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 bioraspoloživosti polifenolnih spojeva, koja značajno varira između različitih vrsta tih spojeva, iznimno je važna, budući da polifenoli najzastupljeniji u našoj prehrani ne moraju nužno imati i najbolju bioraspoloživost (Primorac, 2012; Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

1.2.2. Trjeslovine ili tanini

1.2.2.1. Struktura i značajke

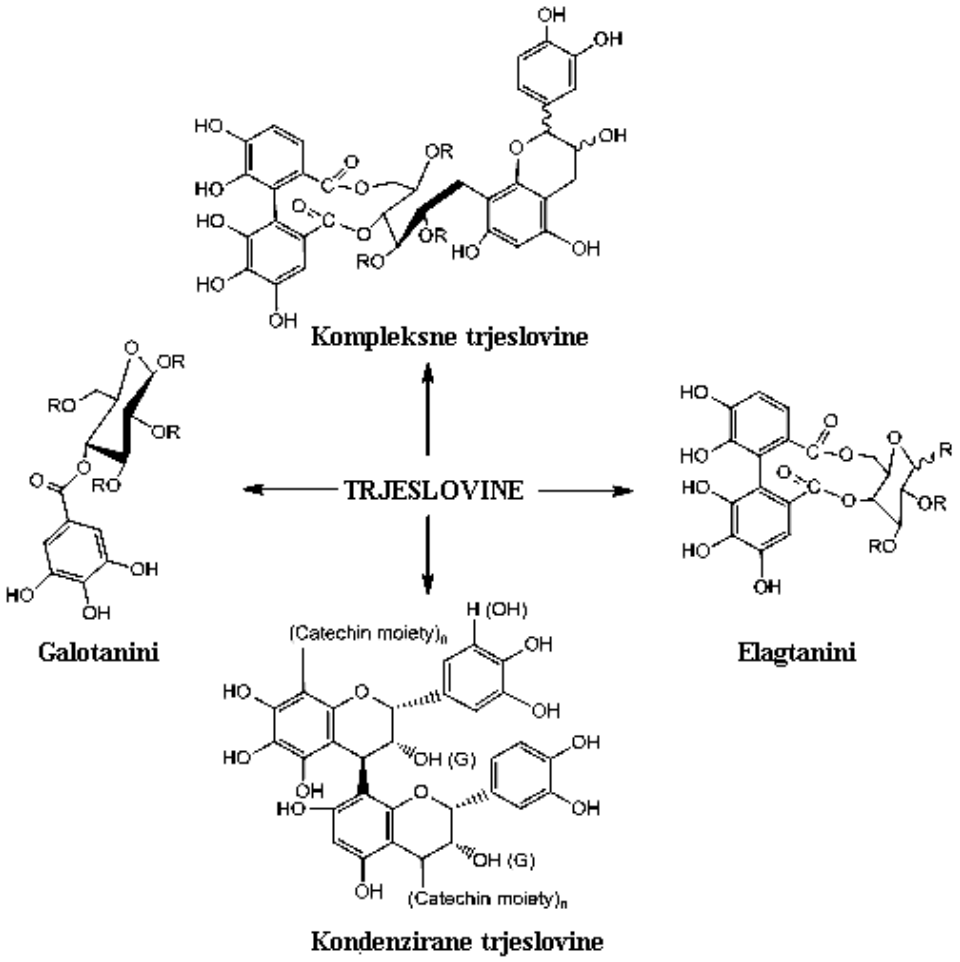
Trjeslovine su skupina fenolnih spojeva koji su značajan produkt sekundarnog metabolizma biljaka. Ime im potječe iz 1796. kada je opisana njihova sposobnost da reagiraju sa životinjskom kožom pri njenoj obradi („tanning“). Karakteristike koje razlikuju trjeslovine od ostalih vrsta biljnih polifenola načelno su: vezivanje na proteine, baze, pigmente, velike molekule i metalne ione, antioksidativno djelovanje i drugo. Te se značajke koriste za njihovo kvalitativno i kvantitativno razlikovanje pri analizi polifenola. Postoje različiti pristupi kategorizaciji trjeslovina. Jednu od podjela prikazuje Slika 5. 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; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007) u sljedeće skupine:

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

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

Zbog čestih nemogućnosti provjera strukture trjeslovina opisanih u istraživanjima, a što je neophodno za karakterizaciju bioloških i farmakoloških svojstava nekog spoja, došlo je do

uvođenja dodatne kategorizacije trjeslovina i povezanih polifenola u dvije grupe: tip A (s konstantnom strukturom) i tip B (s promjenjivom strukturom) (Okuda i Ito, 2011).



Slika 5. Podjela trjeslovina (Ascacio-Valdés i sur., 2011).

Trjeslovine koje hidroliziraju

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

Kondenzirane trjeslovine

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

1.2.2.2. 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 šišarke (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 mlađim 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).

1.2.2.3. Biološki učinci

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

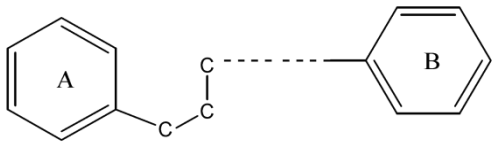
Glavna upotreba trjeslovina je povezana s njihovim adstrigenim učinkom. Djeluju protiv dijareje i antiseptički, štiteći izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Precipitirajući proteine, trjeslovine djeluju antimikrobno i antifungalno. Također, imaju hemostatsko djelovanje i mogu djelovati kao antidoti kod nekih slučajeva trovanja (teškim metalima, crnom kavom i većinom alkaloida). Interno se još mogu koristiti i kod žučanog i crijevnog katara te hiperaciditetnog gastiritisa. U procesu cijeljenja rana, opeklina, 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 značajno ograničena nedostatkom metoda za brzu karakterizaciju i standardizaciju (de Jesus i sur., 2012; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

1.2.3. Flavonoidi

1.2.3.1. Struktura i značajke

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

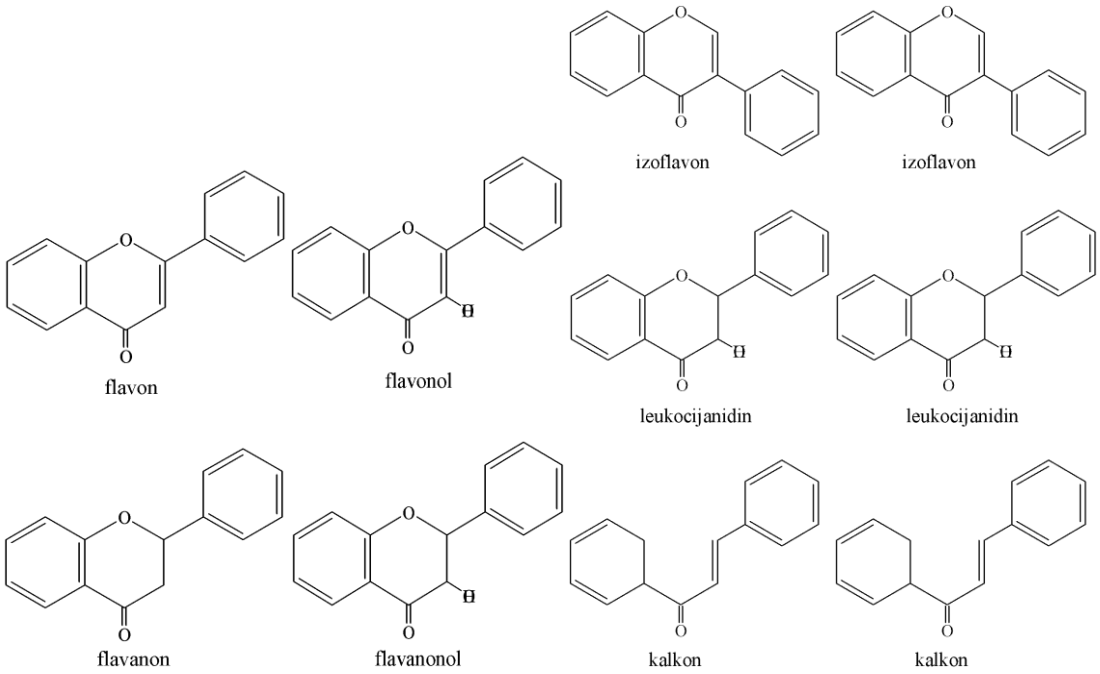


Slika 6. C_6-C_3-C_6 struktura flavonoida.

Raznolikost flavonoidnih spojeva uvjetovana je stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama. Flavonoidnim derivatima pripadaju: flavoni, flavonoli (3-hidroksiflavoni), flavanoni (2,3-dihidroflavoni), flavanonoli (3-hidroksi-2,3-dihidroflavoni), izoflavoni (5-fenilbenzo-γ-pironi), antocijanidini (derivati 2-fenil-3,5,7-trihidrobenzopirilijeva hidroksida), leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli), katehini (flavan-3-oli), kalkoni (derivati benzalacetofenona) i auroni (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 7. Osnovne strukture flavonoida.

1.2.3.2. 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 idioblastima 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 (*Sophpra japonica* L., Fabaceae). Flavanoni su karakteristični za vrste roda *Citrus*, prvenstveno hesperitin i naringenin u obliku glikozida. Izoflavonoidi su zbog karatkeristične i rijetke pregradnje molekule ograničeni na porodicu Fabaceae (Vladimir-Knežević, 2008).

1.2.3.3. Biološki učinci

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

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

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

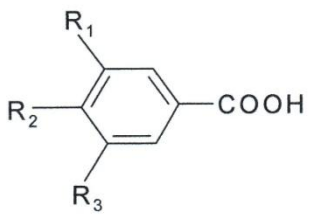
flavonolignana silibina, silikristina i silidianina koji imaju hepatoprotektivni i antihepatotoksični učinak. Cvijet brđanke (*Arnica montana* L., Asteraceae) sadrži 0,4-0,6% flavonoida koji, pripremljeni u obliku tinkture ili masti, pri eksternoj primjeni pomažu kod upala i bržeg zacjeljivanja rana.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

1.2.4. Fenolne kiseline

1.2.4.1. Struktura i značajke

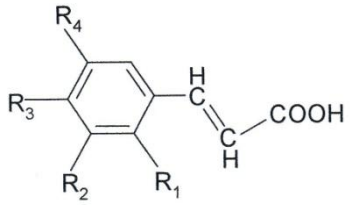
Nakon flavonoida, drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih polifenola čine fenolne kiseline. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Na temelju strukture, razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C_6-C_1) i derivati cimetne kiseline (hidroksicimetne kiseline, C_6-C_3) (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 cimetne kiseline (Russell i sur., 1999).



Slika 8. 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 9. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990).

1.2.4.2. Rasprostranjenost

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

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

kiselina kod većine voća. Hidroksicimetne kiseline se nalaze u svim dijelovima voća, ali u najvećim su koncentracijama prisutne u vanjskom dijelu zrelog voća. Ferulična kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u žitaricama. Njezin se sadržaj u žitaricama kreće između 0,8 g i 2 g po kilogramu suhe žitarice. U vanjskom dijelu zrna žitarice nalazi se čak 98% ukupne ferulične kiseline u zrnu (Manach i sur., 2004).

1.2.4.3. 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; Vattem i sur., 2006; Widmer i sur., 2006; Qiao i sur., 2005; Bais i sur., 2002; Osakabe i sur., 2002; Takeda i sur., 2002). Nekoliko je istraživanja potvrdilo i protuupalni učinak ružmarinske kiseline, čime je omogućena upotreba te tvari za liječenje različitih upalnih oboljenja. Tako ružmarinska kiselina, zbog svoje antioksidacijske aktivnosti i zbog inhibicije upalnih odgovora, predstavlja vrlo učinkovitu terapiju za alergijski rinokonjuktivitis (Osakabe i sur., 2004). Osim toga, pokazuje i antiangiogeni potencijal koji također može biti povezan s njezinom antioksidacijskom aktivnošću (Huang i sur., 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovoga diplomskog rada bila je fitokemijska karakterizacija polifenolnih tvari vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. (Lamiaceae)

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

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

Svrha fitokemijske karakterizacije provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima vrste *M. frivaldszkyana*. Radi se o preliminarnim studijama čiji bi rezultati mogli poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala biljnih pripravaka vrste *M. frivaldszkyana*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal je prikupljen tijekom srpnja 2013. godine u Bugarskoj, na Staroj Planini (planina Balkan), južno od grada Gabrova. Nalazište ove vrste je u pukotinama vapnenačkih stijena te na šljunčanim i stjenovitim mjestima (Slika 10). Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Tutin i sur., 1972; Anchev, 1989). Analizirani su pulverizirani nadzemni dijelovi (stabljike, listovi i cvjetovi) vrste *Micromeria frivaldszkyana*.



Slika 10. *Micromeria frivaldszkyana* sa Stare Planine (Foto: D. Ivanova)

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);
- stalci i lijevci za odjeljivanje, povratna hladila, pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, epruvete, kapalice, filtar papir;
- odmjerne tikvice; Erlenmeyerove tikvice;
- TLC ploče s tankim slojem Kieselgela 60 F_{254}; kromatografske komore; kapilare.

Kemikalije:

- aceton (Claro-Prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska);
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- beta-etilaminoester difenilborne kiseline (Fluka, Buchs, Švicarska);
- etanol (Badel, Zagreb, Hrvatska);
- etil acetat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- Folin-Ciocalteuov fenolni reagens (Merck, Damstadt, 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);
- mravlja kiselina (TTT, Sveta Nedjelja, 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);
- polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska);
- 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

3.3.1.1. Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

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

Opće reakcije

Reakcije promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge.

3.3.1.2. Tankoslojna kromatografija (TLC) flavonoida

Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina u pripremljenom ekstraktu provodi se na tankom sloju Kieselgela 60 F_{254}, uz razvijač etil acetat - mravlja kiselina - ledena octena kiselina - voda (100:11:11:27, 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 H. i sur., 1983). Naturstoff-reagens se pripremi otapanjem 1g β-etilaminoestera difenilborne kiseline u 100 mL metanola.

3.3.2. Kvalitativna analiza trjeslovina

3.3.2.1. Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

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

Opće reakcije

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

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

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

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

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

3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria frivaldszkyana* 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* mućkano je s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta. Potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavljao *otopinu 2*.

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

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

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

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

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

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

3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria frivaldszkyana* 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 aluminijeva klorida (2 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno je u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline). Potom su obje tikvice dopunjene do 25,0 mL 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta, izmjerene su apsorbancije otopina s aluminijevim kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus bila je prethodno pripremljena otopina bez aluminijeva klorida. Maseni udio flavonoida izračunat je kao kvercetin, prema izrazu:

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

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

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina

Količina fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria frivaldszkyana* određena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium iz Europske farmakopeje (Ph. Eur., 2007).

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

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

4.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja polifenola

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

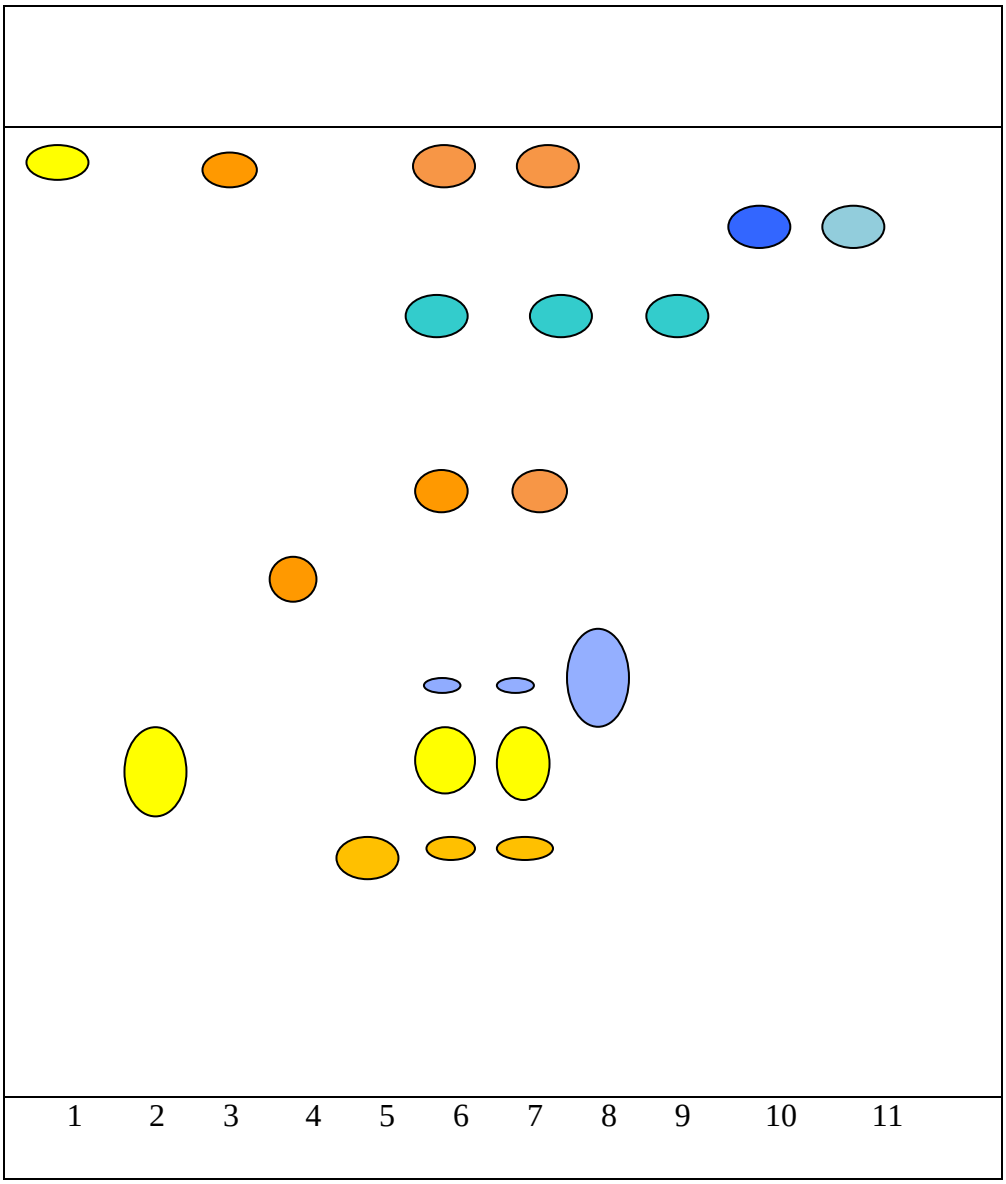
Dodatkom 0,1 M natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt ispitivanog biljnog uzorka, u epruveti je nastalo narančastosmeđe obojenje. Reakcija promjene boje bila je vrlo intenzivna.

4.1.2. Rezultati tankoslojne kromatografije (TLC) flavonoida

Na tanki sloj Kieselgela 60 F_{254} nanesene su standardne otopine flavonoida (naringenina, naringina, kvercetina, izokvercitrina i rutina) te fenolnih kiselina (klorogenska, ružmarinska, ferulična i kavena), kao i metanolni ekstrakt droge. Analiza se provodila uz dva različita razvijača: etil acetat - mravlja kiselina - ledena octena kiselina - voda (100:11:11:27, V/V) i etil acetat - mravlja kiselina - voda (8:1:1, V/V). Detekcija je provedena prskanjem s NST/PEG reagensom, nakon čega su kromatogrami vizualizirani pod UV svjetlom na 365 nm.

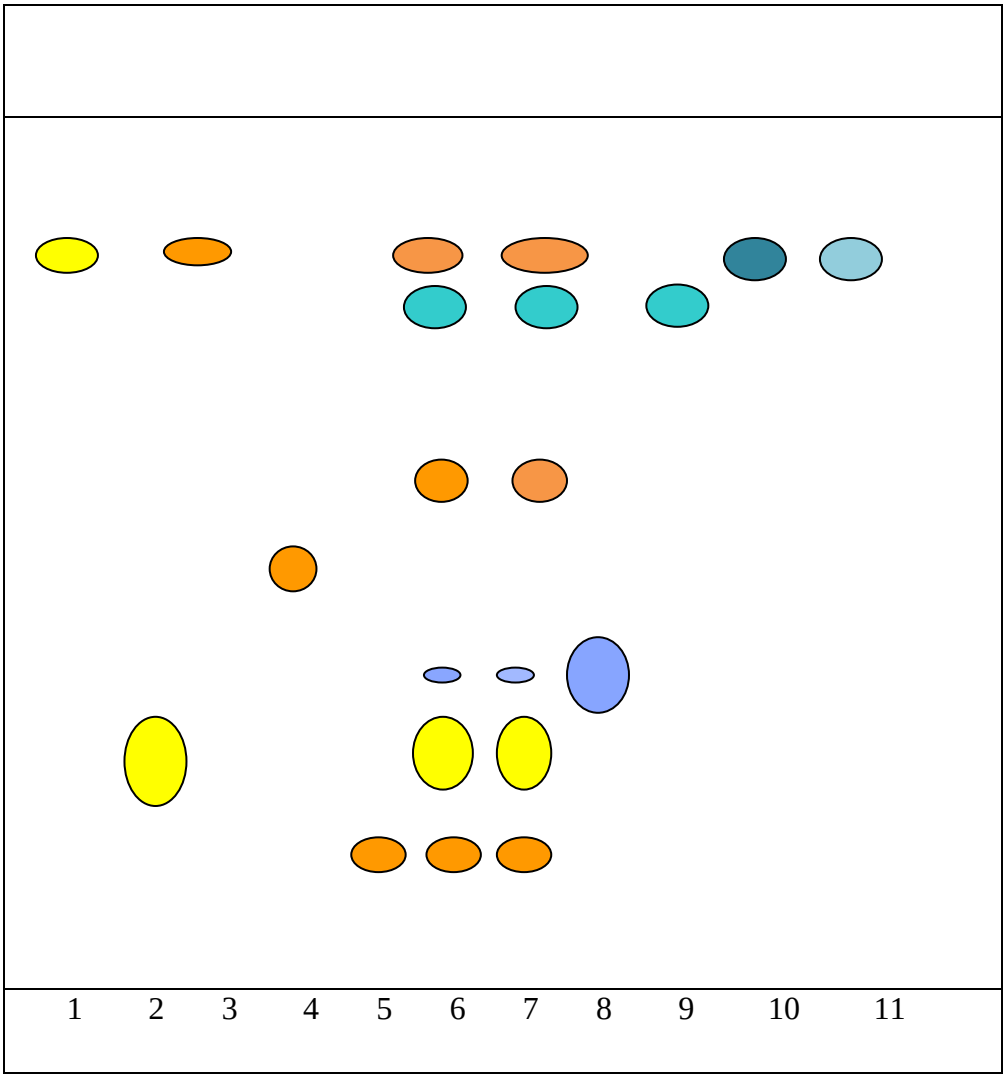
Na kromatogramima su uočene žute i narančaste fluorescirajuće mrlje karakteristične za flavonoide i plavozelene zone fenolnih kiselina. Uzorak, tj. metanolni ekstrakt droge, razdijelio se kromatografijom na 6 različitih zona. Iz dobivenog kromatograma, na temelju R_f vrijednosti i boje razvijene kromatografske zone, može se ustvrditi da metanolni ekstrakt vrste *Micromeria frivaldszkyana* sadrži rutin, naringin, ružmarinsku kiselinu, klorogensku kiselinu i kvercetin.

Od dvaju upotrijebljenih razvijača, bolje je odjeljivanje postignuto s mobilnom fazom u sastavu: etil acetat - mravlja kiselina - voda (8:1:1, V/V).



Slika 11. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i fenolnih kiselina te metanolnog ekstrakta vrste *Micromeria frivaldszkyana* u razvijaču etil acetat - mravlja kiselina - ledena octena kiselina - voda (100:11:11:27, V/V). Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254}; detekcija: NST/PEG i UV-365 nm.

Legenda: 1 – naringenin, 2 – naringin, 3 – kvercetin, 4 – izokvercitrin, 5 – rutin, 6 – metanolni ekstrakt droge, 7 – metanolni ekstrakt droge, 8 – klorogenska kiselina, 9 – ružmarinska kiselina, 10 – ferulična kiselina, 11 – kavena kiselina.



Slika 12. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i fenolnih kiselina te metanolnog ekstrakta vrste *Micromeria frivaldszkyana* u razvijaču etil acetat - mravlja kiselina - voda (8:1:1, V/V). Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254}; detekcija: NST/PEG i UV-365 nm.

Legenda: 1 – naringenin, 2 – naringin, 3 – kvercetin 4 – izokvercitrin, 5 – rutin, 6 – metanolni ekstrakt droge, 7 – metanolni ekstrakt droge, 8 – klorogenska kiselina, 9 – ružmarinska kiselina, 10 – ferulična kiselina, 11 – kavena kiselina.

4.2. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

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

4.2.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina

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

Dodatkom 5%-tne otopine željezova (III) klorida u vodeni ekstrakt 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 nastaje 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 umjereno narančastocrveno obojenje.

4.2.1.2. 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 filtar papiru koji je netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.
U ekstraktu vrste *Micromeria frivaldszkyana* nije dokazana prisutnost kondenziranih trjeslovina jer nije nastao talog na filter papiru.

4.2.1.3. 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 vrste *Micromeria frivaldszkyana* dokazana je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju jer se pojavio jasno vidljiv ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria frivaldszkyana* 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 puta je izvršeno mjerenje apsorbancije.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina prikazani su u Tablici 1 i 2.

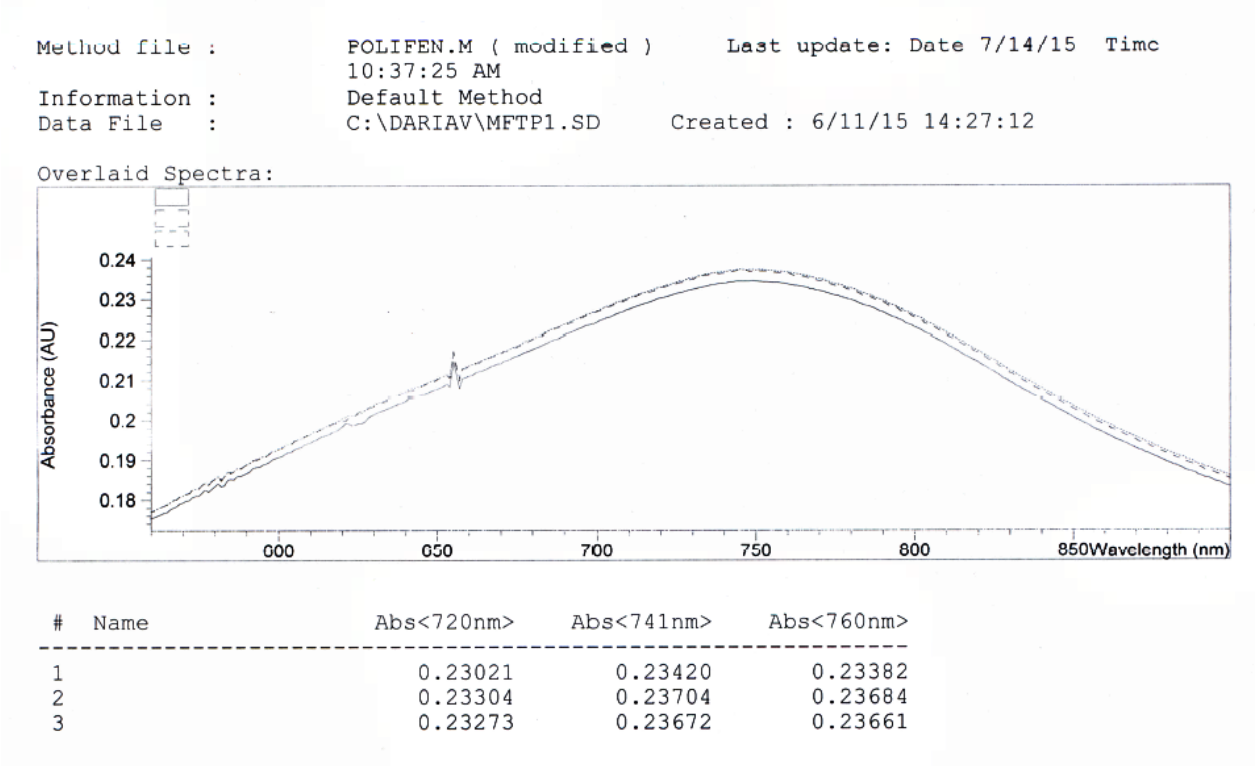
Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

		ukupni polifenoli		sadržaj ukupnih polifenola	
		$A_{720\ nm}$ otopine 1	srednja vrijednost $A_{720\ nm}$ ot. 1 ± SD	%	srednja vrijednost % ± SD
ekstrakt	uzorak 1	0,230	0,232 ± 0,001	9,20	9,28 ± 0,06
		0,233		9,32	
		0,233		9,32	
	uzorak 2	0,234	0,236 ± 0,001	9,36	9,44 ± 0,06
		0,237		9,48	
		0,237		9,48	
	uzorak 3	0,234	0,236 ± 0,001	9,36	9,44 ± 0,06
		0,237		9,48	
		0,237		9,48	

Tablica 2. Sadržaj trjeslovina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

		polifenoli nevezani na kazein		trjeslovine vezane na kazein		sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		$A_{720\ nm}$ otopine 2	srednja vrijednost $A_{720\ nm}$ ot.2 ± SD	A1-A2	srednja vrijednost (A1-A2) ± SD	%	srednja vrijednost % ± SD
ekstrakt	uzorak 1	0,170	0,169 ± 0,001	0,060	0,063 ± 0,002	2,40	2,52 ± 0,09
		0,168		0,065		2,60	
		0,169		0,064		2,56	
	uzorak 2	0,172	0,171 ± 0,001	0,062	0,065 ± 0,002	2,48	2,60 ± 0,09
		0,170		0,067		2,68	
		0,171		0,066		2,64	
	uzorak 3	0,171	0,171 ± 0,001	0,063	0,065 ± 0,002	2,52	2,61 ± 0,07
		0,170		0,067		2,68	
		0,171		0,066		2,64	

Sadržaj ukupnih polifenola iznosio je 9,39±0,06% , a sadržaj trjeslovina 2,58±0,08%.



Slika 13. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida

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

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

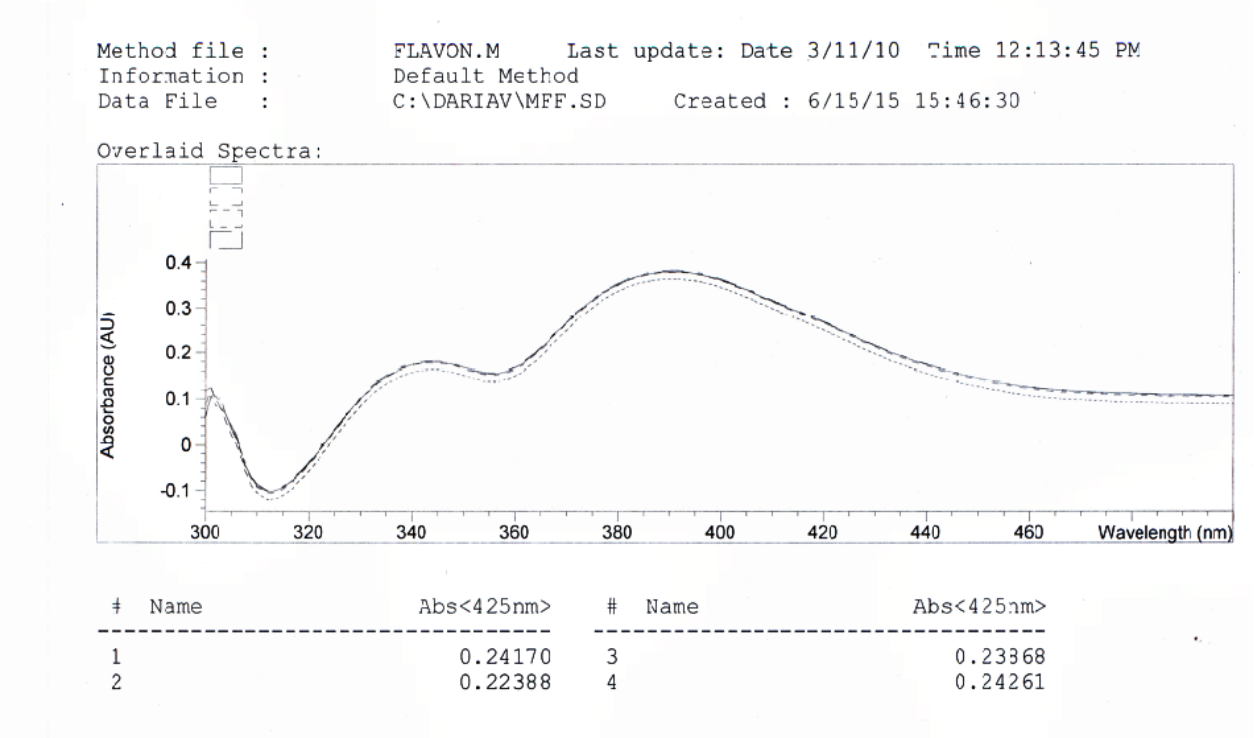
Pripremljen je jedan ekstrakt droge te su pripremljeni uzorci za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Apsorbancija na 425 nm izmjerena je četiri puta.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *M. frivaldszkyana* prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Sadržaj flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

	Masa uzorka (g)		$A_{425\ nm}$	Srednja vrijednost $A_{425\ nm}$ ± SD	% flavonoida	Srednja vrijednost % flavonoida ± SD
ekstrakt	0,2005	uzorak 1	0,242	0,237 ± 0,000	0,93	0,91 ± 0,00
			0,224		0,86	
			0,239		0,92	
			0,243		0,94	

Sadržaj flavonoida vrste *M. frivaldszkyana* iznosio je 0,91%.



Slika 14. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

4.5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *Micromeria frivaldszkyana* 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).

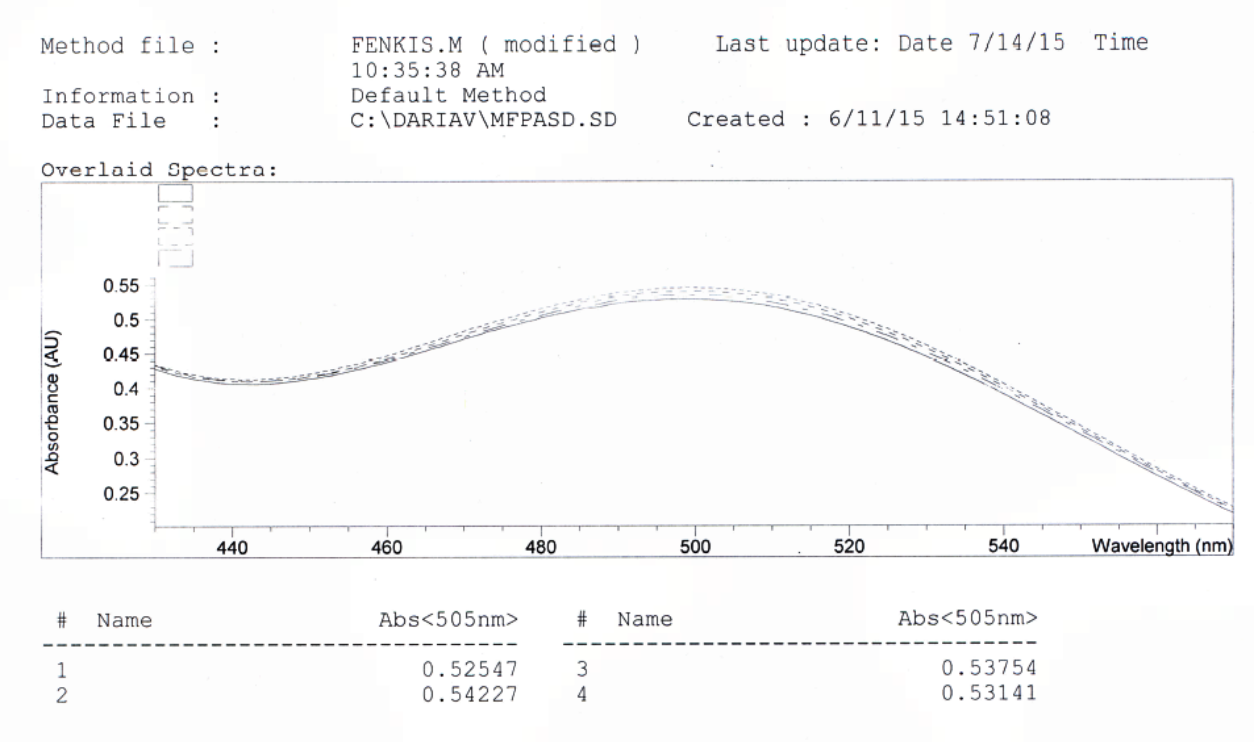
Jedanput je pripravljena ekstrakcija biljne droge te je uzet uzorak za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina, a apsorbancija na 505 nm mjerena je četiri puta.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina vrste *Micromeria frivaldszkyana* prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

	Masa uzorka (g)		A_{505nm} otopine	Srednja vrijednost A_{505nm} ± SD	% fenolnih kiselina (FK)	Srednja vrijednost % FK ± SD
ekstrakt	0,2010	uzorak	0,525	0,534 ± 0,007	6,53	6,65 ± 0,08
			0,542		6,74	
			0,538		6,71	
			0,531		6,60	

Sadržaj fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *M. frivaldszkyana* iznosio je 6,65±0,08%.



Slika 15. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel., koja je uključivala kvalitativnu i kvantitativnu analizu ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina.

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

Kvalitativna analiza trjeslovina provedena je općim reakcijama taloženja i promjene boje. Kondenzirane trjeslovine nisu dokazane jer se nije pojavio talog na filtar papiru. Trjeslovine koje hidroliziraju su dokazane pojavom ljubičastog prstena na mjestu prikladnog pH.

Primjenom metode tankoslojne kromatografije uočena je prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *M. frivaldszkyana*. U metanolnom ekstraktu droge dokazani su: rutin, naringin, kvercetin, ružmarinska i klorogenska kiselina.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovinama u ekstraktu vrste *M. frivaldszkyana* određena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima iznosio je 9,39±0,06%, a udio trjeslovina je bio 2,58±0,08%.

Kvantitativna analiza flavonoida vrste *M. frivaldszkyana* provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+}, a sadržaj flavonoida u nadzemnim biljnim dijelovima je iznosio 0,91%.

Fenolne su kiseline u uzorku vrste *M. frivaldszkyana* određene spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji s nitrit-molibdat reagensom, a njihov je sadržaj iznosio 6,65±0,08%.

Fitokemijska karakterizacija polifenola koja je provedena u okviru ovoga diplomskog rada predstavlja doprinos znanstvenom istraživanju vrste *Micromeria frivaldszkyana*. Iako je ta biljna vrsta bogata biološki aktivnim tvarima, ne koristi se u pučkoj medicini, niti kao prirodna sirovina. Razlog tome je ograničeno područje rasprostranjenosti, kao i nepristupačno nalazište istraživane biljne vrste.

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. Anchev, M. Micromeria Benth. U: Fl. Reipubl. Popularis Bulgaricae, Vol. 9. Velčev V, urednik, 1989, str. 356-362.
3. Anić M. Dendrologija, interni priručnik. Zagreb, 1946, str. 570-572.
4. Bauer KH, Fromming KH, Fuhrer C. Pharmazeutische Technologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1986, str. 588.
5. Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.
6. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev,* 1998, 56, 317-333.
7. Bräuchler C, Ryding O, Heubl G. The genus *Micromeria* Lamiaceae, a sinoptical update. *Willdenowia*, 2008, 38, 363-410.
8. Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baeumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr,* 2011, 30, 490-493.
9. 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, 33.
10. Chater AO, Guinea E. Micromeria Bentham. U: Flora Europaea, Vol. 3. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, urednici, Cambridge University Press, Cambridge, 1972, str. 167-170.
11. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen des Gehaltes an Flavanol-derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.

12. 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.

13. 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.

14. Erhardt W, Götz E, Bödeker N, Seybold S. Zander-Handwörterbuch der Pflanzennamen. 17. Aufl. Stuttgart, Eugen Ulmer GmbH und Co., 2002, str. 154.

15. Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 587-589.

16. 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.

17. Geissman TA. The chemistry of flavonoid compounds. Oxford-London-New York-Paris, Pergamon Press, 1962, str. 72.

18. Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, str. 159-160.

19. Gülcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, 207, 213-220.

20. Hagerman AE. The tannin handbook: Biological activity of tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.

21. Hagerman AE. The tannin handbook: Condensed tannin structural chemistry. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002a.

22. Harborne JB. Biochemistry of phenolic compounds. London-New York, Academic Press, 1964, str. 57-62, 83, 136, 149.

23. Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep*, 1994, 11, 41-66.

24. Herman J. Šumarska dendrologija. Zagreb, Stanbiro, 1971, str. 429.

25. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer*, 2010, 61, 1-20.

26. Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyauma AH, Yamasaki H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int J Mol Med*, 2011, 28, 595-598.

27. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on dumical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine*, 2004, 11, 424-430.

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

29. Kalođera Z. Farmakognozija II. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.

30. Kalođera Z., Vladimir S. *Micromeria* vrste u flori Hrvatske. *Farm Glas*, 1992, 48, 203-214.

31. Karuza-Stojaković Lj. Analitika flavonoidnih spojeva u biljci *Mentha piperita* L. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1991.

32. 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.

33. Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb, Poljoprivredni nakladni zavod, 1956, str. 440-442.

34. Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*, 2008, 7, 301-311.

35. 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, 323, 373-381.

36. Mägdefrau K, Ehrendorfer F. Udžbenik botanike za visoke škole: sistematika, evolucija i geobotanika. Zagreb, Školska knjiga, 1997, str. 366-367.

37. Maleš Ž. Izolacija i identifikacija flavonoida drače – *Paliurus spina-christi* Mill. Magistarski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1990, str. 49.

38. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr,* 2004, 79, 727-747.

39. Miller AL. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1996, 1, 103-111.

40. Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. *Biochem Syst Ecol*, 1993, 21, 833-846.

41. 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.

42. 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.

43. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflamatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 2004, 25, 549-557.

44. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.

45. Petrik J. Polifenoli – antioksidansi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.

46. 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.

47. 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.

48. Rangari VD. Pharmacognosy: Tannin containing drugs. J.L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.

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

50. 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.

51. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agr Food Chem*, 2003, 51, 2866-2887.

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

53. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19, 481-486.

54. 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.

55. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.

56. Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Arch Pharm*, 1976, 309, 38-44.

57. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*. 2009, 53, 310-329.

58. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Bio Med*, 2002, 32, 314-318.

59. 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.

60. 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.

61. 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. 129-134.

62. Vasilj Đ. Biometrika i eksperimentiranje u bilinogojstvu. Zagreb, Hrvatsko agronomsko društvo, 2000.

63. Vladimir S. Izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva timijanolisnog vrisića – *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. Magistarski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1993, str. 8, 20-30.

64. Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.

65. Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem*, 1997, 60, 73-77.

66. 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.

67. Wagner H. Pharmazentische Biologie, Drogen un ihre Inhaltsstoffe, 5. neubearbeittete Auflage. Stuttgart-New York, Gustav Fischer Verlag, 1993, str. 39, 147, 244-249, 267.

68. 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.

69. Zhang LL, Lin YM. Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 407-415.

7. SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija polifenola bugarske endemske vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. (Lamiaceae). Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Provedbom tankoslojne kromatografije potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina, naringina, te klorogenske i ružmarinske kiseline u metanolnom ekstraktu nadzemnih dijelova ispitivane biljne vrste. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari iznosio je: 9,39±0,06% (UP), 2,58±0,08% (T), 0,91% (F) i 6,65±0,08% (FK). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Micromeria* i bugarskih endema te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrste *Micromeria frivaldszkyana*.

SUMMARY

In this work, phytochemical characterization of polyphenols from Bulgarian endemic species, *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. (Lamiaceae) was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. The thin layer chromatography (TLC) revealed the presence of quercetin, rutin, naringin, chlorogenic acid, and rosmarinic acid in the methanolic extract of the aerial parts of *M. frivaldszkyana*. Quantitative analyses of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) were carried out using the spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds were as follows: 9.39±0.06% (TP), 2.58±0.08% (T), 0.91% (F), and 6.65±0.08% (PA). Performed phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of the genus *Micromeria* and Bulgarian endemic species, and also contributes to the existing knowledge concerning phytotherapeutic potential of *M. frivaldszkyana*.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

FITOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLIFENOLA VRSTE MICROMERIA FRIVALDSZKYANA (DEG.) VEL. (LAMIACEAE)

Daria Vukelić

SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija polifenola bugarske endemske vrste *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. (Lamiaceae). Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Provedbom tankoslojne kromatografije potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina, naringina, te klorogenske i ružmarinske kiseline u metanolnom ekstraktu nadzemnih dijelova ispitivane biljne vrste. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari iznosio je: 9,39±0,06% (UP), 2,58±0,08% (T), 0,91% (F) i 6,65±0,08% (FK). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Micromeria* i bugarskih endema te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrste *Micromeria frivaldszkyana*.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 15 grafičkih prikaza, 4 tablice i 69 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Micromeria frivaldszkyana*, polifenoli, trjeslovine, flavonoidi, fenolne kiseline, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija.

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Jadranka Vuković Rodríguez, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Živka Juričić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLS FROM MICROMERIA FRIVALDSZKYANA (DEG.) VEL. (LAMIACEAE)

Daria Vukelić

SUMMARY

In this work, phytochemical characterization of polyphenols from Bulgarian endemic species, *Micromeria frivaldszkyana* (Deg.) Vel. (Lamiaceae) was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. The thin layer chromatography (TLC) revealed the presence of quercetin, rutin, naringin, chlorogenic acid, and rosmarinic acid in the methanolic extract of the aerial parts of *M. frivaldszkyana*. Quantitative analyses of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) were carried out using the spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds were as follows: 9.39±0.06% (TP), 2.58±0.08% (T), 0.91% (F), and 6.65±0.08% (PA). Performed phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of the genus *Micromeria* and Bulgarian endemic species, and also contributes to the existing knowledge concerning phytotherapeutic potential of *M. frivaldszkyana*.

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

Thesis includes: 47 pages, 15 figures, 4 tables, and 69 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Micromeria frivaldszkyana*, total polyphenols, tannins, flavonoids, phenolic acids, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry.

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

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jadranka Vuković Rodríguez, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.