

**Petra Kovačić**

**Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog  
učinka u vrstama *Iris adriatica* Trinajstić ex  
Mitić i *Iris croatica* Horvat et M. D. Horvat**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

*Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Željenu Malešu na savjetima i stručnom vodstvu pri izradi diplomskog rada. Također, veliko hvala asistentu Ivanu Duki, mag. pharm, na pruženoj pomoći i strpljenju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, kao i na svim savjetima i pomoći tijekom pisanja istog.*

*Hvala mojim divnim budućim farmaceutima, posebice Danijeli, Loreni, Luciji, Ani i Nini, za nezaboravno i najljepše životno razdoblje, kao i ostalim kolegama koji su bili njegovim dijelom.*

*Hvala Ivani, Gabrijeli i Zvonimiru na pravom prijateljstvu i potpori koju su mi davali tijekom cijelog studija, iako su nas dijelile stotine kilometara.*

*I na kraju, najveće hvala Mami i Tati, Anti, Katarini i Ivanu na bezuvjetnoj ljubavi i strpljenju koje su mi pružali svih ovih godina i koji su vjerovali u mene onda kada ni sama nisam.*

## Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Botanički podaci.....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1.1. Obilježja porodice Iridaceae.....   | 2         |
| 1.1.2. Rod <i>Iris</i> L.....  | 3         |
| 1.1.2.1. Povijesni značaj i osnovna botanička obilježja.....                       | 3         |
| 1.1.2.2. Obilježja endemske vrste <i>Iris adriatica</i> Trinajstić ex Mitić.....   | 4         |
| 1.1.2.3. Obilježja endemske vrste <i>Iris croatica</i> Horvat et M. D. Horvat..... | 5         |
| <b>1.2. Sekundarni metaboliti biljaka.....</b>                                     | <b>7</b>  |
| 1.2.1. Fenolni spojevi.....  | 8         |
| 1.2.1.1. Flavonoidi.....   | 11        |
| <b>1.3. Kemijski sastav vrsta roda <i>Iris</i>.....</b>                            | <b>16</b> |
| 1.3.1. Fenolni spojevi.....  | 16        |
| 1.3.2. Terpeni i ostale sastavnice.....  | 18        |
| <b>1.4. Tradicionalna i suvremena primjena vrsta roda <i>Iris</i>.....</b>         | <b>19</b> |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.1. Materijali.....</b>  | <b>22</b> |
| 3.1.1. Biljni materijal.....   | 22        |
| 3.1.2. Kemikalije.....   | 23        |
| 3.1.3. Uređaji.....  | 24        |
| <b>3.2. Ekstrakcija biljnog materijala.....</b>                                    | <b>25</b> |
| <b>3.3. Tankoslojna kromatografija.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>3.4. Metode.....</b>  | <b>27</b> |
| 3.4.1. Određivanje sadržaja flavonoida.....  | 27        |
| 3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....                                    | 29        |
| 3.4.3. Određivanje antioksidativnog učinka.....                                    | 31        |
| 3.4.4. Statistička obrada podataka.....  | 34        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.1. Tankoslojna kromatografija flavonoida.....</b>                             | <b>35</b> |

|  |    |
|--|----|
| 4.2. Određivanje sadržaja flavonoida.....                                  | 38 |
| 4.3. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....                              | 41 |
| 4.4. Određivanje antioksidativnog učinka (ABTS test) .....                 | 44 |
| 4.5. Korelacija sadržaja flavonoida, fenola i antioksidativnog učinka..... | 47 |
| 5. ZAKLJUČCI.....  | 48 |
| 6. LITERATURA.....   | 49 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY.....  | 54 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION<br>CARD            |    |

## 1. UVOD

Farmaceutska je djelatnost od svojih najranijih početaka usko vezana uz biljke jer su upravo one bile prva ljekovita sredstva s kojima se čovjek susreo. Iako u početku nije poznao njihov kemijski sastav i mehanizam djelovanja, iskustveno pokazano terapijsko djelovanje bilo je dovoljan razlog da se biljke uvrste u svakodnevnu medicinsku praksu. To je rezultiralo bogatom poviješću tradicionalnih medicina diljem svijeta, u čijem su žarištu upravo ljekovite biljke.

Razvoj znanosti doveo je do eksplozije istraživanja biljaka i njihovih kemijskih sastavnica odgovornih za ostvarivanje terapijskog učinka. Iako je posljednjih stotinjak godina farmacija usmjerena na sintetske lijekove, valja napomenuti kako su za sintezu brojnih, danas široko rasprostranjenih lijekova, poslužile upravo tvari izolirane iz biljaka. Unatoč imperativu sintetskih lijekova u modernoj farmaciji, priroda se kao izvor liječenja ponovno uključuje u njezine redove. To je, između ostalog, posljedica uvriježenog ljudskog mentaliteta prema prirodnim izvorima kao sigurnijim oblicima liječenja, prožetog dozom skepticizma prema modernoj farmaciji.

Napredak kemije i biotehnologije posljednjih desetaka godina, omogućio je kvalitetniji i detaljniji uvid u fitokemizam te biološke i farmakološke učinke biljaka, što je dodatno potenciralo interes za ljekovite biljke, kao i opseg njihova istraživanja. Unatoč tome, mnoge biljne vrste i njihov mogući terapijski učinak još su uvijek neistraženi. Među njima su i dvije endemske vrste iz porodice Iridaceae kojima se ovaj rad bavi: *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić i *Iris croatica* Horvat et M. D. Horvat. Biljke iz ove porodice poznate su po visokom udjelu flavonoida i mnogima se od njih pripisuju ljekovita djelovanja što opravdava tradicionalnu medicinsku upotrebu. Dokazana su protuupalna, kemoprotektivna i antioksidativna svojstva, a drugi terapijski učinci ovih vrsta i dalje se aktivno istražuju.

## 1.1. BOTANIČKI PODACI

### 1.1.1. Obilježja porodice Iridaceae

Porodica Iridaceae obuhvaća 92 biljna roda te oko 1800 vrsta, većinom zeljastih višegodišnjica čija se staništa nalaze u gotovo svim dijelovima svijeta (Slika 1.), osim u hladnim i sjevernim euroazijskim područjima. Rastu na otvorenim prostorima, rijetko u šumama, a zbog raznolikosti boja i oblika cvjetova vrlo su česti ukrasi u vrtovima (Glavaš, 2019; Nikolić, 2013).

Radi se o jednosupnicama s mesnatim podzemnim stabljikama koje mogu biti podanci, gomolji ili lukovice. Na podzemne se organe okomito nastavljaju izmjenični, plosnati, cjeloviti i jednostavni listovi paralelne nervature, oštih rubova i prepoznatljiva sabljasta izgleda. Mogu biti vazdazeleni, ali najčešće sezonski otpadaju. Cvjetovi su dvospolni, pojedinačni ili skupljeni u vršne cvatove (paštitač, metlica, gronja, štit). Ocvijeće je sintepalno (3+3), a zbog intenzivnih je boja i mirisa vrlo privlačno kukcima koji ga oprašuju. Plod je mnogosjemeni tobolac čije se sjemenke rasprostranjuju vjetrom, vodenim tokovima, životinjama i čovjekom (Glavaš, 2019; Nikolić, 2013; Rasool, 2013).

Hrvatsku floru obogaćuju biljne vrste iz 5 različitih rodova, a najznačajniji su *Iris* L., *Crocus* L. i *Gladiolus* L. (Glavaš, 2019).



Slika 1. Rasprostranjenost porodice Iridaceae (Nikolić, 2013)

## 1.1.2. Rod *Iris* L.

### 1.1.2.1. Povijesni značaj i osnovna botanička obilježja

Vrste roda *Iris* L., hrvatskog naziva perunike, odavno su kako zbog ljepote, tako i zbog aromatskih i ljekovitih svojstava postale predmetom ljudskog zanimanja. Tomu ne svjedoči samo etimologija roda *Iris* (grč. duga), već i spomen ovih vrsta u znamenitom djelu *De materia medica* velikog grčkog liječnika Dioskorida, koje je do 16. stoljeća bilo najvažniji izvor znanja o ljekovitim biljkama (Nikolić, 2013; [www.matica.hr](http://www.matica.hr)). Nadalje, u egipatskoj, indijskoj i japanskoj kulturi perunike su smatrane simbolima kraljevske moći i božanske zaštite, a svojom su ljepotom nadahnule i neke od najvećih umjetnika svih vremena kao što su Vincent van Gogh, Leonardo da Vinci te Lord Byron (Austin, 2005; [www.matica.hr](http://www.matica.hr)). Njihovo se simboličko značenje zadržalo i danas pa se ove vrste poklonjene kao dar smatraju simbolima vjernosti, hrabrosti i mudrosti.

Danas rod *Iris* broji tristotinjak biljnih vrsta, uz još mnogo postojećih podvrsta i varijeteta ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)). Kod većine se uočava podanak, koji služi kao spremište iz kojeg se crpe hranjive tvari tijekom mirovanja i ekstremnih razdoblja. Iz podzemnih se stabljika pružaju tanki jednogodišnji korjenčići, a sa suprotne se strane nastavlja nadzemna stabljika čija je visina od 5 cm do više od jednog metra, što je kriterij za razlikovanje patuljastih od visokih perunika (Austin, 2005). Listovi izlaze iz podanka, nemaju peteljku, uspravni su i sabljasta oblika. Cvjetovi su pojedinačni ili u rahlom cvatu, a perigon čini 6 obojenih listova (3+3), pri čemu su vanjski najčešće savinuti prema van i nadolje, a unutarnji prema unutrašnjosti cvijeta. Prisutnost, odnosno odustnost višestaničnih dlačica, tzv. „brade“, na vanjskim listićima perigona, svrstava perunike u dvije velike skupine; Pogon irisi ili bradate perunike, odnosno Apogon irisi tj. perunike bez brade ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)). Brada je evolucijska prilagodba oprašivanju kukcima, a služi im i kao pristanište za sisanje nektara. Vrat tučka podijeljen je na tri režnja koji izgledom i bojom podsjećaju na listiće perigona, što dodatno povećava vizualnu atraktivnost cvijeta, a uz svaki je režanj smješten po jedan prašnik (Nikolić, 2013). Iz oplodene gamete razvija se tobolac s kuglastim, kruškastim ili spljoštenim sjemenkama crvenkastosmeđe do tamnosmeđe boje. Hrvatska se flora može pohvaliti s 15 perunika koje ukrašavaju jadransku obalu, otoke, brdske i planinske livade te šume i pašnjake diljem Hrvatske, a 5 ih je endemskih ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)).

### 1.1.2.2. Obilježja endemske vrste *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić

Vrsta *Iris adriatica*, odnosno jadranska perunika (Slika 2.), jedina je strogoendemična samonikla perunika na našim prostorima. Riječ je o bradatoj i patuljastoj vrsti s izrazito niskom nadzemnom stabljikom (do 5 cm) koja tijekom travnja i svibnja nosi krupni, pojedinačni i sjedeći cvijet jednostavnog ocvijeća žute ili ljubičastomodre boje (Alperth i sur., 2019; Nikolić, 2015). Pricvjetni listovi su tanki i kožičasta ruba, a tri vanjska lista ocvijeća imaju žućkastobjelkastu „bradu“ koja se spušta do ždrijela cvijeta. Plodnica je trogradna, kao i kod ostalih vrsta roda *Iris* te je podrasla, a nakon oplodnje razvije se mnogosjemeni tobolac sa smeđim sjemenkama. Osim spolnim putem, perunike se razmnožavaju i vegetativno, podancima. Listovi su srpastog oblika, dužine do 8 cm te prezimljuju (Nikolić, 2015).



**Slika 2.** Vrsta *I. adriatica* (<http://wiki.irises.org/Spec/SpecAdriatica>)

Jadranska perunika može se naći na mediteranskim i submediteranskim tipovima kamenjarskih pašnjaka u srednjoj Dalmaciji (okolica Zadra, Šibenika, Drniša i Unešića) te na otocima (Čiovu, Braču, Viru i Kornatima) ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)). Zbog zarastanja takvih staništa drvenastim vrstama, uvrštena je u Crvenu knjigu vaskularne flore Hrvatske u kategoriju NT koja označava gotovo ugrožene biljke (Nikolić, 2015).



### 1.1.2.3. Obilježja endemske vrste *Iris croatica* Horvat et M. D. Horvat

Hrvatska perunika, odnosno vrsta *Iris croatica* (Slika 3.), od 2000. godine nosi titulu hrvatskog nacionalnog cvijeta ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)). Staništa ove endemske vrste prevladavaju uglavnom u zapadnom, kontinentalnom dijelu Hrvatske (Strahinščica, Medvednica, Cesargradska gora, Samoborsko gorje i Gorski kotar) (Slika 4.), a većinom su to šumske čistine, rubovi šuma hrasta medunca te šume običnog i crnog bora. Može se, iako rijetko, naći i na kamenitim podlogama, a na takvim se različitim vrstama staništa zamjećuje i promjena fenotipskih svojstava, kao što je npr. visina biljke (Nikolić, 2015).



**Slika 3.** Vrsta *I. croatica* (foto: Ivan Duka)

Riječ je o zeljastoj trajnici koja se ubraja u visoke samonikle perunike s nadzemnom stabljikom visine od 26 do 70 cm. Tu dužinu prate i unifacijalni, sabljasti listovi koji izlaze iz snažnog podanka. Nadzemna je stabljika razgranjena i završava dvama cvjetovima modroljubičaste boje, dok svaki ogranak može nositi po jedan ili dva takva cvijeta. Cvate od travnja do svibnja. Ocvijeće je jednostavno, vanjski listovi samo su ponekad tamniji od unutarnjih, a pri dnu nose "bradu" sa žućkastim dlakama. Unutarnji listovi su ovalno-lopatasti, ponekad s urezom na vrhu, a u cvijetu se naglo sužavaju u žljebasti držak s pojedinačnim dlakama s unutrašnje strane. Tučak je podijeljen na tri nazubljena režnja sa zaokruženom njuškom. Plodnica je trogradna te nakon oplodnje stvara trobridni tobolac smeđe boje (Nikolić, 2015). Zbog dekorativnih obilježja, kao i vrlo lakog vegetativnog razmnožavanja podancima, hrvatska je perunika osim na prirodnim staništima, često viđena u vrtovima i parkovima kontinentalne Hrvatske ([www.matica.hr](http://www.matica.hr)).



**Slika 4.** Rasprostranjenost vrste *I. croatica* u Hrvatskoj (<http://hirc.botanic.hr/fcd>)

## 1.2. SEKUNDARNI METABOLITI BILJAKA

Sve biljke u svojim stanicama, tkivima i organima svakodnevno proizvode veliki broj kemijskih spojeva među kojima se razlikuju primarni i sekundarni metaboliti. Primarni metaboliti obuhvaćaju različite šećere, masne kiseline, aminokiseline i nukleinske kiseline te ostale u biljkama sveprisutne metabolite, neophodne za anaboličke i kataboličke procese koji im omogućavaju osnovne životne funkcije; rast, razvoj, disanje i razmnožavanje. S druge strane, sekundarni metabolizam obuhvaća spojeve prisutne u posebnim stanicama koji nisu ključni za bazični metabolizam, već su prvenstveno zaduženi za prilagodbu biljke na okolišne čimbenike, obranu od štetnih nametnika (mikroorganizmi, biljke, kukci, životinje) i abiotičkog stresa, a važan su i organoleptički alat koji pridonosi oprašivanju i rasprostranjenju biljaka. Strukturno su raznolikiji od primarnih, a prisutnost u biljci ovisi o vrsti, tipu stanice, organu pa čak i razvojnem stadiju. Iako se u nekim vrstama proizvode konstitutivno, produkti sekundarnog metabolizma najčešće se sintetiziraju u odgovoru na okolišne čimbenike, zbog čega taj metabolički put odlikuje izuzetna plastičnost. Posljedično, glavne karakteristike sekundarnih metabolita su raznolikost, česta jedinstvenost za pojedinu vrstu te adaptivna uloga (Watson, 2014; Lattanzio, 2013; Croteau i sur., 2000).

Sekundarni metaboliti posebnom se skupinom biljnih tvari smatraju tek od kraja 19. stoljeća, a pojačano se počinju istraživati zadnjih 50-ak godina, zahvaljujući razvoju novih analitičkih i biokemijskih metoda. Taj je rastući interes, osim novim znanstvenim mogućnostima, uvelike potaknut zanimanjem za moguću iskoristivost takvih spojeva kao boja, polimera, voskova, parfema, herbicida, insekticida, antibiotika i lijekova (Bourgaud i sur., 2001; Croteau i sur., 2000).

Iako su kemijski vrlo kompleksni i raznoliki, sekundarni metaboliti se prema strukturi i biokemijskom podrijetlu mogu podijeliti u 3 velike skupine. To su fenolni spojevi i terpenoidi kao dvije najveće skupine te alkaloidi kao metaboliti koji su u biljnomu svijetu rijetko rasprostranjeni, ali su često specifični za pojedine rodove i vrste što ima kemotaksonomski značaj (Watson, 2014; Bourgaud i sur., 2001). Budući da se tematika ovog rada dotiče upravo fenolnih spojeva, ta će skupina u nastavku biti detaljnije obrađena.

### 1.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi najzastupljenija su skupina sekundarnih metabolita u biljnom svijetu. Čak se 2% ukupnog ugljika proizvedenog fotosintezom utroši upravo na njihovu sintezu (Robards i Antolovich, 1997). Nastaju kao produkti metaboličkih puteva šikiminske kiseline, pentoza fosfata i fenilpropana, a zajednička strukturna karakteristika svih je aromatski prsten koji nosi barem jednu hidroksilnu skupinu. Raspon kemijskih struktura seže od najjednostavnijih fenola, npr. fenolnih kiselina, do kompleksnih polimera kao što su proantocijanidini. Unatoč velikoj raznolikosti, fenolni se spojevi prema tipu skeleta, odnosno broju ugljikovih atoma, mogu podijeliti u nekoliko kategorija. One su navedene u tablici 1. (Watson, 2014; Lattanzio i sur., 2008; Balasundram i sur., 2006).

**Tablica 1.** Kategorije fenolnih spojeva prema osnovnim strukturnim obilježjima

| <b>TIP UGLJIKOVOG SKELETA</b>                                  | <b>KATEGORIJA FENOLNOG SPOJA</b>  |
|--|-----------------------------------|
| <b>C<sub>6</sub></b>   | jednostavni fenoli, benzokinoni   |
| <b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub></b>                             | hidroksibenzojeve kiseline        |
| <b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub></b>                             | acetofenoni, fenilacetati         |
| <b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub></b>                             | hidroksicinamati, fenilpropanoidi |
| <b>C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub></b>                             | naftokinoni                       |
| <b>C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub></b>               | ksantoni                          |
| <b>C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub></b>               | stilbeni, antrakinoni             |
| <b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub></b>               | flavonoidi, izoflavonoidi         |
| <b>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>               | lignani, neolignani               |
| <b>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub></b> | biflavonoidi                      |
| <b>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub></b>               | lignini                           |
| <b>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub></b> | proantocijanidini                 |

U prirodi se većinom nalaze u obliku heterozida, estera i etera na hidroksilnim skupinama te su kao takvi topljivi u većini polarnih organskih otapala, kao i u vodi. U obliku aglikona nalaze se u stijenkama stanica gdje imaju strukturnu ulogu, a mogu biti i u sastavu voskova te na vanjskim površinama biljnih organa. Prisutnost i smještaj pojedinog fenolnog metabolita na razini stanica i tkiva uvelike ovisi o biljnoj vrsti i zadaći koju obavlja, iako je moguć i prijenos metabolita od izvornih do susjednih stanica, kao i do udaljenih tkiva i organa. Fenolni spojevi najčešće su pohranjeni u vakuolama epidermalnih stanica i stanica zapornica te u subepidermalnim stanicama listova i izdanaka (Lattanzio i sur., 2008; Balasundram i sur., 2006).

Osim navedene strukturne uloge, mnoge su druge funkcije u domeni fenolnih spojeva. Jedna od ključnih je ona obrambena, u uvjetima kada zbog različitih okolišnih stresnih čimbenika mogu nastati slobodni radikali i posljedična oksidativna oštećenja. Primjerice, istraživanjima je pokazano da temperatura, kada se spusti ispod određene kritične točke, inducira ekspresiju gena za enzime biosintetskog puta fenolnih spojeva. Isto tako, u okolišu bogatom potencijalno štetnim mikroorganizmima biljke se, između ostalog, brane proizvodnjom antimikrobnih tvari - fitoaleksina iz skupine fenolnih spojeva. Brojni fenolni spojevi toksični su i za druge nametnike poput biljojeda, kukaca ili drugih biljaka, a nastaju ili konstitutivno tijekom rasta i razvoja, ili se sinteza inducira u odgovoru na napad. Jedna od važnih sastavnica obrambene funkcije je i zaštita od štetnog UV zračenja, za što su većinom zaslužni flavonoidi. Osim navedenih zaštitnih funkcija, fenolni spojevi su i signalne molekule uz pomoć kojih se biljke, najčešće putem podzemnih eksudata, sporazumijevaju s drugim organizmima i na taj se način prilagođavaju i preživljavaju u okolišu. Interakcija s drugim biljkama posredovana kemijskim tvarima, također je rezultat određenih signalnih fenola, primjerice kvercetina, juglona, katehola, *p*-hidroksibenzojeve kiseline i drugih. Signalna uloga podrazumijeva i prisutnost fenola kao pigmenta te posljedičnu obojenost cvjetova i plodova, što je vrlo važno u privlačenju oprašivača i rasprostranjivanju plodova (Lattanzio, 2013; Lattanzio i sur., 2008).

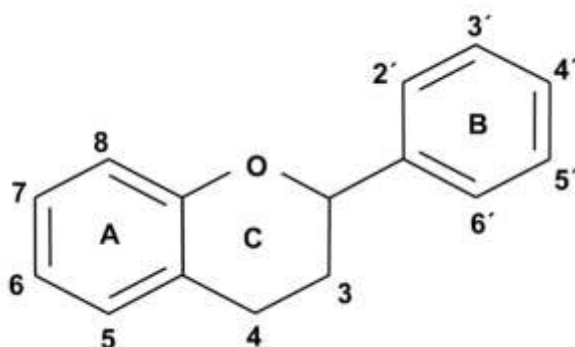
U današnje vrijeme, interes za istraživanjem fenolnih spojeva i njihovih učinaka sve je veći. Pripisuje im se protuupalno, kardioprotektivno, vazodilatatorno, antialergeno, antiaterogeno i antitrombotsko djelovanje. U pozadini većine povoljnih fizioloških učinaka fenolnih spojeva upravo je njihov visoki antioksidativni potencijal zbog direktne neutralizacije slobodnih radikala pa se unosom hrane bogate takvim spojevima može postići zaštita od oksidativnih oštećenja i sprječavanje bolesti potaknutih tim procesima (Balasundram i sur., 2006). Pokazano je i inhibitorno djelovanje nekih fenola na specifične enzime i stanične receptore važne u procesima stvaranja slobodnih radikala što dodatno potvrđuje ulogu fenolnih spojeva kao važnih antioksidansa i pridonosi povoljnom djelovanju na ljudsko zdravlje (Lattanzio i sur., 2008; Balasundram i sur., 2006; Pietta, 2000).

### 1.2.1.1. Flavonoidi

Najbrojnija skupina fenolnih spojeva, ubikvitarna u biljnom svijetu, jesu flavonoidi. Mogu se naći u svim dijelovima biljke, ali najviše ih je u fotosintetski aktivnim stanicama. Posljedično, flavonoidi su neizbježne i vrlo zastupljene sastavnice ljekovitih biljaka i namirnica biljnog podrijetla, većinom voća, povrća, sjemenki, čajeva i crnog vina te im je tim putem čovjek stalno izložen. No, iako se već stoljećima takva prehrana povezuje s povoljnim utjecajima na ljudsko zdravlje, flavonoidi se kao bioaktivne tvari otkrivaju tek početkom 20. stoljeća, a do danas ih je, otada, identificirano čak 9000 (Perez-Vizcaino i Fraga, 2018; Wang i sur., 2018; Kumar i Pandey, 2013).

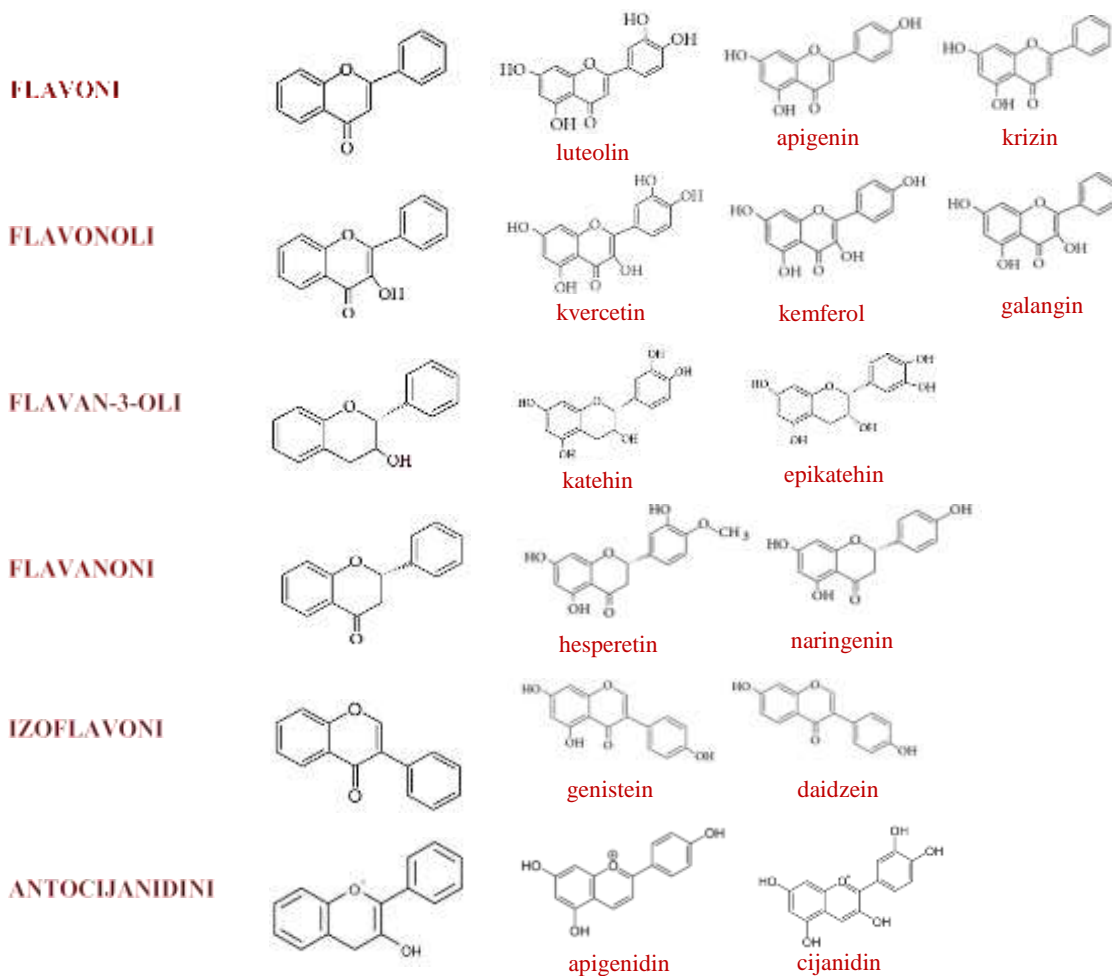
U biljkama su, uz klorofil i karotenoide, zaduženi za žutu, narančastu, crvenu i modru obojenost listova, cvjetova i plodova. Pripisuje im se katalitička uloga u reakcijama svjetla fotosinteze, kao i uloga regulatora ionskih kanala u fosforilaciji. Također su vrlo važne zaštitne komponente biljaka, kako od različitih mikroorganizama i drugih nametnika, tako i od štetnog UV zračenja i ostalih stresora kojima su biljke neprestano izložene (Tanwar 2012; Stalikas, 2007).

Osnovnu strukturu flavonoida (Slika 5.) čini flavanska jezgra s 15 ugljikovih atoma organiziranih u 2 benzenska prstena (A i B) koja su međusobno povezana heterocikličkim piranskim prstenom (C). Hidroksilacija je česta na položajima 3, 5, 7, 2', 3', 4' i 5'. Iako mogu doći u obliku aglikona, u prirodi većinom dolaze kao heterozidi te kao metilni eteri i acetilni esteri hidroksilnih skupina (Kumar i Pandey, 2013).



Slika 5. Osnovna struktura flavonoida (Fraga, 2007)

Na temelju stupnja oksidacije i supstituiranosti piranskog prstena, flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko skupina (Slika 6.). Glavne od njih su flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, flavanoni, izoflavoni i antocijanidini, dok su manje zastupljene skupine dihidroflavonoli i flavan-3,4-dioli. Unutar iste skupine, pojedini se flavonoidi razlikuju po supstituiranosti prstena A i B (Kumar i Pandey, 2013; Crozier i sur., 2006).



**Slika 6.** Glavne skupine, njihove strukturne karakteristike i primjeri pojedinih flavonoida (Kumar i Pandey, 2013)

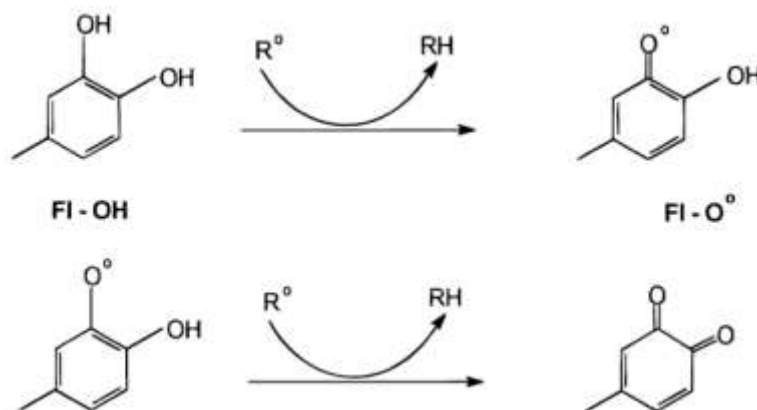


Napretkom znanstvenih i epidemioloških istraživanja zadnjih 30-ak godina, otkriveni su različiti biokemijski mehanizmi i posljedični terapijski učinci koje flavonoidi ostvaruju u ljudskom organizmu (Perez-Vizcaino i Fraga, 2018; Wang i sur., 2018).

Najbolje istraženo svojstvo svih skupina flavonoida je visoki antioksidativni potencijal. Njime se objašnjavaju rezultati brojnih istraživanja koja su pokazala smanjenje rizika kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i demencije proporcionalno unosu određenih flavonoida (Kumar i Pandey, 2013; Fraga, 2007). Biokemijsku podlogu takvih zaključaka opravdava činjenica da narušavanje homeostaze stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala, reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih spojeva (RNS) koji nastaju normalnim staničnim metabolizmom, dovodi do stanja oksidativnog stresa što rezultira oksidacijom lipida, DNK i proteina stanice, a u podlozi je netom navedenih stanja (Ballard i Maróstica, 2019; Kumar i Pandey, 2013).

Antioksidativni kapacitet flavonoida primarno je strukturno uvjetovan te ovisi o broju, konfiguraciji i modifikaciji hidroksilnih skupina, posebice na prstenu B, a ostvaruje se na nekoliko načina:

1. Zaustavljanjem stvaranja slobodnih radikala i ROS/RNS
  - a) inhibicijom enzima koji sudjeluju u sintezi (ksantin oksidaza, NADH oksidaza, katalaza, glutation-S-transferaza)
  - b) keliranjem metala koji promoviraju njihov nastanak ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{+}$ )
2. Direktnom neutralizacijom slobodnih radikala ( $\text{R}^{\circ}$ ) doniranjem elektrona vodika hidroksilne skupine pri čemu nastaje stabilni flavonoidni radikal ( $\text{Fl} - \text{O}^{\circ}$ ) (Slika 7.)
3. Međudjelovanjem s drugim antioksidansima (glutacion,  $\alpha$ -tokoferol)



**Slika 7.** Uklanjanje slobodnih radikala ( $\text{R}^{\circ}$ ) flavonoidima ( $\text{Fl-OH}$ ) (Pietta, 2000)

Najpotentniji antioksidativni učinak imaju kvercetin, mircetin, rutin, epigalokatehin i njihovi derivati (Kumar i Pandey, 2013; Saxena i sur., 2012; Pietta, 2000).

Nadalje, neki flavonoidi među kojima se posebno ističu kvercetin, hesperidin, apigenin i luteolin, imaju mogućnost inhibicije proupalnih kemijskih posrednika (medijatora) i enzima čime mogu pridonijeti jačanju imunološkog sustava te borbi i sprječavanju različitih patoloških stanja (Tungmunnithum i sur., 2019). Jedan od glavnih mehanizama kojima to ostvaruju je sprječavanje nastanka proupalnih citokina iz arahidonske kiseline inhibicijom enzima ciklooksigenaze i lipooksigenaze. Važnu ulogu ima inhibicija tirozin i serin-treonin kinaza, enzima ključnih za prijenos signala i aktivaciju upalnih stanica, a protuupalnom učinku pridonose i mogućnost inhibicije inducibilne NO sintaze u makrofagima te inhibicija degranulacije mastocita i neutrofila (Tanwar i Modgil, 2012; Nijveldt i sur., 2001). Konkretni klinički učinci antioksidativnih i protuupalnih svojstava flavonoida očituju se u antiaterogenom, antitrombotskom, vazoprotektivnom, hepatoprotektivnom i antikancerogenom djelovanju (Ballard i Maróstica, 2019; Tanwar i Modgil, 2012). Na tržištu postoji i biljni lijek na bazi flavonoida hesperidina i diosmina indiciran u odraslih za liječenje znakova kronične venske insuficijencije donjih ekstremiteta i akutne hemoroidalne bolesti ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)). Također se pokazalo kako flavonoidi povoljno utječu na sekreciju inzulina i proliferaciju  $\beta$ -stanica gušterače što ih čini potencijalnim terapijskim rješenjima u liječenju dijabetesa tipa 2 (Ballard i Maróstica, 2019). Budući da flavonoidi u biljkama imaju i obrambenu funkciju, ne čudi činjenica da posjeduju i antimikrobnu aktivnost protiv širokog spektra bakterija, virusa i gljivica. Antibakterijsko djelovanje značajno je za apigenin, galangin, flavonske i flavononske heterozide, izoflavone, katehine i kalkone, dok su antivirusno djelovanje pokazali kvercetin, morin, rutin, apigenin, katehin i hesperidin (Kumar i Pandey, 2013). U posljednje se vrijeme, prvenstveno potaknut sve većom rezistencijom bakterija na postojeće antibiotike, povećao broj istraživanja kojima se upravo flavonoidi ispituju kao potencijalni antimikrobni lijekovi (Crişan i Cantor, 2016).

Prema strukturnim, biokemijskim i farmakološkom karakteristikama, od ostalih se skupina flavonoida izdvajaju izoflavonoidi. Neki od njih poznati su kao fitoestrogeni. To mogu zahvaliti strukturi s fenilnim supstituentom vezanim na položaju 3 benzopiranske jezgre zbog čega nalikuju 17- $\beta$ -estradiolu i posljedično djeluju na estrogenske receptore, ili kao agonisti, ili u velikim koncentracijama kao antagonisti. Mogu doći u aglikonskom obliku, a takvi su genistein, daidzein, glicitein, biokanin A i formononetin, ili vezani za šećere. Uz estrogeno djelovanje, imaju i antimikrobna i kemoprotektivna svojstva te se mogu primjenjivati kao alternativna terapija raznih hormonalnih poremećaja, pojedinih tipova karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze i simptoma menopauze. Unatoč dokazanim povoljnim utjecajima na ljudsko zdravlje, zbog fitoestrogenog djelovanja dio znanstvenika svrstava izoflavone u endokrine disruptore koji u organizmu mogu imati štetne učinke. Zabrinutost se prvenstveno tiče tumora dojke ovisnog o estrogenu, čiji je nastanak i razvoj upravo ovisan o signalima koje dobiva preko estrogenskih receptora, na koje ovi spojevi i djeluju (Veiga i sur, 2019; Křížová i sur., 2019).

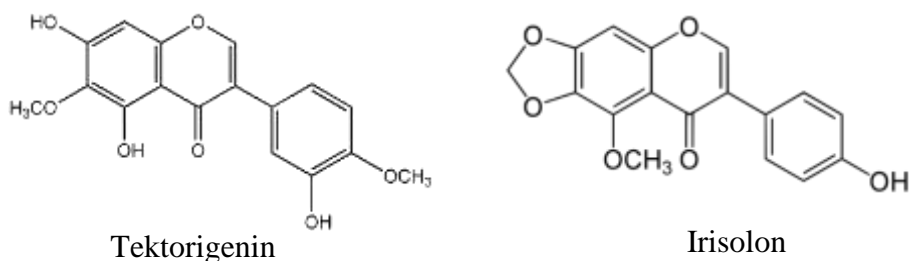
### 1.3. KEMIJSKI SASTAV VRSTA RODA *IRIS*

Vrste roda *Iris* bogat su izvor sekundarnih metabolita što opravdava njihovu višestoljetnu terapijsku upotrebu. Među fenolnim spojevima najzastupljeniji su izoflavoni, flavoni, ksantoni i benzofenoni, a od ostalih se izdvajaju iridali iz skupine terpena (Alperth i sur., 2019; Singab i sur., 2016).

#### 1.3.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi dominantna su skupina sekundarnih metabolita ne samo roda *Iris*, nego i čitave porodice Iridaceae pa zbog toga imaju i kemotaksonomski značaj. Pojedini se flavonoidi razlikuju prema supstituciji na kisikovom atomu hidroksilne skupine, kao što su hidroksilacija, metoksilacija i metilendioksilacija te po glikozilaciji prstena A i B. Dolaze kao aglikoni ili kao heterozidi (Alperth i sur., 2019; Wang i sur., 2010).

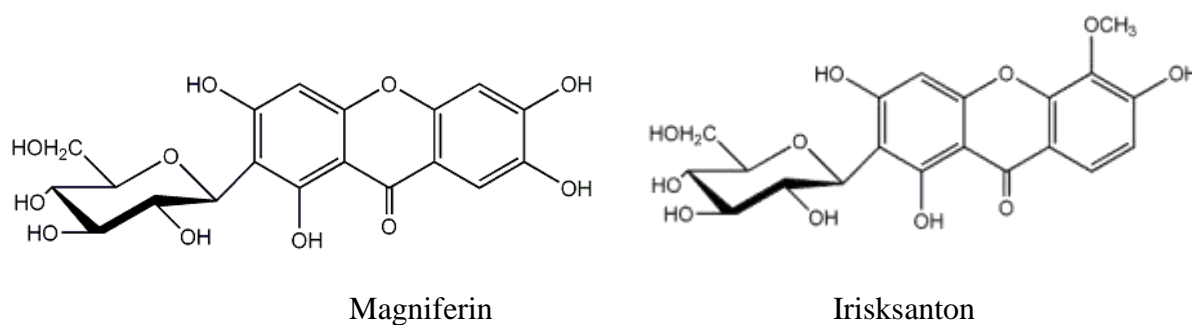
Izoflavoni i njihovi heterozidi najvažnije su sastavnice izolirane iz vrsta roda *Iris*. Uglavnom se nalaze u podanku, a rjeđe u listovima i cvjetovima. Prepoznatljiv strukturni motiv je 6,7-metilendioksi supstitucija, koja nije uobičajena za ostale rodove porodice Iridaceae. Neki od uobičajenih izoflavonoida su tektorigenin (Slika 8.) i njegovi heterozidi, iristektorigenin A i B i njihovi heterozidi, irigenin i njegov glikozid iridin, nigricin, irilon i njihovi glikozidi te irisolon (Slika 8.), čiji heterozidi upravo prevladavaju u vrsti *I. adriatica* (Kukula-Koch i sur., 2015; Wang i sur., 2010). U istoj vrsti pronađeni su O-triheksozidi iristektorigenina A i irisolona, heterozidi koji dosad nisu izolirani iz drugih vrsta (Alperth i sur., 2019).



**Slika 8.** Strukture tektorigenina i irisolona  
(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tectorigenin.svg>,  
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Irisolone.svg>)

Od flavonoida, izuzevši izoflavone, prevladavaju flavoni, uglavnom kao C- ili O- vezani heterozidi, a većinom se nalaze u listovima i cvjetovima. To su npr. izoorientin, svertajaponin, izoviteksin, apigenin-6,8-di-karabinozid i svertisin. Manje su zastupljeni flavanoli i flavanoni (Kukula-Koch i sur., 2015; Wang i sur., 2010).

Nadalje, vrste roda *Iris* bogate su ksantonima. Prevladavaju mangiferin (Slika 9.), njegov 7-O- $\beta$ -D-glukozid neomangiferin, mangiferin-acetat i nigrikanizid, a izolirani su iz podanaka. Imaju kemotaksonomski značaj, a mangiferin pokazuje i antidijabetski učinak. Uz irisksanton (Slika 9.), magniferin je najzastupljeniji ksanton vrste *I. adriatica* (Alperth i sur., 2019; Singab i sur., 2016; Kukula-Koch i sur., 2015).



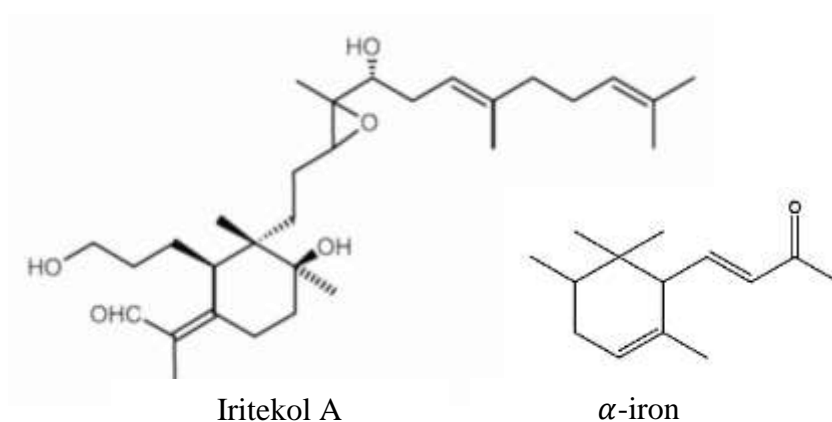
**Slika 9.** Strukture mangiferina i irisksantona

(<https://sh.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Mangiferin.svg>,  
<http://www.knapsackfamily.com/Twins/image.jsp>)

Iz vrsta roda *Iris* izolirani su i neki jednostavni fenoli, primjerice koniferaldehid, acetovanilon i *p*-hidroksiacetofenon te fenolne kiseline, npr. kavena, *p*-kumarinska, ferulična, *p*-hidroksibenzojeva i vanilinska kiselina (Kukula-Koch i sur., 2015).

### 1.3.2. Terpeni i ostale sastavnice

Terpeni čine veliku skupinu sekundarnih metabolita, od kojih se mnogi mogu naći u podancima, korijenju i listovima vrsta roda *Iris*. Među njima, najzastupljeniji su triterpeni iridali koji osim u slobodnom obliku mogu biti esterificirani masnim kiselinama ili glikozilirani. Sastavnice su svježih podanaka. Iritekol A i B (Slika 10.), iridobelamal A, izoiridogermanal,  $\alpha$ - i  $\gamma$ -irigermanal, iridial, iriflorental i iripalidal neki su od zastupljenijih. Pripisuje im se antimalarijsko i antifungalno djelovanje te citotoksično djelovanje na određene vrste tumorskih stanica (Kukula-Koch i sur., 2015). Terpenski spojevi također značajni za ove vrste jesu ironi, primjerice  $\alpha$ -iron (Slika 10.),  $\gamma$ -iron te irizid A. Oni nastaju kao produkti oksidativne razgradnje iridala tijekom skladištenja. Podancima u kojima nastaju daju karakteristični miris nalik na ljubičice što ih čini jednim od najcjenjenijih sirovina parfemske industrije, izrazito visoke cijene (Singab i sur., 2016; Kukula-Koch i sur., 2015). Valja napomenuti i kako su prvi biciklički i monociklički triterpeni uopće otkriveni u prirodi, izolirani upravo iz droge *Iridis rhizoma*; osušenog podanka vrsta *Iris germanica* L., *Iris germanica* L. var. *florentina* Dykes i *Iris pallida* Lamm (Bisset, 2001).



**Slika 10.** Strukture iritekola A i  $\alpha$ -irona (Kukula-Koch i sur., 2015)

Podanak također sadrži ugljikohidrate, masno ulje, organske kiseline, sluzi, trjeslovine (tanine), kao i eterično ulje, dok su listovi izvor askorbinske kiseline i drugih vitamina (Mykhailenko i sur., 2017; Pahlow, 1989).

## 1.4. TRADICIONALNA I SUVREMENA PRIMJENA VRSTA RODA *IRIS*

### Tradicionalna primjena

Upotreba perunika, kako u medicinske, tako i u dekorativne svrhe, ima vrlo dugu povijest. Od antičkih se vremena perunike uzgajaju za dobivanje mirisa i kao ukrasne biljke, a navodi se kako medicinska uporaba seže još u vremena drevnog Egipta, 1500 godina pr. Kr. (Crişan i Cantor, 2016). Mnoge vrste roda *Iris* stoljećima su bile i ostale narodni lijekovi tradicionalnih medicina diljem svijeta. U Europi je bila raširena upotreba uvaraka osušenog i oguljenog podanka kao diuretika, karminativa, sredstva protiv zatvora i abdominalnih bolova. Nadalje, usitnjeni se podanak, zbog sluzi koje sadrži, upotrebljavao kao demulcens i ekspektorans u pripravcima protiv kašlja i u terapiji respiratornog katra te topički, za premazivanje rana i pjega. Raširena je bila upotreba i u stomatologiji gdje je primjenu našao kao sastavnica zubnih pasti, rabio se za zubobolju i za ublažavanje lošeg zadaha, a komadići posebnog oblika droge *Iridis rhizoma pro infantibus*, davali su se maloj djeci za žvakanje kod bolova prilikom izrastanja zubi (Crişan i Cantor, 2016; Rasool, 2013; Wang i sur., 2010; Austin, 2005). Primjena perunika bila je raširena i u drugim dijelovima svijeta. Prvi zapisi o njihovoj medicinskoj uporabi u Kini potječu iz 200-te godine kada se vrsta *Iris tectorum* Maxim. spominje u prvoj kineskoj farmakopeji prirodne medicine, zvanoj “Shen Nong Ben Cao Jing”, a prema posljednjem izdanju te farmakopeje, ista se vrsta indicira kod produktivne grlobolje te za detoksifikacije organizma (Wang i sur. 2010). U Sjevernoj Americi Cherokee indijanci rabili su vrstu *Iris virginiana* L. u obliku paste kao melem za kožne tegobe, dok je ostalo domaće stanovništvo od podanka pravilo čaj za tegobe želuca, bubrega i mjehura (Crişan i Cantor, 2016).

Osim medicinskih, perunikama su se kroz povijest pridavale i različite gospodarske uloge, od kojih su glavne bile iskorištavanje cvjetova za dobivanje boja te aromatičnih svojstava podanaka u proizvodnji alkoholnih pića i parfema, što se uvelike zadržalo i do danas (Crişan i Cantor, 2016).

## Suvremena primjena

Žarište suvremene primjene perunika za sada je na parfemskoj industriji koja koristi cijenjeno eterično ulje njihovih podanaka, ne samo zbog vlastitih aromatičnih svojstava već i zbog sposobnosti pojačavanja drugih mirisnih sastavnica parfemskih proizvoda. Ekstrakti i podanci pojedinih perunika primjenjuju se kao korigensi okusa brojnih jela, slatkiša i alkoholnih pića, a primjenu su također našli u kozmetici i aromaterapiji (Crişan i Cantor, 2016).

U suvremenoj medicinskoj praksi perunike još uvijek nisu uobičajene, unatoč bogatom fitokemijskom sastavu. Istraživanjima je pokazano kako vrste roda *Iris* posjeduju antioksidativno djelovanje, većinom zahvaljujući fenolnim sastavnicama kojima obiluju. Nadalje, antimikrobno je djelovanje pokazano za mnoge vrste roda *Iris*. Jedna od njih je vrsta *I. germanica*, čiji su ekstrakti pokazali baktericidno djelovanje na neke vrlo česte patogene sojeve vrsta *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*. i *S. aureus* (Crişan i Cantor, 2016). Pripisuje im se i protuupalno djelovanje, promovirano prisutnim izoflavonima (Rahman i sur., 2003). Isti spojevi, udruženi s iridalima, zaduženi su i za antimutageno i antikancerogeno djelovanje koje se pripisuje ovim vrstama, a koje se potvrdilo istraživanjima na kulturama stanica. Uočen je i hipolipemijski učinak ekstrakta vrste *I. germanica*, posebice na razinu triglicerida i kolesterola, a istraživanja antidijabetskog učinka pokazala su povoljan utjecaj na apsorpciju glukoze u probavnom traktu, kao i inhibiciju enzima važnih u metabolizmu glukoze, što ukazuje na moguće indikacije za primjenu. Dosadašnjim istraživanjima pokazana je mogućnost buduće iskoristivosti perunika kao lijekova i njihovih izvora, no ipak je potreban još veliki broj dodatnih ispitivanja, pogotovo onih kliničkih, kako bi taj svoj potencijal i ostvarile (Crişan i Cantor, 2016; Rasool, 2013).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U današnje vrijeme, medicinska i farmaceutska praksa suočavaju se sa sve izraženijim pobolima od kroničnih bolesti čiji su nastanak i razvoj potaknuti stresom i posljedičnim oksidativnim oštećenjima. Među njima se ističu kardiovaskularne, neurodegenerativne i maligne bolesti (Hooper i Cassidy, 2006). Drugi veliki izazov suvremene farmacije predstavljaju antibiotici i sve izvjesniji kraj njihove ere, što stavlja veliki upitnik na nova, alternativna terapijska rješenja bakterijskih i drugih infekcija.

Potencijalna rješenja navedenih izazova traže se u biljkama. Razvoj znanosti doveo je do mnoštva novih saznanja iz područja fitokemije pa je danas poznato kako mnoge biljke zahvaljujući fenolnim metabolitima koje proizvode, imaju snažan antioksidativni učinak koji može pridonijeti sprječavanju i terapiji raznih bolesti. Također, ekstrakti mnogih biljaka odavno se upotrebljavaju kao antiseptici pa se zbog toga sve više istražuju i specifični antimikrobni produkti biljaka s mogućnošću terapijske upotrebe.

Od posebnog su interesa vrste koje do sada nisu bile u središtu znanosti, a čiji su biljni srodnici već pokazali učinke povoljne po ljudsko zdravlje. Upravo je to bio motiv istraživanja provedenog u ovome radu, u kojem su tankoslojnom kromatografijom utvrđene kvalitativne razlike, dok je spektrofotometrijskim metodama određen sadržaj flavonoida, ukupnih fenola i njima svojstvenog antioksidativnog učinka, u listovima i podancima dviju, dosad slabo istraženih hrvatskih endemskih vrsta, *I. adriatica* i *I. croatica*.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biljni materijal

Za potrebe eksperimentalnog dijela rada korišteni su očišćeni, na sobnoj temperaturi osušeni i mljevenjem usitnjeni listovi i podanci biljnih vrsta *I. adriatica* i *I. croatica*.

- Vrsta *I. adriatica* skupljena je u svibnju, 2019. godine, u okolici grada Zadra (Slika 11.)



Slika 11. Vrsta *I. adriatica* (www.matica.hr)

- Vrsta *I. croatica* skupljena je tijekom cvatnje, u travnju 2019. godine, na području parka prirode Papuk (Slika 12.)



Slika 12. Vrsta *I. croatica* u Parku prirode Papuk (foto: Ivan Duka)

### 3.1.2. Kemikalije

Za pripremu ekstrakata korištene su sljedeće kemikalije:

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

Za tankoslojnu kromatografiju korišteni su:

- 1%-tna otopina 2-aminoetildifenilborinata u metanolu (Fluka, Švicarska)
- 5%-tna otopina polietilenglikola (PEG) 4000 u etanolu (Fluka, Švicarska)
- etilacetat (Lach-Ner, Češka)
- 98-100%-tna mravlja kiselina (Scharlau, Španjoska)
- 99,8%-tna octena kiselina (J.T.Baker, SAD)
- destilirana voda

Za kvantitativno određivanje flavonoida korištene su sljedeće kemikalije:

- 96%-tni etanol (Lach-Ner, Češka )
- aluminijski klorid heksahidrat (Sigma Aldrich, SAD)
- 95%-tni standard kvercetin (Sigma Aldrich, SAD)
- destilirana voda

Za kvantitativno određivanje ukupnih fenola korištene su sljedeće kemikalije:

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

Za određivanje ukupnog antioksidativnog učinka korištene su sljedeće kemikalije:

- 96%-tni etanol (Lach-Ner, Češka)
- kalijev peroksidisulfat (Kemika, Hrvatska)
- ABTS reagens (diamonijevsulfat, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (Sigma Aldrich, SAD)
- 98%-tni standard galne kiseline (ACROS Organics, Belgija)
- destilirana voda

### 3.1.3. Uređaji

Za određivanje flavonoida i ukupnih fenola te određivanje antioksidativnog učinka korišten je UV/Vis spektrofotometar T70 (PG Instruments Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo) Zavoda za farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska.

Od ostalih uređaja korišteni su još :

- električni mlinac
- precizna vaga, PB303 Delta Range (Mettler Toledo, SAD)
- električna tresilica za epruvete (Heidolph reax top, Heidolph, Njemačka)
- magnetska mješalica s grijanjem (Witeg, Njemačka)

Za tankoslojnu kromatografiju korištene su ploče: silikagel F<sub>256</sub>(Merck), a za vizualizaciju dobivenog kromatograma EPI-Chemi Darkroom (UVP LLC, SAD) Zavoda za farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska.

### 3.2. EKSTRAKCIJA BILJNOG MATERIJALA

U eksperimentalnom dijelu rada, uzorke su činili zasebni ekstrakti podanka i listova svake od ispitivanih vrsta. Pripremljeno je 25 mL svakog ekstrakta, ekstrakcijom uz povratno hladilo.

#### Postupak:

Biljni materijal (list ili podanak) usitni se mlincem do praškaste konzistencije te se 1,25 g dobivenog materijala odvaži na preciznoj vagi. Izvagana se masa prebaci u odmjernu tikvicu ravnog dna od 250,0 mL u koju se doda 25 mL 80%-tnog etanola pripremljenog iz 400 mL 96%-tnog etanola i 100 mL destilirane vode. Tikvica se spoji na hladilo i postavi na magnetsku mješalicu uz istovremeno zagrijavanje (Slika 13.). Ekstrakcija se provodi 45 minuta za listove, odnosno 90 minuta za podanke, a vrijeme se mjeri od trenutka kada sadržaj u tikvici zavrije. Po završetku ekstrakcije, tikvica se odvoji od aparature, ohladi pod mlazom vode te filtrira preko naboranog filtera papira i pamučne vate u odmjernu tikvicu od 25,0 mL. Ostatak u odmjernoj tikvici u kojoj se provodila ekstrakcija ispere se ranije pripremljenim 80%-tnim etanolom te se ponavlja postupak filtriranja, dok se odmjerne tikvice s ekstraktom ne nadopuni do zadanog volumena (25,0 mL). Sadržaj odmjerne tikvice prebaci se u plastične tube od 50 mL koje se zatvore čepom i parafilmom te se čuvaju na ledu.



Slika 13. Ekstrakcija biljnog materijala

### 3.3. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA

#### **Postupak:**

Kao uzorci za kromatografsku analizu koriste se nerazrijeđeni ekstrakti. Nepokretna (stacionarna) faza je silikagel F256, a pokretna (mobilna) faza pripravlja se iz etilacetata, mravlje kiseline, glacijalne kiseline (99,8%-tna octena kiselina) i destilirane vode u omjeru 100: 11: 11: 26 (V:V:V:V) (Wagner i Bladt, 1996).

20 µL uzorka nanosi se na ploču, približno 2 cm od donjeg ruba. Ploča se uroni u pokretnu (mobilnu) fazu koja ne smije biti u doticaju s nanesenim uzorcima, a put mobilne faze može iznositi najviše 8 cm. Nakon završene kromatografije slijedi detekcija. Reagens za vizualizaciju flavonoida je NP/PEG (*engl.* Natural products-polyethyleneglycol). Ploča se prvo šprica metanolnom otopinom 2-aminoetil difenilborinata koji pojačava fluorescenciju, a zatim etanolnom otopinom polietilenglikola (4000) koji pojačava osjetljivost što poboljšava vizualizaciju rezultata. Ploča se gleda pod UV zračenjem od 365 nm, a u tim uvjetima flavonoidi fluoresciraju žuto, zeleno, narančasto ili svijetlo plavo (Wagner i Bladt, 1996).

## 3.4. METODE

### 3.4.1. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj flavonoida u uzorku određen je kolorimetrijskom metodom s aluminijevim kloridom heksahidratom ( $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Arvouet-Grand i sur., 1994).

#### Načelo metode:

Aluminij iz heksahidrata aluminijevog klorida stvara stabilne komplekse u kiselom mediju s C-4 keto skupinom ili C-3 i C-5 hidroksilnom skupinom prisutnih flavona i flavonola, a nestabilne komplekse s ortodihidroksilnim skupinama u A ili B prstenu flavonoida, pri čemu nastaje žuto obojenje koje se spektrofotometrijski određuje kao apsorbancija na 415 nm. Kao standard se koristi otopina kvercetina (Chang i sur., 2002).

#### Postupak:

Izrada reagensa: Pripremljena je 2%-tna etanolna otopina reagensa aluminijevog klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) koncentracije 2g/100 mL. Izvaži se 2 g heksahidrata aluminijevog klorida i otopi u malo etanola te se prebaci u odmjernu tikvicu od 100,0 mL koja se potom nadopuni etanolom do oznake.

Priprema uzoraka za analizu i mjerenje: Ranije pripremljeni ekstrakti (3.2.) maknu se s leda da postignu sobnu temperaturu. Od njih se pripremaju radne otopine u razrjeđenju od 10 puta na način da se u 1 mL ekstrakta doda 9 mL 80%-tne vodenoalkoholne otopine.

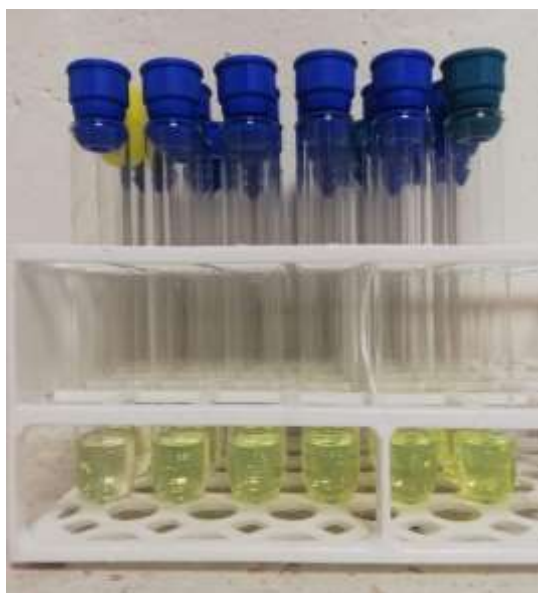
Isti se uzorak mjeri tri puta pod istim uvjetima. Po 1 mL istog uzorka prenese se u 4 epruvete, od čega jedna predstavlja slijepu probu u koju se umjesto reagensa dodaje 1 mL etanola. U preostale 3 epruvete dodaje se 1 mL reagensa (2%-tni  $\text{AlCl}_3$ ) te se nakon 15 minuta inkubacije mjeri apsorbancija na 415 nm, u odnosu na slijepu probu za svaki uzorak.

Izrada standardne otopine kvercetina (K) i pripadajućeg baždarnog pravca: 50 mg kvercetina doda se u odmjernu tikvicu od 50,0 mL i nadopuni etanolom do oznake. 10 mL tako pripremljene otopine, koncentracije 1 mg/mL, razrijedi se etanolom u odmjernoj tikvici od 100,0 mL do označenog volumena kako bi se dobila konačna koncentracija standardne otopine kvercetina 0,1 mg/mL (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Od dobivene se otopine i etanola izradi koncentracijski niz otopina konačnog volumena 5 mL, a podaci potrebni za njihovu izradu nalaze se u tablici 2.

**Tablica 2.** Izrada kalibracijskih otopina standardne otopine kvercetina za dobivanje baždarnog pravca

| $\gamma$ (K)/ $\mu\text{g/mL}$ | V(standardna otopina)/ $\mu\text{L}$ | V(etanol)/ $\mu\text{L}$ |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| 5                              | 250                                  | 4750                     |
| 10                             | 500                                  | 4500                     |
| 15                             | 750                                  | 4250                     |
| 20                             | 1000                                 | 4000                     |
| 25                             | 1250                                 | 3750                     |
| 30                             | 1500                                 | 3500                     |

Za svaku pripremljenu koncentraciju kalibracijske otopine standarda rade se mjerenja dva puta, na način da se po 1 mL otopine iste koncentracije ulije u tri epruvete, pri čemu jedna od njih služi kao slijepa proba (Slika 14.). U dvije preostale epruvete dodaje se 1 mL pripremljenog reagensa (2%-tni  $\text{AlCl}_3$ ), dok se u slijepu probu mjesto reagensa dodaje 1 mL etanola. Nakon 15 minuta inkubacije, mjeri se apsorbancija na 415 nm, u odnosu na slijepu probu. Mjerenjem apsorbancije za svaku koncentraciju izradi se baždarni pravac.



**Slika 14.** Kalibracijske otopine standarda kvercetina nakon reakcije s reagensom



### 3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj fenola u uzorcima određen je kolorimetrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom.

#### Načelo metode:

Metoda se temelji na oksidacijsko-redukcijskim procesima između hidroksilnih skupina fenola i Folin-Ciocalteu reagensa, polimernog kompleksnog iona molibdena i volframa. Za odvijanje reakcije potreban je lužnati medij što se postiže dodatkom natrijevog karbonata u reakcijsku smjesu. Pri tome dolazi do deprotonacije hidoksilnih skupina fenola koje se zatim oksidiraju Folin-Ciocalteu reagensom uz njegovu istovremenu redukciju, što rezultira promjenom boje reagensa iz žute u plavu, a intenzitet obojenja izmjerenih vrijednosti apsorbancije između 0,2 i 0,8 korelira s koncentracijom fenola. Mjerenje je spektrofotometrijsko, na 765 nm, a kao standard se koristi galna kiselina (Singleton i Rossi, 1965).

#### Postupak:

Priprema reagensa: Pripremi se 50 mL vodene otopine reagensa od 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 45 ml destilirane vode.

Priprema otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Vodena otopina (7,5%) natrijevog karbonata (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) pripremi se odvagom 3,75 g natrijevog karbonata koji se zatim otopi u 50 mL destilirane vode.

Priprema uzoraka za analizu i mjerenje: Ranije pripremljeni ekstrakti (3.2.) maknu se s leda da postignu sobnu temperaturu. Od njih se pripremaju radne otopine u razrjeđenju od 20 puta na način da se 0,5 mL ekstrakta razrijedi s 9,5 mL 80%-tne vodenoalkoholne otopine.

Po 250 µL pripremljene radne otopine pojedinog uzorka prenese se u tri epruvete u koje se zatim dodaje 1,25 mL pripremljenog reagensa, a nakon 5 minuta u svaku se epruvetu doda 1 mL 7,5%-tne otopine natrijevog karbonata. Nakon sat vremena inkubacije na tamnom mjestu i sobnoj temperaturi, izmjeri im se apsorbancija na 765 nm, u odnosu na slijepu probu za koju se koristi destilirana voda.

Izrada standardne otopine galne kiseline i pripadajućeg baždarnog pravca: Pripremi se standardna otopina galne kiseline konačne koncentracije 0,1 mg/mL tako da se najprije 20 mg galne kiseline otopi u 20 mL etanola pri čemu se dobije otopina koncentracije 1 mg/mL, a zatim se 5 mL tako dobivene otopine prenese u odmjernu tikvicu od 50,0 mL i nadopuni etanolom do oznake.

Od dobivene standardne otopine galne kiseline i etanola pripreme se kalibracijske otopine različitih koncentracija, ukupnog volumena 2 mL. Podaci potrebni za njihovu izradu nalaze se u tablici 3.

**Tablica 3.** Izrada kalibracijskih otopina standardne otopine galne kiseline za dobivanje baždarnog pravca

| $\gamma$ (galna kiselina)/ $\mu\text{g/mL}$ | V(standardna otopina)/ $\mu\text{L}$ | V(etanol)/ $\mu\text{L}$ |
|---|--------------------------------------|--------------------------|
| <b>10</b>                                   | 200                                  | 1800                     |
| <b>20</b>                                   | 400                                  | 1600                     |
| <b>40</b>                                   | 800                                  | 1200                     |
| <b>60</b>                                   | 1200                                 | 800                      |
| <b>80</b>                                   | 1600                                 | 400                      |
| <b>100</b>                                  | 2000                                 | 0                        |

Za svaku se pripremljenu kalibracijsku otopinu standarda rade dva mjerenja, na način da se po 250  $\mu\text{L}$  otopine iste koncentracije ulije u 2 epruvete, doda se 1,25 mL pripremljenog reagensa i nakon 5 minuta još 1 mL pripremljene otopine natrijevog karbonata (Slika 15.). Nakon sat vremena inkubacije na tamnom mjestu i sobnoj temperaturi, mjeri se apsorbancija na 765 nm, u odnosu na slijepu probu za koju se koristi destilirana voda. Mjerenjem apsorbancije za svaku koncentraciju izradi se baždarni pravac.



**Slika 15.** Kalibracijske otopine standarda galne kiseline nakon reakcije s reagensom

### 3.4.2. Određivanje antioksidativnog učinka

Antioksidativni učinak uzoraka određen je modificiranom TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metodom, uz ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) reagens te galnu kiselinu kao standard.

#### Načelo metode:

Reakcijom ABTS-a s kalijevim peroksodisulfatom direktno se stvara ABTS kationski radikal ( $ABTS^{\bullet+}$ ) u stabilnom obliku. Nastali se radikal miješa s uzorkom zbog čijeg mu se antioksidativnog djelovanja smanjuje koncentracija u otopini. Posljedično dolazi do obezbojenja reakcijske otopine, odnosno smanjenja izmjerene apsorbancije na 734 nm, čiji je intenzitet u korelaciji s koncentracijom antioksidansa (Re i sur., 1999).

#### Postupak:

Dobivanje ABTS radikal kationa: Vodena otopina diamonijeve soli ABTS (7 mmol/L) inkubira se 12-16 h s kalijevim peroksodisulfatom (2,45 mmol/L) na sobnoj temperaturi u mraku, pri čemu nastaje stabilni kationski radikal ( $ABTS^{\bullet+}$ ). Otopinu je potrebno razrijediti etanolom sve dok apsorbancija na 734 nm ne iznosi  $0,70 \pm 0,02$ .

Priprema uzoraka za analizu i mjerenje: Ranije pripremljeni ekstrakti (3.2.) maknu se s leda da postignu sobnu temperaturu. Od njih se pripremaju radne otopine u razrjeđenju od 10 puta na način da se u 1 mL ekstrakta doda 9 mL 80%-tne vodenoalkoholne otopine. Za svaki se uzorak mjerenja provode tri puta. 2 mL reagensa i 10  $\mu$ L uzorka pomiješaju se u epruveti te se nakon jedne minute mjeri apsorbancija na 734 nm. Kao slijepa proba koristi se destilirana voda.

Izrada standardne otopine galne kiseline i pripadajućeg baždarnog pravca: Standardna otopina galne kiseline koncentracije 1 mg/mL dobije se otapanjem 20 mg galne kiseline u 20,0 mL etanola u odmjernej tikvici. Od dobivene standardne otopine galne kiseline i etanola pripreme se kalibracijske otopine različitih koncentracija, ukupnog volumena 1 mL. Podaci potrebni za njihovu izradu nalaze se u tablici 4.

Za svaku pripremljenu kalibracijsku otopinu standarda rade se dva mjerenja, na način da se po 10  $\mu\text{L}$  otopine iste koncentracije ulije u 2 epruvete i doda se 2 mL pripremljenog reagensa. Nakon 1 minute, mjeri se apsorbancija na 734 nm. Slijepa proba je destilirana voda. Mjerenjem apsorbancije za svaku koncentraciju izradi se baždarni pravac.

**Tablica 4.** Izrada kalibracijskih otopina standardne otopine galne kiseline za dobivanje baždarnog pravca

| $\gamma$ (galna kiselina)/ $\mu\text{g/mL}$ | V(standardna otopina)/ $\mu\text{L}$ | V(etanol)/ $\mu\text{L}$ |
|---|--------------------------------------|--------------------------|
| 40  | 40                                   | 960                      |
| 80  | 80                                   | 920                      |
| 120   | 120                                  | 880                      |
| 160   | 160                                  | 840                      |
| 200   | 200                                  | 800                      |
| 240   | 240                                  | 760                      |

#### **3.4.4. Statistička obrada podataka**

Sva mjerenja rađena su tri puta, a obrada eksperimentom dobivenih podataka provedena je u programu Microsoft Excel 2017 (Microsoft).

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

#### **Pearsonov test korelacije**

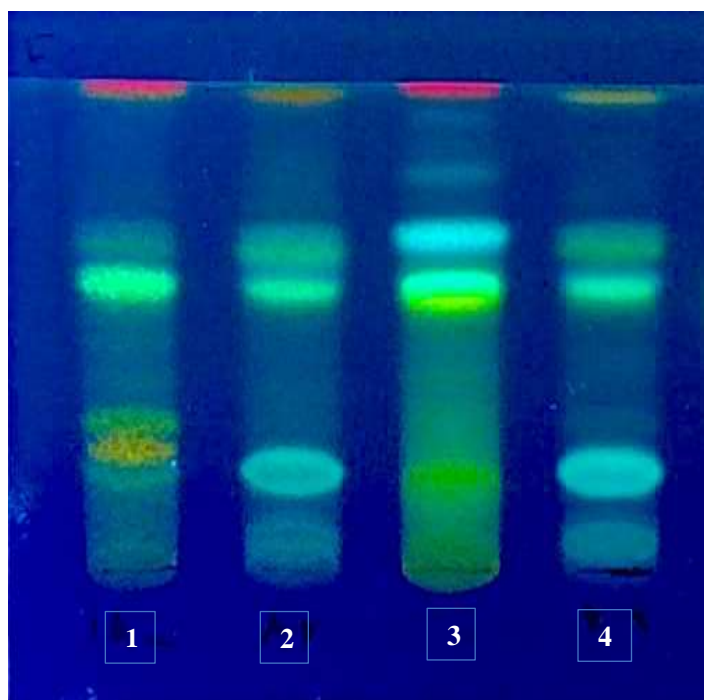
Vrijednosti Pearsonovog testa korelacije kreću se od -1 do +1, pri čemu one veće od 0 pokazuju pozitivnu korelaciju, odnosno sukladan rast vrijednosti obje skupine podataka. Ukoliko koeficijent korelacije zadovoljava postavljenu granicu značajnosti, koja je obično  $p < 0,05$ , zaključuje se da je koeficijent korelacije značajan i da se smije tumačiti. Ukoliko je vrijednost  $p > 0,05$ , koeficijent korelacije nije značajan i tada se bez obzira na njegovu vrijednost ne smije tumačiti (Udovičić i sur, 2007).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U nastavku rada prikazani su rezultati tanskoslojne kromatografije i spektrofotometrijskog određivanja flavonoida, ukupnih fenola, kao i antioksidativnog učinka ekstrakata listova i podanaka vrste *I. adriatica* te listova i podanaka vrste *I. croatica*.

### 4.1. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA FLAVONOIDA

Dobiveni kromatogram (Slika 16.) provedene tankoslojne kromatografije vizualiziran je stavljanjem ploče u uređaj EPI-Chemi Darkroom.



**Slika 16.** Kromatogram ispitivanih uzoraka: **1**- list vrste *I. adriatica*, **2**- podanak vrste *I.adriatica*, **3**- list vrste *I. croatica*, **4**- podanak vrste *I. croatica*

Uzorci su nanošeni redom: list vrste *I. adriatica*, podanak vrste *I.adriatica*, list vrste *I. croatica*, podanak vrste *I. croatica*. Put mobilne faze ( $Z_F - Z_0$ ) iznosio je 6,9 cm za sve uzorke, osim za podanak vrste *I. adriatica* kojemu je ta vrijednost iznosila 6,8 cm.

Za svaki uzorak određene su referentne kromatografske mrlje, kojima je iz izmjerenih vrijednosti duljine puta mobilne faze ( $Z_F - Z_0$ ) i duljine puta pojedinog uzorka ( $Z_x$ ), izračunat čimbenik zaostajanja ( $R_F$  vrijednost), prema izrazu:

$$R_F = \frac{Z_x}{Z_F - Z_0}$$

$R_F$  vrijednosti određenih mrlji, kao i cjelokupan kromatografski otisak pojedinog uzorka, koristan su alat u raspoznavanju različitih vrsta roda *Iris* i njihovih biljnih dijelova, a na temelju intenziteta kromatografskih mrlji mogu se procijeniti kvantitativni odnosi između flavonoida koji tim mrljama odgovaraju (Kaštelan-Macan i sur., 2006).

**Tablica 5.** Rezultati tankoslojne kromatografije

| UZORAK                             | $Z_x$ /cm | $R_F$ | boja           |
|------------------------------------|-----------|-------|----------------|
| <b><i>I. adriatica</i> list</b>    | 4,7       | 0,68  | zelena         |
|                                    | 4,1       | 0,59  | plavozelena    |
|                                    | 2,1       | 0,30  | žuta           |
|                                    | 1,7       | 0,25  | narančasta     |
|                                    | 1,4       | 0,20  | svjetlo zelena |
| <b><i>I. adriatica</i> podanak</b> | 4,6       | 0,68  | zelena         |
|                                    | 4,0       | 0,59  | plavozelena    |
|                                    | 1,4       | 0,21  | svjetlo plava  |
| <b><i>I. croatica</i> list</b>     | 4,8       | 0,70  | svijetlo plava |
|                                    | 4,1       | 0,59  | plavozelena    |
|                                    | 1,4       | 0,20  | zelena         |
| <b><i>I. croatica</i> podanak</b>  | 4,7       | 0,68  | zelena         |
|                                    | 4,1       | 0,59  | plavozelena    |
|                                    | 1,5       | 0,22  | svijetlo plava |

Iz kromatograma i  $R_F$  vrijednosti glavnih mrlji (Tablica 5.) pojedinih uzoraka, uočava se kako su podanci obje vrste sličnog sastava flavonoida, budući da se kromatografske mrlje poklapaju vizualno kao i po izračunatim  $R_F$  vrijednostima.



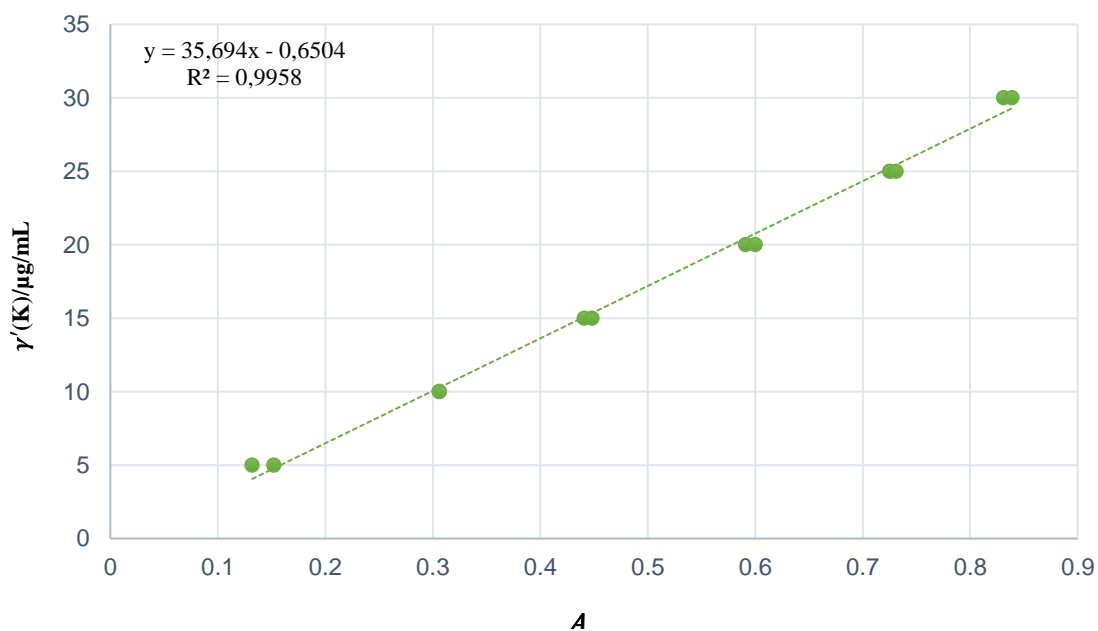
Na kromatografskom otisku listova vrsta *I. adriatica* uz ostale se vide žute ( $R_F$  0,30) i narančaste ( $R_F$  0,25) mrlje koje se ne uočavaju u uzorku listova vrste *I. croatica* zbog čega bi bilo moguće kromatografski razlučiti ove dvije vrste u slučaju kad bi sadržaj uzoraka bio nepoznat. Svjetloplave mrlje na kromatogramu odgovaraju izoflavonoidima, najzastupljenijoj skupini flavonoida u vrstama roda *Iris*, koji prevladavaju pretežito u podancima. Zbog prisutnih izoflavonoida kao glavnih biljnih sastavnica vrsta roda *Iris*, odnosno biljnih srodnika vrsta ispitivanih u ovome radu, daljnja istraživanja mogla bi potvrditi ekvivalentnost njihovih osušenih podanaka i droge Rhizoma iridis.

## 4.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA FLAVONOIDA

Iz ovisnosti izmjerenih apsorbancija i njima pripadajućih koncentracija (Tablica 6.) standardne otopine kvercetina dobije se baždarni pravac (Slika 17.).

**Tablica 6.** Koncentracije i izmjerene apsorbancije standardnih otopina kvercetina

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



**Slika 17.** Baždarni pravac kvercetina za određivanje koncentracije flavonoida

Pri tome, koncentracije kvercetina uvrštene u graf ovisnosti za baždarni pravac ( $\gamma'$ ) jesu vrijednosti priređenih koncentracija ( $\gamma$ ) korigiranih čimbenikom korekcije  $f$ , koji iznosi 0,95.

$$\gamma'(K) = 0,95 * \gamma(K)$$

Koncentracija flavonoida ( $\mu\text{g/ml}$ ) u uzorku odredi se iz jednadžbe dobivenog baždarnog pravca i vrijednosti apsorbancija dobivenih mjerenjem. Budući da su uzorke u ispitivanju činili razrijeđeni ekstrakti, očitana se koncentracija ( $\gamma'$ ) mora pomnožiti s provedenim razrjeđenjem (10 puta).

$$\gamma = \gamma' * 10$$

Rezultat pojedinog mjerenja izražava se kao miligrami ekvivalenta kvercetina ( $x$ ) po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM), a količina ekvivalenta kvercetina računa se prema sljedećoj formuli:

$$x = \frac{0,001 * V * \gamma}{m}$$

$\gamma$ – koncentracija nerazrijeđenog uzorka ( $\mu\text{g/mL}$ ),  
 $m$ – masa suhog biljnog materijala,  
 $V$ – volumen ekstrakta (25 mL),  
 0,001– faktor pretvorbe  $\mu\text{g}$  u mg

Mjerenje se radi tri puta čime se dobiju tri rezultata koja se izražavaju kao srednja vrijednost prema izrazu:

$$x = (x_1 + x_2 + x_3) / 3$$

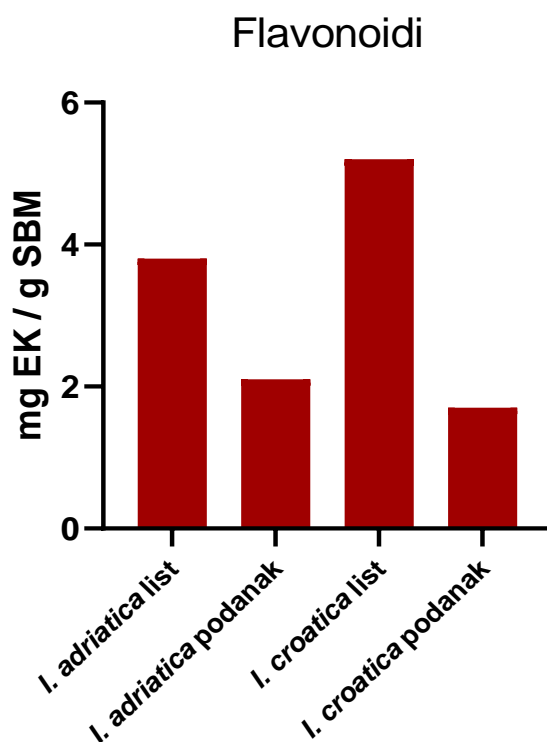
**Tablica 7.** Rezultati određivanja količine flavonoida u uzorku

| vrsta                         | organ   | A     | $\gamma'$<br>$\mu\text{g/mL}$ | $\gamma$<br>$\mu\text{g/mL}$ | masa<br>SBM/g | $x$ (mg EK/g<br>SBM) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ |
|-------------------------------|---------|-------|-------------------------------|------------------------------|---------------|----------------------|-------------------------|
| <i>I.</i><br><i>adriatica</i> | list    | 0,563 | 19,4                          | 184,7                        | 1,251         | 3,69                 | <b>3,80 ± 0,08</b>      |
|                               |         | 0,583 | 20,2                          | 191,5                        |               | 3,83                 |                         |
|                               |         | 0,592 | 20,5                          | 194,6                        |               | 3,89                 |                         |
|                               | podanak | 0,312 | 10,5                          | 99,6                         | 1,255         | 1,98                 | <b>2,06 ± 0,05</b>      |
|                               |         | 0,327 | 11,0                          | 104,7                        |               | 2,09                 |                         |
|                               |         | 0,33  | 11,1                          | 105,7                        |               | 2,11                 |                         |
| <i>I.</i><br><i>croatica</i>  | list    | 0,781 | 27,2                          | 258,7                        | 1,251         | 5,17                 | <b>5,17 ± 0,02</b>      |
|                               |         | 0,778 | 27,1                          | 257,6                        |               | 5,15                 |                         |
|                               |         | 0,786 | 27,4                          | 260,3                        |               | 5,20                 |                         |
|                               | podanak | 0,249 | 8,2                           | 78,3                         | 1,255         | 1,56                 | <b>1,66 ± 0,07</b>      |
|                               |         | 0,268 | 8,9                           | 84,7                         |               | 1,69                 |                         |
|                               |         | 0,273 | 9,1                           | 86,4                         |               | 1,72                 |                         |

Konačni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\bar{x}$  (mg EK/g SBM) kojoj je priračunata vrijednost standardne devijacije (SD) (Tablica 7.).

## Rasprava

Dobiveni rezultati upućuju na veću zastupljenost flavonoida u listovima ispitivanih vrsta nego u podanku, pri čemu prednjače listovi vrste *I. croatica* koji sadrže tri puta veću količinu flavonoida nego podanak iste vrste. Također se pokazalo kako je podanak vrste *I. adriatica* bogatiji flavonoidima od podanka vrste *I. croatica* (Slika 18.). Značajne količine flavonoida obećavajući su potencijal ovih vrsta budući da se upravo tim spojevima pripisuju aterosklerotski, antibakterijski i antitumorski učinak. Ipak, potrebno je provesti daljnja ispitivanja da bi se dokazale mogućnosti povoljnog djelovanja navedenih vrsta perunika u terapijske svrhe.



**Slika 18.** Grafički prikaz usporedbe sadržaja flavonoida uvrstama *I. adriatica* i *I. croatica*

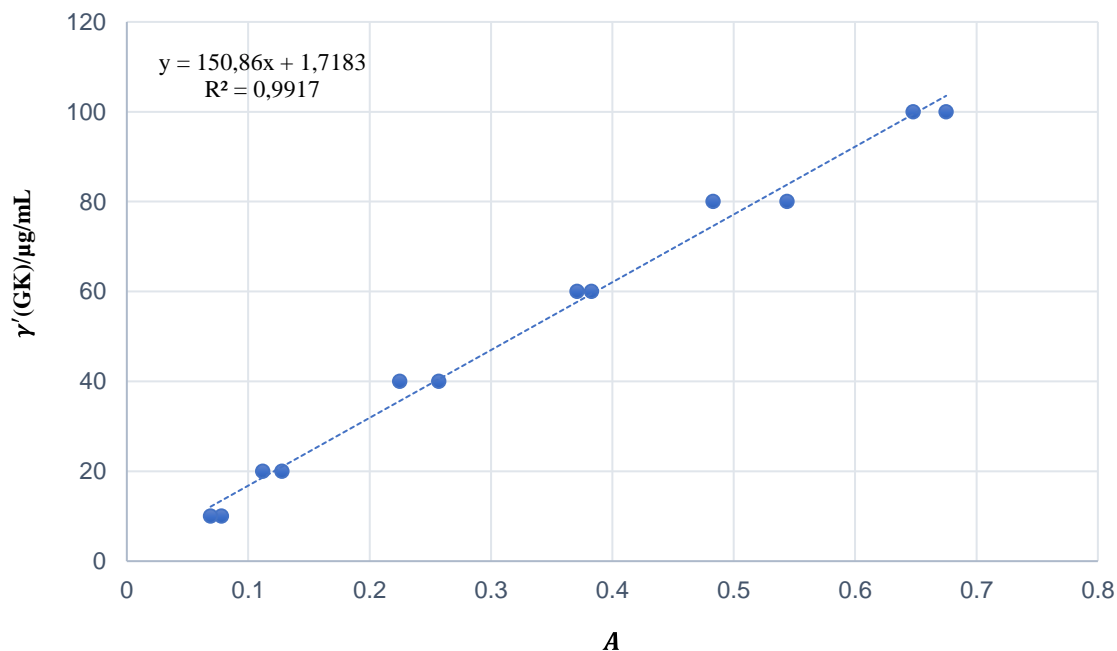
### 4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA

Iz ovisnosti izmjerenih apsorbancija i njima pripadajućih koncentracija (Tablica 8.) standardne otopine galne kiseline dobije se baždarni pravac (Slika 19.). Koncentracije galne kiseline uvrštene u graf ovisnosti za baždarni pravac ( $\gamma'$ ) jesu vrijednosti pripremljenih koncentracija ( $\gamma$ ) korigiranih čimbenikom korekcije  $f$ , koji iznosi 0,98.

$$\gamma'(\text{GK}) = 0,98 * \gamma(\text{G})$$

**Tablica 8.** Koncentracije i izmjerene apsorbancije standardnih otopina galne kiseline

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



**Slika 19.** Baždarni pravac galne kiseline za određivanje koncentracije ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola ( $\mu\text{g/mL}$ ) u uzorku odredi se iz jednadžbe dobivenog baždarnog pravca i vrijednosti apsorbancija dobivenih mjerenjem. Budući da su uzorke u ispitivanju činili razrijeđeni ekstrakti, dobivena se koncentracija ( $\gamma'$ ) mora pomnožiti s priređenim razrjeđenjem (20 puta).

$$\gamma = \gamma' * 20$$

Rezultat pojedinog mjerenja izražava se kao miligrami ekvivalenta galne kiseline (x) po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM), a računa se prema sljedećoj formuli:

$$x = \frac{0,001 * V * \gamma}{m}$$

$\gamma$  –koncentracija nerazrijeđenog uzorka ( $\mu\text{g/mL}$ ),  
 $m$  –masa suhog biljnog materijala  
 $V$  –volumen ekstrakta (25 mL),  
 0,001 –faktor pretvorbe  $\mu\text{g}$  u mg

Mjerenje se provodi tri puta zbog čega se dobiju tri rezultata iz kojih se izračuna srednja vrijednost miligrama ekvivalenta galne kiseline (x) po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM) prema izrazu:

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

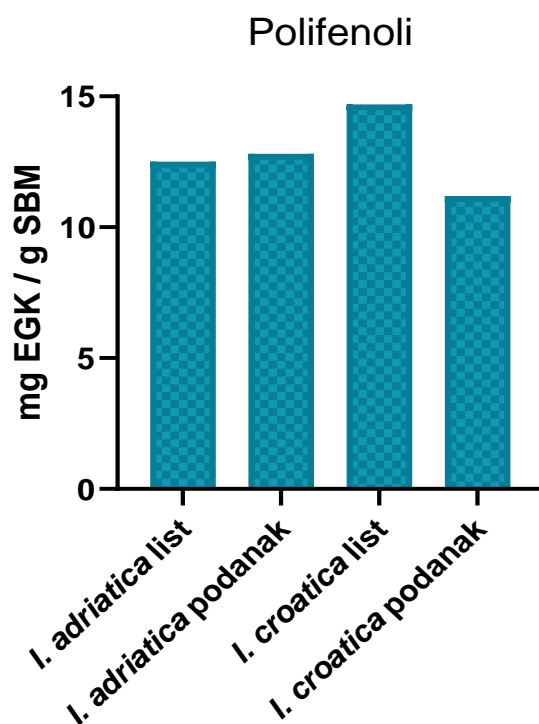
Konačni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\bar{x}$  (mg EGK/g SBM) kojoj je priračunata vrijednost standardne devijacije (SD) (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Rezultati određivanja količine ukupnih fenola u uzorku

| Vrsta               | organ   | A     | $\gamma'$<br>$\mu\text{g/mL}$ | $\gamma$<br>$\mu\text{g/mL}$ | masa<br>SBM /g | x (mg EGK/g SBM) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ |
|---------------------|---------|-------|-------------------------------|------------------------------|----------------|------------------|-------------------------|
| <i>I. adriatica</i> | list    | 0,188 | 30,1                          | 589,6                        | 1,251          | 11,78            | <b>12,47 ± 0,60</b>     |
|                     |         | 0,204 | 32,5                          | 636,9                        |                | 12,73            |                         |
|                     |         | 0,207 | 32,9                          | 645,7                        |                | 12,90            |                         |
|                     | podanak | 0,198 | 31,6                          | 619,1                        | 1,255          | 12,33            | <b>12,84 ± 0,65</b>     |
|                     |         | 0,203 | 32,3                          | 633,9                        |                | 12,63            |                         |
|                     |         | 0,219 | 34,8                          | 681,2                        |                | 13,57            |                         |
| <i>I. croatica</i>  | list    | 0,226 | 35,8                          | 701,9                        | 1,251          | 14,03            | <b>14,70 ± 0,59</b>     |
|                     |         | 0,241 | 38,1                          | 746,3                        |                | 14,91            |                         |
|                     |         | 0,245 | 38,7                          | 758,1                        |                | 15,15            |                         |
|                     | podanak | 0,161 | 26,0                          | 509,7                        | 1,255          | 10,15            | <b>11,16 ± 0,93</b>     |
|                     |         | 0,181 | 29,0                          | 568,9                        |                | 11,33            |                         |
|                     |         | 0,192 | 30,7                          | 601,4                        |                | 11,98            |                         |

## Rasprava

Iz dobivenih rezultata može se uočiti kako je zastupljenost ukupnih fenola u listovima i podanku vrste *I. adriatica* gotovo jednaka, dok je u listovima vrste *I. croatica* sadržaj ukupnih fenola veći nego u podanku. Podanak vrste *I. croatica* imao je najmanju količinu ukupnih fenola od svih ispitivanih uzoraka, dok je najveća količina izmjerena u listu te vrste (Slika 20.). Međutim, pri tumačenju rezultata mora se uzeti u obzir kako metoda s Folin-Ciocalteu (FC) reagensom nije specifična za fenole, već u uzorku reakciju mogu dati i druge tvari koje se ne ubrajaju u skupinu polifenola, a u strukturi posjeduju hidroksilne skupine. Primjerice, utvrđeno je da su listovi vrsta roda *Iris* bogati askorbinskom kiselinom, koja zbog svojih strukturnih karakteristika također može reagirati s FC reagensom, što može dati lažno povećane rezultate. Pretpostavka je da će se sušenjem veći dio askorbinske kiseline raspasti, međutim zbog nespecifičnosti ove metode i vrlo složenog kemijskog sastava biljnih uzoraka, dobiveni rezultati ne mogu se shvatiti kao apsolutan odraz stvarnog sastava ukupnih fenola, već kao približna procjena. Unatoč tome, neosporan je veliki kvantitativni značaj ukupnih fenola u uzorcima što odgovara podacima dobivenim ranije provedenim istraživanjima.



**Slika 20.** Grafički prikaz vrijednosti usporedbe sadržaja ukupnih fenola vrsta *I. adriatica* i *I. croatica*

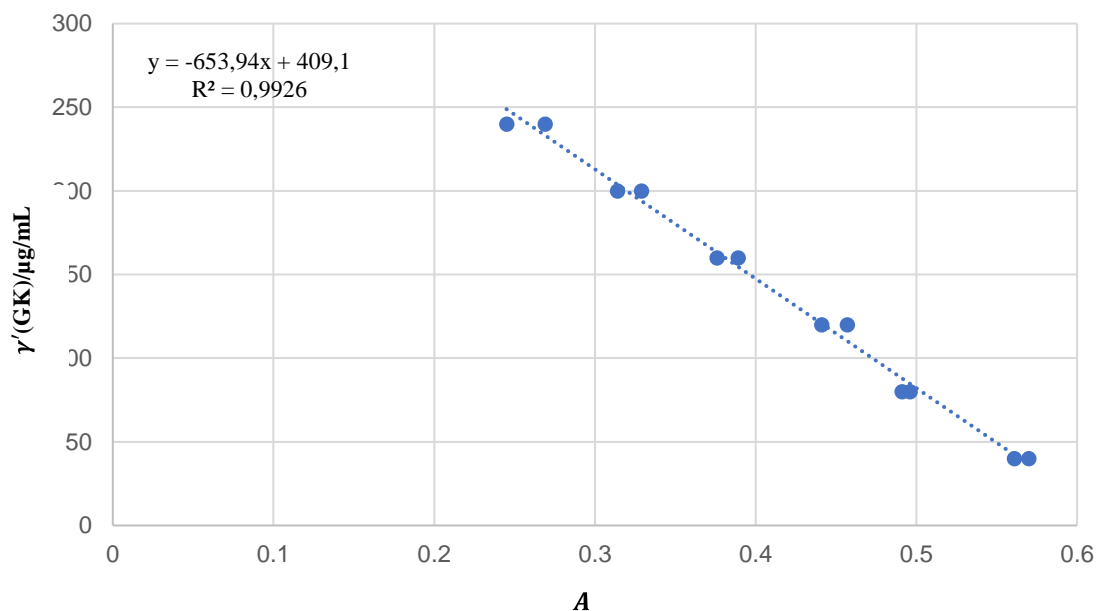
#### 4.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA (ABTS TEST)

Iz ovisnosti izmjerenih apsorbancija i njima pripadajućih koncentracija (Tablica 10.) standardne otopine galne kiseline dobije se baždarni pravac (Slika 21.). Koncentracije galne kiseline uvrštene u graf ovisnosti za baždarni pravac ( $\gamma'$ ) jesu vrijednosti pripremljenih koncentracija ( $\gamma$ ) korigirane čimbenikom korekcije  $f$ , koji iznosi 0,98.

$$\gamma'(G) = 0,98 * \gamma(G)$$

**Tablica 10.** Koncentracije i izmjerene apsorbancije standardnih otopina kvercetina

| $\gamma$ (GK)/ $\mu\text{g/mL}$ | APSORBANCIJA 1 | APSORBANCIJA 2 |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| 40                              | 0,561          | 0,570          |
| 80                              | 0,496          | 0,491          |
| 120                             | 0,441          | 0,457          |
| 160                             | 0,389          | 0,376          |
| 200                             | 0,329          | 0,314          |
| 240                             | 0,269          | 0,245          |



**Slika 21.** Baždarni pravac galne kiseline za određivanje antioksidativnog učinka ABTS metodom



Antioksidativni učinak uzorka odredi se iz jednadžbe dobivenog baždarnog pravca i vrijednosti apsorbancija dobivenih mjerenjem. Budući da su uzorke u ispitivanju činili razrijeđeni ekstrakti, dobivena se koncentracija ( $\gamma'$ ) mora pomnožiti s priređenim razrjeđenjem (10 puta).

$$\gamma = \gamma' * 10$$

Rezultat pojedinog mjerenja izražava se kao miligrami ekvivalenta galne kiseline (x) po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM), prema čemu je antioksidativni učinak uzorka jednak onome kojega bi uzorak imao da se ta količina galne kiseline nalazi u jednom gramu suhog biljnog materijala iz kojeg je uzorak dobiven. Ekvivalent se računa se prema sljedećoj formuli:

$$x = \frac{0,001 * V * \gamma}{m}$$

$\gamma$  –koncentracija nerazrijeđenog uzorka ( $\mu\text{g/mL}$ ),  
 $m$  –masa suhog biljnog materijala  
 $V$  –volumen ekstrakta (25 mL),  
 0,001 –faktor pretvorbe  $\mu\text{g}$  u mg

Mjerenje se provodi tri puta zbog čega se dobiju tri rezultata iz kojih se izračuna srednja vrijednost miligrama ekvivalenta galne kiseline (x) po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM) prema izrazu:

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

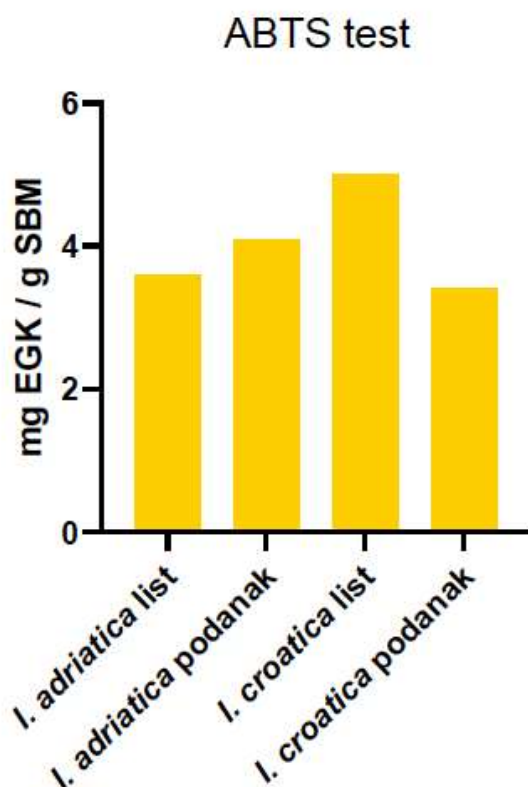
**Tablica 11.** Rezultati određivanja antioksidativnog učinka uzoraka ABTS testom

| vrsta                        | organ   | A     | $\gamma'$<br>$\mu\text{g/mL}$ | $\gamma$<br>$\mu\text{g/mL}$ | masa<br>SBM/g | x (mg EGK/g SBM) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ |
|------------------------------|---------|-------|-------------------------------|------------------------------|---------------|------------------|-------------------------|
| <i>I</i><br><i>adriatica</i> | list    | 0,357 | 175,6                         | 175,6                        | 1,251         | 3,51             | <b>3,61 ± 0,09</b>      |
|                              |         | 0,349 | 180,9                         | 180,9                        |               | 3,61             |                         |
|                              |         | 0,343 | 184,8                         | 184,8                        |               | 3,69             |                         |
|                              | podanak | 0,340 | 186,8                         | 186,8                        | 1,255         | 3,72             | <b>4,15 ± 0,37</b>      |
|                              |         | 0,289 | 220,1                         | 220,1                        |               | 4,38             |                         |
|                              |         | 0,293 | 217,5                         | 217,5                        |               | 4,33             |                         |
| <i>I.</i><br><i>croatica</i> | list    | 0,244 | 249,5                         | 249,5                        | 1,251         | 4,99             | <b>4,97 ± 0,22</b>      |
|                              |         | 0,263 | 237,1                         | 237,1                        |               | 4,74             |                         |
|                              |         | 0,229 | 259,3                         | 259,3                        |               | 5,18             |                         |
|                              | podanak | 0,375 | 163,9                         | 163,9                        | 1,255         | 3,26             | <b>3,37 ± 0,14</b>      |
|                              |         | 0,371 | 166,5                         | 166,5                        |               | 3,32             |                         |
|                              |         | 0,355 | 177,0                         | 177,0                        |               | 3,52             |                         |

Konačni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\bar{X}$  (mg EGK/g SBM) kojoj je priračunata vrijednost standardne devijacije (SD) (Tablica 11.).

## Rasprava

Najveći antioksidativni učinak pokazuje uzorak lista vrste *I. croatica*, što je u skladu s prethodno određenom količinom flavonoida i ukupnih fenola, dok je podanak pokazao slabiji antioksidativni učinak od lista. Suprotno tome, listovi vrste *I. adriatica* manjeg su antioksidativnog kapaciteta od podanka iste vrste (Slika 22.). Značaj istraživanja antioksidativnog učinka biljnih vrsta očituje se u mogućnosti korištenja biljaka i njihovih pojedinih dijelova kao izvora antioksidansa koji bi u organizmu sprječavali oksidativna oštećenja te na taj način sprječavali razvoj mnogih kroničnih bolesti u čijoj je pozadini upravo oksidativni stres.



**Slika 22.** Grafički prikaz usporedbe vrijednosti antioksidativnog učinka vrsta *I. adriatica* i *I. croatica*

#### 4.5. KORELACIJA SADRŽAJA FLAVONOIDA, FENOILA I ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA

Pearsonovim testom dokazana je pozitivna korelacija između antioksidativnog učinka, ukupnih fenola i flavonoida, što znači da veća količina ukupnih fenola u uzorku rezultira većim antioksidativnim učinkom istog uzorka. Uzorci su pokazali i korelaciju količine flavonoida i količine ukupnih fenola, što je i logično budući da su upravo flavonoidi najzastupljenija podskupina fenolnih spojeva u vrstama roda *Iris*.

**Tablica 12.** Korelacija između flavonoida, ukupnih fenola i antioksidativnog učinka

| Povezanost izmjerenih parametara                   | Koeficijent korelacije (r) | p vrijednost      |
|--|----------------------------|-------------------|
| <b>Sadržaj flavonoida i sadržaj fenola</b>         | 0,84                       | $2,88 * 10^{-7}$  |
| <b>Sadržaj flavonoida i antioksidativni učinak</b> | 0,90                       | $1,72 * 10^{-9}$  |
| <b>Sadržaj fenola i antioksidativni učinak</b>     | 0,93                       | $2,61 * 10^{-11}$ |

Dobivene vrijednosti koeficijenata korelacije, r, upućuju na vrlo visoku korelaciju. Iz dobivenih *p* vrijednosti uočava se da koeficijent korelacije zadovoljava postavljeni kriterij *p* vrijednosti pa se može zaključiti da je slučajnost dobivenih korelacija isključena (Tablica 12.).

## 5. ZAKLJUČCI

Provedenim istraživanjem pokazano je da su od svih uzoraka korištenih u ispitivanju, listovi vrste *I. croatica* najbogatiji flavonoidima, ukupnim fenolima te posljedično tome pokazuju najjači antioksidativni učinak. Podanci obje vrste pokazali su manji sadržaj flavonoida nego listovi, a najmanja količina bila je u podanku vrste *I. croatica*. Isti je uzorak po količini određenih ukupnih fenola bio siromašniji od ostalih. Nadalje, pokazalo se kako su ukupni fenoli kvantitativno podjednako zastupljeni u listovima i podancima vrste *I. adriatica*. Prisutnost polifenola visoko zastupljenih u ispitivanim biljnim dijelovima obećavajuće je terapijski iskoristivo svojstvo ovih vrsta zbog njihovog dokazanog djelotvornog sprječavanja nastanka i razvoja karcinoma i upalnih procesa, kao i terapije kardiovaskularnih bolesti. Izoflavonoidi koji su istraživanjima utvrđeni kao glavni metaboliti biljnih vrsta usko srodnih s ispitivanim vrstama, u ovome su radu dokazani tankoslojnom kromatografijom. To je jedan od razloga kojima se opravdava terapijska ekvivalentnost ovih vrsta u narodnoj medicini, s oficinalnim vrstama iz kojih se dobiva droga *Rhizoma iridis*. Daljnim bi se istraživanjima kemijskog sastava ovih vrsta, navedene pretpostavke mogle znanstveno potvrditi i upotrijebiti za terapijska rješenja, budući da se područje djelovanja izoflavonoida uvelike preklapa sa sprječavanjem glavnih mortalitenih čimbenika sadašnjice. Kromatografski obrasci pojedinih uzoraka upućuju na karakteristične flavonoide u podancima, dok su listovi kvalitativno raznolikiji zbog čega mogu poslužiti u kemotaksonomske svrhe.

Ovim radom dodatno je potkrijepljen ugled roda *Iris* i njegovih vrsta kao bogatih izvora sekundarnih, posebice fenolnih metabolita, što se, uz dodatna istraživanja, u budućnosti može iskoristiti u vidu konkretnih terapijskih rješenja.

## 6. LITERATURA

Alperth F, Mitić B, Mayer S, Maleš Ž, Kunert O, Hruševar D, Bucar F. Metabolic profiling of rhizomes of native populations of the strictly endemic Croatian species *Iris adriatica*. *Pl Biosyst*, 2019, 153, 317–324.

Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *J Pharm Belg*, 1994, 46, 462-468

Austin C. *Iris*-a gardener encyclopedia. Portland, Timber Press, 2005, str.12.

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

Ballard CR, Maróstica MR. Health Benefits of Flavonoids. U: *Bioactive Compounds-Health Benefits and Potential Applications*, Segura-Campos MR, urednica, Elsevier, 2019, str. 185–201.

Bisset NG. (ur.) *Herbal drugs and Phytopharmaceuticals*, 3. Izdanje. London, Medpharm Scientific Publishers, 2001, str. 278-280.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*, 2001, 161, 839–851.

Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food Drug Anal*, 2002, 10, 178-182.

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

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. *Natural Products (Secondary Metabolites)*. U: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Grissem W, Jones R, urednici, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 2000, str. 1250-1251.

Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, Oxford 2006, str. 2-11.

Fraga CG. Plant polyphenols: How to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life*, 2007, 59, 308–315.

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

Hooper L, Cassidy A. A review of the health care potential of bioactive compounds. *J Sci Food Agric*, 2006, 86, 1805–1813.

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

- Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules*, 2019, 24: 1076.
- Kukula-Koch W, Sieniawska E, Widelski J, Urjin O, Głowniak P, Skalicka-Woźniak K. Major secondary metabolites of *Iris* spp. *Phytochem Rev*, 2015, 14, 51-80.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci World J*, 2013, 2013, 162750.
- Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D. Plant Phenolics–Secondary Metabolites with Diverse Functions. U: *Recent Advances in Polyphenol Research*. Daayf F, Lattanzio V, urednici, Oxford, Wiley-Blackwell, 2008, str. 1–35.
- Lattanzio V. Phenolic Compounds: Introduction. U: *Natural Products*. Ramawat KG, Mérillon JM, urednici, Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 2013, str. 1543–1580.
- Mikhailenko O, Kovalyov V, Kovalyov S, Krechun A. Isoflavonoids from the rhizomes of *Iris hungarica* and antibacterial activity of the dry rhizomes extract, *Acta Pharm*, 2017, 58, 39-45.
- Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 418-425.
- Nikolić T, Milović M, Bogdanović S, Jasprica N. Endemi u hrvatskoj flori. Zagreb, Alfa, 2015, str. 289-300.
- Nikolić T. *Sistemska botanika*. Zagreb, Alfa, 2013, str. 424.-427.
- Pahlow M. *Velika knjiga ljekovitog bilja*. Zagreb, Cankarjeva založba, 1989, str. 168.
- Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 646, 107–112.
- Perunike – božanski cvjetovi, 2014., <http://www.matica.hr/hr/434/perunike-bozanski-cvjetovi-23985/>, pristupljeno 16.10.2019.
- Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod*, 2000, 63, 1035–1042.
- Položaj i razvoj botanike u razdoblju antike i ranoga srednjeg vijeka, 2014., <http://www.matica.hr/hr/434/polozaj-i-razvoj-botanike-u-razdoblju-antike-i-ranoga-srednjeg-vijeka-23980/>, pristupljeno 16.10. 2019.
- Rahman A, Nasim S, Baig I, Saima J, Ilkay O, Sener B, Choudhary MI. Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *J Ethnopharmacol*, 2003, 86, 177–180.
- Rasool SUA, Wani SH, Mir JI. *Iris Species: Review and study of phytochemical and genetic diversity of Iris species*. Saarbrücken, LAP LAMBERT Academic publishing, 2013, str. 11, 24-25.

Rasprostranjenost vrste *I. croatica* u Hrvatskoj, Flora Croatica baza podataka (<http://hirc.botanic.hr/fcd>). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, pristupljeno 13.10.2019.

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

Robards K, Antolovich M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids, A Review. *Analyst*, 1997, 122, 11-34.

Sažetak opisa svojstava lijeka, 2018., Detralex 500 mg filmom obložene tablete, <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Detralex-500-mg-filmom-oblozene-tablete/14439/>, pristupljeno 3.11. 2019.

Saxena M, Saxena J, Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health Review Article. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2012, 16, 28, 130-134.

Singab ANB, Ayoub IM, El-Shazly M, Korinek M, Tung-Ying W. Shedding the light on Iridaceae: Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. *Ind Crops Prod*, 2016, 92, 308–335.

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

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

Struktura irisksantona, <http://www.knapsackfamily.com/Twins/image.jsp?word=C00002955>, pristupljeno 5.11.2019

Struktura irisolona, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Irisolone.svg>, pristupljeno 5.11.2019.

Struktura mangiferina, <https://sh.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Mangiferin.svg>, pristupljeno 5.11.2019

Struktura tektorigenina, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tectorigenin.svg>, pristupljeno 5.11.2019.

Tanwar B, Modgil R. Flavonoids: dietary occurrence and health benefits. *Spatula*, 2012, 2, 59-68.

Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 2018, 5, 93.

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

Veiga M, Costa EM, Voss G, Silva S, Pintado M. Engineering and Health Benefits of Fruits and Vegetables Beverages. U: Non-Alcoholic Beverages, Grumezescu AM, Holban AM, urednici, Elsevier, 2019, str. 363–405.

Vrsta *I. adriatica*, <http://wiki.irises.org/Spec/SpecAdriatica>, pristupljeno 9.10.2019.

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

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

Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm*, 2018, 13, 12–23.

Watson RR. Polyphenol in plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. London, Academic Press, 2014, str. 38-40.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### SAŽETAK

Porodica Iridaceae vrlo je rasprostranjena porodica biljnog svijeta, kako geografski, tako i brojčano, a unutar nje s više od 300 vrsta dominira rod *Iris*, hrvatskog naziva perunike. Osim dekorativne uloge, ovim se vrstama od davnina pripisuju i ljekovita svojstva. Do sada je najviše istražen antioksidativni učinak, a pripisuje im se i protuupalno, kemoprotektivno, antihipolipemijsko, antimalarijsko te još mnoga druga djelovanja koja se danas intenzivno istražuju. U ovome radu, provedenom tankoslojnom kromatografijom u listovima vrste *I. adriatica* utvrđene su specifične kromatografske mrlje  $R_F$  vrijednosti 0,30 i 0,25, što ih razlikuje od listova vrste *I. croatica*, dok je kvalitativni sastav podanaka različitih vrsta bio približno jednak. Nadalje, spektrofotometrijskim postupcima kvantitativno su analizirani flavonoidi i ukupni fenoli u uzorcima listova i podanaka dviju endemskih vrsta perunika, *I. adriatica* i *I. croatica*. Flavonoidi su određeni metodom prema Arvouet-Grandu i sur. koja se temelji na keliranju prisutnih flavonoida aluminijskim ionima iz aluminijskoga klorida heksahidrata pri čemu nastaju žuto obojeni kompleksi. Rezultati su dobiveni mjerenjem apsorbancije na 415 nm, uz 0,1%-tnu otopinu kvercetina kao standarda, a izraženi su kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM)  $\pm$  standardna devijacija. Dobiveni rezultati kretali su se u rasponu od  $1,66 \pm 0,07$  za podanak vrste *I. croatica*, do  $5,17 \pm 0,02$  mg EK/g SBM određenog u listovima iste vrste. Sadržaj ukupnih fenola određen je metodom prema Singletonu i Rossiju uz Folin-Ciocalteu reagens čijom redukcijom reakcijska smjesa mijenja boju iz žute u plavu. Rezultati su dobiveni spektrofotometrijski na 765 nm, a prikazuju se kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM)  $\pm$  standardna devijacija. Najveća količina ukupnih fenola određena je u listovima vrste *I. croatica* i iznosila je  $14,70 \pm 0,59$  mg EGK/g SBM, dok je najmanji sadržaj od  $11,16 \pm 0,93$  utvrđen u podanku iste vrste. Istraženi antioksidativni učinak značajno korelira s količinom flavonoida i ukupnih fenola u uzorcima što je pokazano Pearsonovim testom korelacije, a određen je također spektrofotometrijskom metodom prema Reu i sur. koja antioksidativni učinak iskazuje kao sposobnost uklanjanja ABTS kationskog radikala i posljedično smanjenje intenziteta apsorbancije na 734 nm, uz galnu kiselinu kao standard. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM)  $\pm$  standardna devijacija, a kretali su se u rasponu od  $3,37 \pm 0,14$  do  $4,97 \pm 0,22$  mg EGK/g SBM.

## SUMMARY

The Iridaceae family are a very widespread family of plant species, both geographically and numerically, dominated by *Iris (cro. perunika)* with over 300 species worldwide. In addition to its decorative role, these species have been attributed with healing properties since ancient times. So far, their antioxidant effect has been the most researched, but they have also been attributed with anti-inflammatory, chemoprotective, antihypolipemic, antimalarial and many other properties that are currently intensively under research. Thin-layer chromatography performed in leaves of *I. adriatica* species revealed specific chromatographic spots of  $R_F$  values 0.30 and 0.25, which differentiated them from leaves of type *I. croatica*, while the qualitative composition of the subspecies of different species was approximately the same. Flavonoids and total phenolic compounds were quantitatively analyzed by spectroscopic methods in leaf and root samples of two endemic species of *Iris*, *I. adriatica* and *I. croatica*. Flavonoids were determined using the method adapted by Arvouet-Grand et al. which is based on the chelation of the present flavonoids with aluminum ions from aluminum chloride hexahydrates to form yellow colored complexes. The results were obtained by measuring the absorbance at 415 nm with a 0.1% quercetin solution as standard, and expressed as milligrams of quercetin equivalent per gram of dry plant material (EQ/g DPM)  $\pm$  standard deviation. The results ranged from  $1.66 \pm 0.07$  for subspecies of *I. croatica* to  $5.17 \pm 0.02$  mg EQ/g DPM determined in leaves of the same species. The content of polyphenols was determined using the method by Singleton and Rossi with Folin-Ciocalteu reagent that, when reduced, changes the reaction mixture colour from yellow to blue. The results were obtained spectroscopically at 765 nm and are shown as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg EGA/g DPM)  $\pm$  standard deviation. The highest amount of polyphenols was determined in leaves of *I. croatica* and amounted to  $14.70 \pm 0.59$  mg EGA/g DPM, while the lowest amount of  $11.16 \pm 0.93$  was found in the same species. The investigated antioxidant effect correlates significantly with the amount of flavonoids and polyphenols in the samples as demonstrated using Pears's correlation test, and was also determined by the spectroscopic, ABTS method by Re et al. This method recognises the antioxidant effect as the ability to remove the ABTS cationic radical and consequently reduce the absorbance intensity to 734 nm with gallic acid as a standard. The results are presented as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg EGA/g DPM)  $\pm$  standard deviation and ranged from  $3.37 \pm 0.17$  to  $4.97 \pm 0.22$  mg EGA/g DPM.

## 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

### Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog učinka u vrstama *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić i *Iris croatica* Horvat et M. D. Horvat

Petra Kovačić

#### SAŽETAK

Porodica Iridaceae vrlo je rasprostranjena porodica biljnog svijeta, kako geografski, tako i brojčano, a unutar porodice, s više od 300 vrsta dominira rod *Iris*, hrvatskog naziva perunike. Osim dekorativne uloge, ovim se vrstama od davnina pripisuju i ljekovita svojstva. Do sada je najviše istražen antioksidativni učinak, a pripisuje im se i protuupalno, kemoprotektivno, antihipolipemijsko, antimialarijsko te još mnoga druga djelovanja koja se danas intenzivno istražuju. U ovom radu, provedenom tankoslojnom kromatografijom u listovima vrste *I. adriatica* utvrđene su specifične kromatografske mrlje  $R_f$  vrijednosti 0,30 i 0,25, što ih razlikuje od listova vrste *I. croatica*, dok je kvalitativni sastav podanaka različitih vrsta bio približno jednak. Nadalje, spektrofotometrijskim postupcima kvantitativno su analizirani flavonoidi i ukupni fenolni spojevi u uzorcima listova i podanaka dviju endemskih vrsta perunika, *I. adriatica* i *I. croatica*. Flavonoidi su određeni metodom prema Arvouet-Grandu i sur. koja se temelji na keliranju prisutnih flavonoida aluminijskim ionima iz aluminijskoga klorida heksahidrata pri čemu nastaju žuto obojeni kompleksi. Rezultati su dobiveni mjerenjem apsorpcije na 415 nm, uz 0,1% -tnu otopinu kvercetina kao standarda, a izraženi su kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM)  $\pm$  standardna devijacija. Dobiveni rezultati kretali su se u rasponu od  $1,66 \pm 0,07$  za podanak vrste *I. croatica*, do  $5,17 \pm 0,02$  mg EK/g SBM određenog u listovima iste vrste. Sadržaj ukupnih fenola određen je metodom prema Singletonu i Rossiju uz Folin-Ciocalteu reagens čijom redukcijom reakcijska smjesa mijenja boju iz žute u plavu. Rezultati su dobiveni spektrofotometrijski na 765 nm, a prikazuju se kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM)  $\pm$  standardna devijacija. Najveća količina ukupnih fenola određena je u listovima vrste *I. croatica* i iznosila je  $14,70 \pm 0,59$  mg EGK/g SBM, dok je najmanji sadržaj od  $11,16 \pm 0,93$  utvrđen u podanku iste vrste. Istraženi antioksidativni učinak značajno korelira s količinom flavonoida i ukupnih fenola u uzorcima što je pokazano Pearsonovim testom korelacije, a određen je također spektrofotometrijskom metodom prema Reu i sur. koja antioksidativni učinak iskazuje kao sposobnost uklanjanja ABTS kationskog radikala i posljedično smanjenje intenziteta apsorpcije na 734 nm, uz galnu kiselinu kao standard. Rezultati su prikazani kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM)  $\pm$  standardna devijacija, a kretali su se u rasponu od  $3,37 \pm 0,14$  do  $4,97 \pm 0,22$  mg EGK/g SBM.

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

Rad sadrži: 54 stranice, 22 grafička prikaza, 12 tablica i 52 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Iris adriatica*, *Iris croatica*, fenolni spojevi, flavonoidi, kvantitativna analiza, antioksidativni učinak

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

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

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Biljana Nigović**, redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Veljača, 2020.

## 8. BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Pharmacy  
Department of pharmaceutical botany  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Quantitative analysis of phenolic compounds and determination of antioxidant effect in species *Iris adriatica* Trinajstić ex Mitić and *Iris croatica* Horvat et M. D. Horvat

Petra Kovačić

#### SUMMARY

The Iridaceae family are a very widespread family of plant species, both geographically and numerically, dominated by *Iris (cro. perunika)* with over 300 species worldwide. In addition to its decorative role, these species have been attributed with healing properties since ancient times. So far, their antioxidant effect has been the most researched, but they have also been attributed with anti-inflammatory, chemoprotective, antihypolipemic, antimalarial and many other properties that are currently intensively under research. Thin-layer chromatography performed in leaves of *I. adriatica* species revealed specific chromatographic spots of  $R_F$  values 0.30 and 0.25, which differentiated them from leaves of type *I. croatica*, while the qualitative composition of the subspecies of different species was approximately the same. Flavonoids and total phenolic compounds were quantitatively analyzed by spectroscopic methods in leaf and root samples of two endemic species of *Iris*, *I. adriatica* and *I. croatica*. Flavonoids were determined using the method adapted by Arvouet-Grand et al. which is based on the chelation of the present flavonoids with aluminum ions from aluminum chloride hexahydrates to form yellow colored complexes. The results were obtained by measuring the absorbance at 415 nm with a 0.1% quercetin solution as standard, and expressed as milligrams of quercetin equivalent per gram of dry plant material (EQ/g DPM)  $\pm$  standard deviation. The results ranged from  $1.66 \pm 0.07$  for subspecies of *I. croatica* to  $5.17 \pm 0.02$  mg EQ/g DPM determined in leaves of the same species. The content of polyphenols was determined using the method by Singleton and Rossi with Folin-Ciocalteu reagent that, when reduced, changes the reaction mixture colour from yellow to blue. The results were obtained spectroscopically at 765 nm and are shown as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg EGA/g DPM)  $\pm$  standard deviation. The highest amount of polyphenols was determined in leaves of *I. croatica* and amounted to  $14.70 \pm 0.59$  mg EGA/g DPM, while the lowest amount of  $11.16 \pm 0.93$  was found in the same species. The investigated antioxidant effect correlates significantly with the amount of flavonoids and polyphenols in the samples as demonstrated using Pears's correlation test, and was also determined by the spectroscopic, ABTS method by Re et al. This method recognises the antioxidant effect as the ability to remove the ABTS cationic radical and consequently reduce the absorbance intensity to 734 nm with gallic acid as a standard. The results are presented as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry plant material (mg EGA/g DPM)  $\pm$  standard deviation and ranged from  $3.37 \pm 0.17$  to  $4.97 \pm 0.22$  mg EGA/g DPM.

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

Thesis includes: 54 pages, 22 figures, 12 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Iris adriatica*, *Iris croatica*, phenolic compounds, flavonoids, quantitative analysis, antioxidant effect

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

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

The thesis was accepted: February, 2020

