

# Kvalitativna fitokemijska analiza lista i ploda vrste *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) s područja Kvarnera i Dalmacije

---

Perica, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:031783>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-19**



Repository / Repozitorij:

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



**Monika Perica**

**Kvalitativna fitokemijska analiza lista i ploda  
vrste *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) s područja  
Kvarnera i Dalmacije**

**DIPLOMSKI RAD**

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

**Zagreb, 2020.**

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

*Zahvaljujem prvenstveno mentorici, prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić, na uloženom trudu, strpljenju, pomoći i razumijevanju prilikom izrade ovoga diplomskog rada.*

*Iskrena zahvala dr. sc. Karlu Jurici na ustupljenom biljnom materijalu za provedena istraživanja.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci tijekom studiranja i najdražoj Amri koja je sa mnom prolazila kroz sve trenutke od početka studija.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Botanički podatci</b> .....	3
<b>1.1.1. Porodica Ericaceae Juss. 1789. (vriješovke, vriješovi)</b> .....	3
<b>1.1.2. Rod <i>Arbutus</i> L.</b> .....	3
<b>1.1.3. Vrsta <i>Arbutus unedo</i> L. – obična planika, maginja</b> .....	4
<b>1.2. Pregled istraživanja vrste <i>Arbutus unedo</i> L.</b> .....	7
<b>1.3. Ispitivane biološki aktivne tvari vrste <i>Arbutus unedo</i> L.</b> .....	9
<b>1.3.1. Polifenoli</b> .....	9
<b>1.3.2. Flavonoidi i fenolne kiseline</b> .....	14
<b>1.3.3. Trjeslovine</b> .....	18
<b>1.3.4. Steroli</b> .....	21
<b>1.3.5. Triterpeni</b> .....	22
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	24
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	25
<b>3.1. Biljni materijal</b> .....	25
<b>3.2. Aparatura i kemikalije</b> .....	25
<b>3.3. Metode i postupci istraživanja</b> .....	27
3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola.....	27
3.3.2. Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina .....	28
3.3.3. Kvalitativna analiza trjeslovina .....	27
3.3.4. Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina.....	28
3.3.5. Kvalitativna analiza triterpena.....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	30
<b>4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola</b> .....	30
<b>4.2. Rezultati kvalitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina</b> .....	32
<b>4.3. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina</b> .....	39
4.2.1. Rezultati dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga .....	39
4.2.2. Rezultati dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju .....	43
4.2.3. Rezultati dokazivanja kondenziranih trjeslovina.....	43
<b>4.4. Rezultati kvalitativne analize sterola i triterpenskih kiselina</b> .....	44
<b>4.5. Rezultati kvalitativne analize triterpena</b> .....	47
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	51
<b>6. LITERATURA</b> .....	53
<b>7. SAŽETAK / SUMMARY</b> .....	57
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

Pripravci ljekovitog bilja predstavljaju najstariji oblik terapije različitih bolesti. Stoljećima je to bio jedini način ublažavanja boli i liječenja. Francuski liječnik Henri Leclerc 1913. godine uvodi naziv fitoterapija u znanstvenu medicinu umjesto naziva "biljna medicina". Upotrebom cijelih ljekovitih biljaka, njihovih dijelova (listova, cvjetova, korijena) ili ekstrakata, ovom metodom liječenja sprječavaju se i ublažavaju različite bolesti i tegobe. Iako suvremena medicina sve više koristi konvencionalne lijekove, u današnje vrijeme fitoterapija ponovo doživljava svoj povratak.

Smatra se da su biljne tvari i biljni pripravci zbog svog prirodnog podrijetla sigurni i manje štetni od kemijski sintetiziranih molekula, no porastom njihove potrošnje, povećava se i rizik od mogućih interakcija s konvencionalnim lijekovima, ostalim terapeutima ili s dodacima prehrani, a posljedično se povećava rizik od štetnih djelovanja. Uslijed pogrešne identifikacije biljne droge, neispravnog postupka izrade biljnih pripravaka ili interakcija s različitim endogenim ili egzogenim tvarima, može se javiti potencijalna toksičnost. Kako se to ne bi događalo, potrebno je standardizirati takve pripravke (fitoterapeutici), kako bi bilo zajamčeno da se u 1 mL ili 1 g proizvoda nalazi točno određena količina aktivne komponente. Dakle, pod pojmom fitoterapeutika ili fitofarmaceutika smatraju se standardizirani biljni pripravci sa strogo definiranim sadržajem i sastavom terapijski aktivnih tvari, čija je učinkovitost potvrđena farmakološkim i kliničkim istraživanjima, uz naznaku mogućih nuspojava i interakcija s drugim lijekovima. Fitoterapeutici kao aktivne sastojke sadrže cijele ljekovite biljke, njene dijelove, određene sastavnice (npr. eterična ulja), pripravke (macerate, tinkture, suhe ekstrakte), te isto tako mogu sadržavati ekstrakte i pripravke gljiva i algi ljekovitog djelovanja.

Postoji mnogo biljnih pripravaka na hrvatskom tržištu, stoga je potrebno razlikovati dodatke prehrani i biljne lijekove. Za dodatke prehrani nadležno je Ministarstvo zdravstva RH te su blaže zakonski regulirani putem općih propisa koji vrijede za hranu, dok su biljni lijekovi regulirani putem Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) (<http://www.halmed.hr/>).

Biljni lijekovi kao djelatne tvari sadrže isključivo jednu ili više biljnih tvari, ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka, koji su dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (NN, 76/13, 90/14, 100/18). Biljni dodaci prehrani su pripravci proizvedeni iz sirovina biljnog podrijetla, a svrha im nije liječenje, već dodatno obogaćenje uobičajene prehrane s ciljem očuvanja zdravlja, upravo

zbog poddozirane količine sastavnica u odnosu na lijekove. S druge strane, biljni su lijekovi standardizirani i podliježu zakonskoj kontroli kvalitete te mogu služiti za liječenje ili sprječavanje bolesti.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna fitokemijska analiza biološki aktivnih tvari listova i plodova vrste *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) s područja otoka Lošinja i Koločepa, a u svrhu praćenja varijabilnosti sadržaja bioaktivnih tvari s dva različita otočka područja, te fitokemijske karakterizacije i spoznavanja ljekovitog potencijala obične planike.

## 1.1. Botanički podatci

### 1.1.1. Porodica Ericaceae Juss. 1789. (vrijesovke, vrijesovi)

Porodica Ericaceae ubraja se u carstvo Plantae, odjeljak Spermatophyta (sjemenjače), pododjeljak Magnoliophytina ili Angiospermae (kritosjemenjače), razred Magnoliatae ili Dicotyledonae (dvosupnice), reda Ericales (Grdinić i Kremer, 2009).

To su drvenaste biljke, koje većinom imaju oblik malenih grmova, polugrmova, rjeđe drveća. Listovi su im cjeloviti, najčešće linearni, poredani izmjenično, nasuprotno ili prividno pršljenasto, često vazdazeleni, kožasti i sjajni. Cvjetovi su dvosploni, aktinomorfni, zvonasti, vrčasti, cjevasti ili koturasti, s dvostrukim ocvijećem sastavljenim od 4 ili 5 lapova, međusobno sraslih većinom pri dnu, te 4 do 5 latica sraslih u sulatičan vijenac. Pojedini cvijet ima 5, 8 ili 10 prašnika koji su unutar vjenčića prirasli na cvjetište. Plodnica tučka je nadržala ili podrasla, s tri do pet pretinaca. Plod je bobica, koštunica, bobičasta koštunica ili tobolac. Rastu većinom na pjeskovitom i kiselom tlu (Maleš i sur., 2007).

Porodica Ericaceae obuhvaća više od 4000 vrsta, no u našoj zemlji uspijeva svega petnaestak pripadnika te porodice. Važniji rodovi porodice Ericaceae su: *Calluna* (npr. vrijes - *Calluna vulgaris*), *Erica* (npr. proljetna crnjuša – *Erica carnea*), *Arctostaphylos* (npr. medvjетка – *Arctostaphylos uva-ursi*), *Arbutus* (npr. obična planika – *Arbutus unedo*), *Vaccinium* (npr. obična borovnica – *Vaccinium myrtillus*; brusnica – *Vaccinium vitis-idaea*; močvarna borovnica – *Vaccinium uliginosum*) (Lim, 2012).

### 1.1.2. Rod *Arbutus* L.

Rod *Arbutus* L. obuhvaća 12 vazdazelenih vrsta koje rastu u obliku grmova ili drveća. Rasprostranjene su uglavnom na jugu Europe i zapadnom dijelu Sjeverne Amerike. Za njih su karakteristični bijeli ili ružičasti, zvonasti cvjetovi udruženi u grozdaste cvatove koji zbog mednog mirisa privlače kukce. Plodovi su narančaste do crvene boje, vrlo specifične neravne površine, dok su listovi tamni, sjajni i kožasti. Kako drvo raste, kora se guli i otkriva se crvena unutrašnjost (Miguel i sur., 2014).

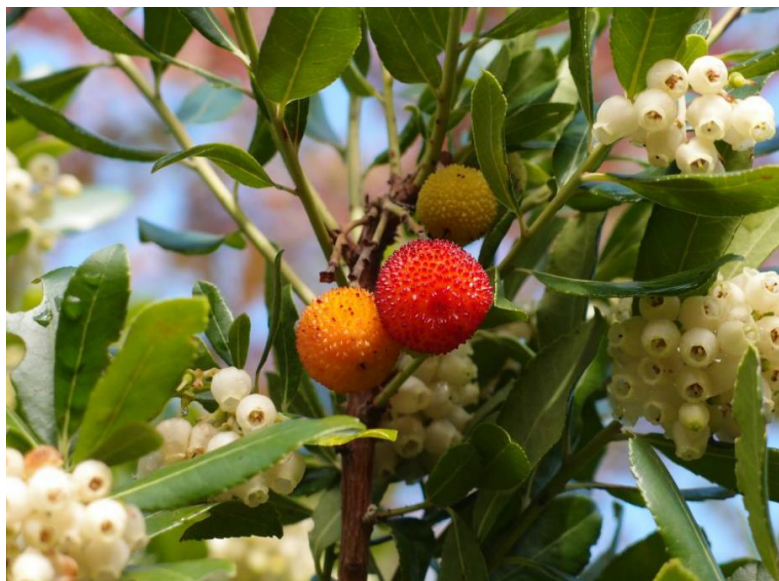
### 1.1.3. Vrsta *Arbutus unedo* L. – obična planika, maginja

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) je mediteranski, vazdazeleni grm ili nisko drvo iz porodice vrijesova koja uobičajeno doseže 1,5-3 m visine, ali može narasti i do 12 metara. U Hrvatskoj je nalazimo duž obale Jadranskog mora i na otocima Mljetu, Pelješcu, Malom Lošinju, Korčuli, Dugom otoku, Elafitskim otocima (Maleš i sur., 2006; Šilić, 2005). Osim na hrvatskoj obali i otocima, planika je rasprostranjena na području Male Azije, zapadne Europe, Sredozemlja (Španjolska, Portugal, južna Francuska, Italija, Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Albanija, Makedonija, Grčka, Turska). Kultivirana je i na jugu Švicarske, Irske, južnom dijelu Tirola te se pojavljuje i na području Kavkaza i Krima (Miguel i sur., 2014).

Najbolje uspijeva na vapnenačkim kamenjarima i pukotinama stijena, kao sastavni dio šuma hrasta crnike i makije. Vrlo je prilagodljiva, podnosi visoke temperature i sušna razdoblja, ali isto tako se može razvijati i u hladnijim, vlažnim klimatima na području zapadne Irske. Iako nema posebnih zahtjeva prema sastavu tla, najbolje raste na kiselom tlu što je i karakteristično za porodicu vrijesova (Lim, 2012).

Listovi su kožasti i sjajni, jajoliko lancetasti, na oba kraja zašiljeni, s kratkom crvenkastom peteljkom i oštro nazubljenim rubom. Zelenkastobijeli cvjetovi mednog mirisa razvijaju se u bogatim i lijepim grozdastim cvatovima od listopada do prosinca. Narančastocrveni okrugli i brašnasti plodovi (magine) višesjemene su okrugle bobice, na površini neravne i posute gusto smještenim bradavicama. Dozrijevaju vrlo sporo, u kasnu jesen i zimu, tako da ih se često nalazi na jednoj grani zajedno s novim cvjetovima (Lim, 2012; Grlić, 2005; Šilić, 2005). Dakle, obična planika je biljka koja istovremeno ima i cvijet i plod na stablu, no za sazrijevanje i formiranje ploda potrebna je skoro godina dana. Plodovi su jestivi i imaju slatkast okus, no konzumiranje veće količine zrelih plodova izaziva probavne smetnje te stanje slično pijanstvu ili omaglici. Još je starim Rimljanima bilo poznato djelovanje tih plodova pa je znanstveno ime vrste, *unedo*, izvedeno prema Pliniju od "unum tantum edo" što znači "jedem samo jedan". Kasnije se smisao ove izreke objašnjavao na dva načina, jedan govori da je teško pojesti više od jednog, te drugi da je on toliko ukusan da je dovoljno pojesti samo jedan (Maleš i sur., 2008). Crvenkasta kora obične planike s vremenom postaje zelenkasta ili siva te se ljušti u uzdužnim uskim ljuskama, a razgranati korijenski sustav izvrsno se prilagođava vapnenačkim kamenjarima i pukotinama stijena (Šilić, 2005).





**Slika 1.** *Arbutus unedo* L. (foto: S. Maslo, Flora Croatica baza podataka).

### **Upotreba i farmakološko djelovanje**

U nekim dijelovima Dalmacije, maginje se prerađuju u rakiju, vino ili marmeladu, a čak su služile i za dobivanje brašna. Povoljni učinci na zdravlje odavno su prepoznati te se razni dijelovi obične planike koriste kao pomoć kod različitih tegoba. Vazodilatacijskim djelovanjem povećava se krvni protok, a smanjenjem nakupljanja trombocita pokazuje pozitivne učinke pri regulaciji krvnog tlaka pa se tako cvjetovi i listovi koriste kao pomoć u kardiovaskularnim bolestima, poput hipertenzije, tromboze i arterioskleroze (Vidrih i sur., 2013).

Maginje se također primjenjuju u pučkoj medicini kao antiseptici, diuretici, laksansi, adstringensi te zbog visokog udjela trjeslovina posjeduju antitrombocitno-antiagregacijski učinak (Miguel i sur., 2014). Zbog velike količine različitih bioaktivnih spojeva, poput flavonoida, vitamina C i E, triterpena, eteričnog ulja, šećera, trjeslovina, obična planika ima niz pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Prisutnost fenolnih spojeva odgovorna je za antioksidacijski, protuupalni, vazodilatacijski i antitrombotički učinak (Moualek i sur., 2016; Orak i sur., 2011; El Haouari i sur., 2007). Dokazano je da obična planika inhibira rast i razvoj tumorskih stanica, pomaže u staničnoj obrani te tako pokazuje antiproliferativni i antimutageni učinak, odnosno antikancerogeno djelovanje. Ekstrakt lista obične planike, poboljšanjem učinka inzulina, boljim iskorištenjem glukoze u stanicama, smanjuje razinu glukoze u krvi te posjeduje antidijabetički učinak (Bnouham i sur., 2010).

Otkriven je i izrazit antioksidacijski učinak listova obične planike, što omogućuje zaštitu stanice od oksidativnog stresa uzrokovanog slobodnim kisikovim radikalima (Orak i sur., 2011). Kod plodova maginje također se spominje antioksidacijski učinak visokog udjela vitamina C, čak 200 mg/100 g, što samo nekoliko vrsta voća i povrća ima u većoj količini (Vidrih i sur., 2013).

Pripravci korijena i kore u narodnoj se medicini koriste kao adstrigensi kod gastrointestinalnih poremećaja (pomoć kod proljeva i za uklanjanje želučanih tegoba), uroantiseptici kod uroloških tegoba (infekcija mokraćnih putova, poput uretritisa i cistitisa) te za tretman dermatoloških problema (Maleš i sur., 2007). Istraživanja inhibicije rasta vrsta *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* ukazuju i na antimikrobni učinak ekstrakta korijena obične planike (Miguel i sur., 2014). Za blago dijaforetičko djelovanje odgovorni su cvjetovi pa se mogu primjenjivati za snižavanje visoke tjelesne temperature (Maleš i sur., 2007).

**Tablica 1.** Primjena različitih dijelova obične planike (*Arbutus unedo* L.) u narodnoj medicini (preuzeto od Oliveira i sur., 2011a).

Dio biljke	Medicinska upotreba	Literatura
<b>LIST</b>	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, kardiovaskularni poremećaji, bolesti bubrega, hipertenzija, bolesti srca, dijabetes, antihemoroidna primjena, diuretičko, protuupalno i antidijaroičko djelovanje	Cornara i sur., 2009 Leonti i sur., 2009 El-Hilaly i sur., 2003 Kivčak i sur., 2001b Ziyyat i sur., 1997
<b>PLOD</b>	Gastrointestinalni poremećaji, urološki i dermatološki problemi, bolesti bubrega, kardiovaskularna primjena	Cornara i sur., 2009 Leonti i sur., 2009 El-Hilaly i sur., 2003
<b>KORA</b>	Gastrointestinalni poremećaji, urološki i dermatološki problemi, kardiovaskularna primjena	Ziyyat i sur., 1997
<b>KORIJEN</b>	Gastrointestinalni poremećaji, urološki i dermatološki problemi, kardiovaskularna primjena, dijabetes, diuretičko, protuupalno i antidijaroičko djelovanje	Afkir i sur., 2008 Marioto i sur., 2008 Novais i sur., 2004 Kivčak i sur., 2001b

## 1.2. Pregled istraživanja vrste *Arbutus unedo* L.

Kako je od davnina u narodnoj medicini prepoznat zdravstveni potencijal obične planike, provedena su mnoga znanstvena istraživanja na različitim biljnim dijelovima (list, korijen, plod), te se time znatno pridonijelo objašnjavanju utjecaja kemijskog sastava na biološku aktivnost pojedinih biljnih dijelova.

Antioksidacijski učinak najčešće se istraživao u plodu te se otkrilo da zreli plodovi posjeduju veći antioksidativni učinak od nezrelih. Sušenjem plodova vrućim zrakom gubi se antioksidacijski učinak, što se pripisuje gubitku fenolnih sastavnica i vitamina. Također je dokazana značajna antioksidacijska aktivnost na etanolnim i acetonskim ekstraktima lista obične planike koja ukazuje na visoke udjele i utjecaje fenolnih i flavonoidnih komponenata (Lim, 2012).

Antihipertenzivno djelovanje izučavano je na vodenim ekstraktima korijena obične planike. Kod kronične oralne primjene spontano hipertenzivnih miševa polako se odgađala pojava hipertenzije, no to nije promijenilo krajnji rezultat vrijednosti krvnog tlaka i otkucaja srca miševa. Nadalje, primjenom vodenog ekstrakta lista ili korijena obične planike s N(G)-nitro-1-arginin-metilnim esterom (L-NAME), smanjila se pojava povišenog sistoličkog tlaka, ublažila se vaskularna reaktivnost i barorefleksna osjetljivost te se normalizirala renalna funkcija kod štakora (Afkir i sur., 2008). Vazorelaksacija na aortni prsten štakora prisutna je zbog tanina i katehin galata u ekstraktu listova obične planike. Tim istraživanjem dokazana je opravdanost primjene obične planike u prevenciji upalnih i kardiovaskularnih bolesti (Lim, 2012).

Antiagregacijsko djelovanje pripisuje se ekstraktu lista obične planike zbog visokog udjela flavonoida. Na trombocitima štakora, induciranim ADP-om i trombinom na agregaciju i inkubiranim u *in vitro* uvjetima, dokazano je smanjenje pretjerane aktivacije zgrušavanja. Ekstrakt je smanjio stopu zgrušavanja i nije imao toksičan učinak na životinje. Iako je flavonoidni učinak na agregaciju značajan, trjeslovine imaju veći utjecaj na antiagregacijsko djelovanje u listovima obične planike (El Haouari i Mekhfi, 2007). Drugo istraživanje također ukazuje na smanjenje agregacije ljudskih krvnih pločica koje su inducirane heparinom. Nadalje, ne dolazi do produkcije reaktivnih kisikovih radikala, kao ni do mobilizacije  $Ca^{2+}$  iona, niti fosforilacije tirozina, što su sve značajni faktori u procesu agregacije trombocita. Uspoređujući istraživanja na ljudskim krvnim pločicama i štakorima, vidljiv je veći antiagregacijski utjecaj obične planike na ljudske trombocite i time otkriven potencijal u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Miguel i sur., 2014).

Spazmolitički učinak, kao posljedica inhibicije Ca<sup>2+</sup> kanala, te visok udio fenolnih tvari, trjeslovina, arbutina i flavonoida, zaslužni su za primjenu ekstrakta lista obične planike kod gastrointestinalnih poremećaja, smanjujući bazalni tonus ileuma štakora (Pavlović i sur., 2011).

Antimikrobna svojstva dokazana su na gram pozitivnim bakterijama, budući da one u vanjskoj membrani sadrže peptidoglikan koji nije učinkovita propusna zapreka. Tako je u vodenom i metanolnom ekstraktu lista obične planike uočena inhibicija rasta gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, koja je najčešći uzrok trovanja hranom (Miguel i sur., 2014). Također je provedeno istraživanje na gram pozitivnoj bakteriji *Enterococcus faecalis*, na kojoj listovi obične planike u različitim otapalima pokazuju inhibicijski učinak rasta (Lim, 2012). No, izostaje učinak vodenog ekstrakta lista obične planike protiv gram negativnih bakterija *Escherichie coli* i *Salmonelle enteritidis* (Kivčak i sur., 2001.). Na gram negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* također nije dokazan antimikrobni učinak različitih ekstrakata listova obične planike (Pavlović i sur., 2011). Etil galat, pronađen u svim dijelovima spomenute biljne vrste, zaslužan je za antibiotsku aktivnost na bakterije roda *Mycobacterium* (Maleš i sur., 2007).

Antihiperглиkemijska aktivnost korijena obične planike istraživana na miševima pokazuje svoj učinak kroz inhibiciju apsorpcije glukoze u tankom crijevu u *in vitro* uvjetima, boljim iskorištenjem glukoze u stanicama. Poboljšala se oralna tolerancija glukoze te je došlo i do smanjenja tjelesne težine štakora nakon kronične oralne primjene u *in vivo* uvjetima (Mrabti i sur., 2019). Drugo istraživanje usredotočeno je na izolaciju bioaktivne tvari odgovorne za antihiperглиkemijsko djelovanje korijena obične planike široko poznato u narodnoj medicini. Cilj istraživanja bio je utvrditi kemijsku strukturu koristeći različite analitičke metode i procijeniti inhibitornu aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze. Iscrpna ekstrakcija korijena vrste *A. unedo* provedena je pomoću visokotlačne ekstrakcije, odnosno pomoću Zippertex<sup>®</sup> tehnologije, potom analizirana primjenom HPLC, <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR metoda. Antidiijabetički učinak izoliranog spoja dokazan je pomoću inhibitornog testa na  $\alpha$ -glukozidazu i otkriveno je da pokazuje veću inhibitornu aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze nego akarboza. Dokazano je da je katehin odgovorna bioaktivna komponenta za antidiijabetički učinak (Mrabti i sur., 2018).

Protuupalni učinak ekstrakta lista obične planike utvrđen je potisnutim djelovanjem na jedan od inicijalnih faktora upalnog procesa, transkripcijskog faktora STAT (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*), na kancerozne stanice u tkivu dojke MDA-MB-231 linije i na ljudske fibroblaste. Iako je regulacija spomenutog transkripcijskog faktora regulirana kako bi se kontrolirao proces upale, može doći do pojačane aktivnosti, odnosno do upale i

egzacerbacije. Utvrđena je inhibitorna aktivnost u kanceroznim stanicama tkiva dojke MDA-MB-231 linije i u ljudskim fibroblastima na interferone-gama koji su odgovorni za aktivaciju STAT1. Također se utvrdilo da je za inhibitorni učinak odgovorno pojačavanje fosforilacije tirozina na SHP2 tirozin fosfatazi, ključan nuklearni faktor u ekspresiji gena uključenih u upalne procese u stanici. Istraživanje je pokazalo da se obična planika može koristiti kao pomoć u upalnom procesu neke bolesti u kojem STAT1 ima ključnu ulogu (Mariotto i sur., 2008).

### **1.3. Ispitivane biološki aktivne tvari vrste *Arbutus unedo* L.**

#### **1.3.1. Polifenoli**

##### *Strukturne značajke polifenola*

Polifenoli su jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari u koju ubrajamo više od 8000 spojeva različite kemijske strukture. Sekundarni su biljni metaboliti jer nisu kao primarni izravno uključeni u razvoj biljnog organizma, no njihova ekološka i zaštitna uloga je značajna. Glavna strukturna karakteristika polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova (Bravo, 1998).

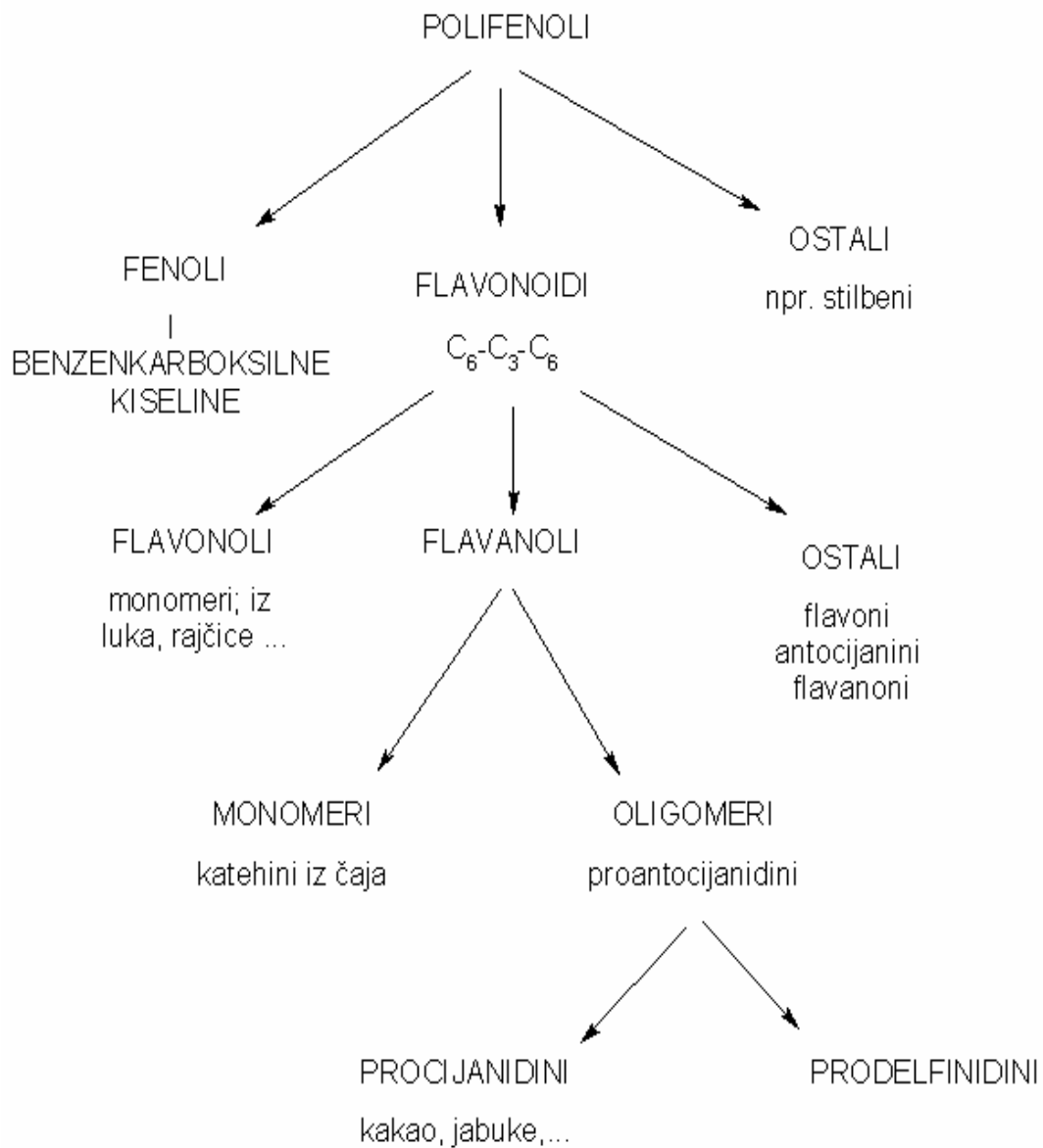
U polifenole se ubrajaju fenolne kiseline, flavonoidi i stilben. Kod fenolnih kiselina razlikujemo derivate benzojeve i hidroksicimetne kiseline. Flavonoidi bez vezanih šećera, aglikoni flavonoida, imaju strukturu tipa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Atomi ugljika raspoređeni su tako da su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

Dva su glavna biosintetska puta nastanka polifenola: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Glavna tvar u nastanku aromatskih prirodnih spojeva je šikiminska kiselina koja je univerzalni prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) te višim biljkama, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).

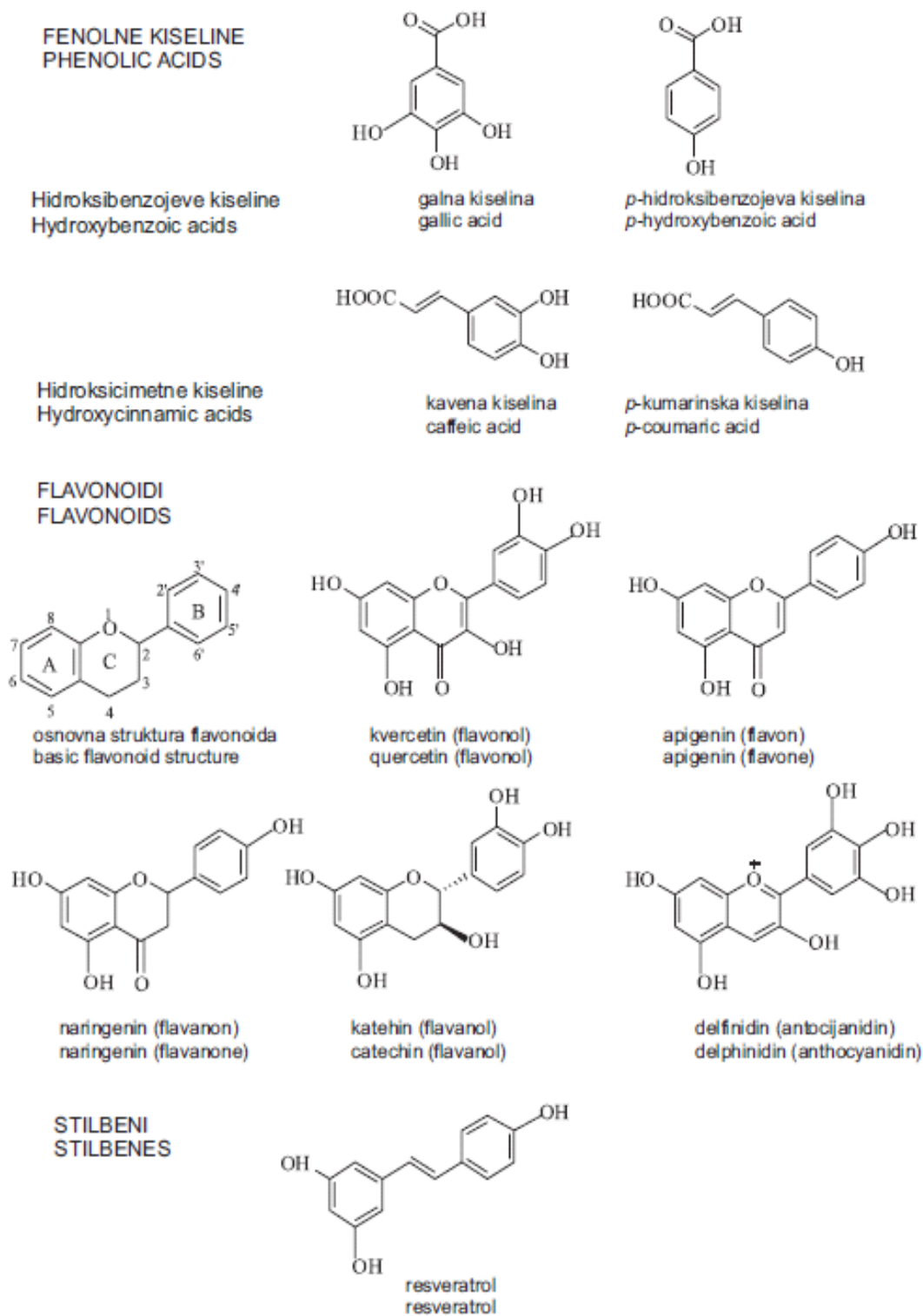
U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine, iako postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom. Najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza, no vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput

galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukuronsku te galakturonsku kiselinu. Polifenoli se mogu konjugirati i s drugim tvarima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi. Česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998).

Podjela polifenola (Slika 2) temelji se na broju fenolnih prstenova koje sadrže i na strukturnim elementima koji te prstenove povezuju (Berend i Grabarić, 2008).



**Slika 2.** Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 3. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

### *Rasprostranjenost polifenola*

Kao glavni antioksidansi u našoj prehrani, javljaju se kao česti sastojci hrane biljnog podrijetla. Prehranom se dnevno unese 1 g polifenola, a to je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa. Navedena količina čak je deset puta veća od prosječnog unosa vitamina C te je sto puta veća od prosječnog unosa vitamina E i karotenoida. Glavni su izvori polifenola u prehrani voće i pića dobivena od biljaka, poput voćnih sokova, čaja, kave i crnog vina. Primjerice, čaša crnog vina, šalica čaja ili kave sadrže u prosjeku oko 100 mg polifenola, dok grožđe, jabuke, kruške, trešnje i razno bobičasto voće sadrže 200-300 mg polifenola na 100 g svježeg voća (Pandey i Rizvi, 2009; Scalbert i sur., 2005).

Kvercetin i njemu slični polifenoli prisutni su u svim biljnim produktima, dok su neki ograničeni na specifične namirnice, npr. izoflavoni u soji, flavanoni u citrusnom voću, floridzin u jabukama. Kako namirnice većinom sadrže kompleksnu smjesu polifenola, za mnoge je točan sastav polifenola slabo poznat. Okolišni čimbenici mogu bitno utjecati na sastav polifenola, najčešće pedoklimatski (količina padalina, tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti) ili agronomski (ukupni urod po jednoj biljci, uzgoj u stakleniku ili na otvorenom). Tijekom skladištenja, ako se radi o polifenolima koji su podložni oksidaciji, može se utjecati na sadržaj polifenola. Reakcije oksidacije dovode do nastanka jedne ili više polimernih molekula, a to dovodi do promjena u kakvoći namirnice i organoleptičkim svojstvima koje mogu biti nepoželjne (smeđa boja narezanog voća) ili poželjne (crni čaj). Također, pripremom hrane se utječe na količinu polifenola prisutnih u namirnicama. Primjerice, budući da su polifenoli najčešće u značajno većim koncentracijama prisutni u vanjskim dijelovima voća i povrća nego u unutrašnjim, guljenje voća i povrća uklonit će značajnu količinu polifenola. Termičkom pripremom hrane dolazi do znatnog gubitka polifenola (Manach i sur., 2004).

### *Biološki učinci polifenola*

Od pozitivnih djelovanja polifenola na zdravlje, u znanstvenim istraživanjima se ističu: diuretičko, spazmolitičko, kardiotonično, antiinflamatorno, antiulkusno, antihepatotoksično, antimikrobno, antifungalno, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, antialergijsko, analgetično, antimalarijsko, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Petrik, 2008). U prvoj polovici 90-ih godina prošlog stoljeća, najviše antioksidacijskih ispitivanja provodilo se na vitaminima, karotenoidima i mineralima. Godine 1995. započela su istraživanja na flavonoidima i ostalim polifenolima, u svrhu ispitivanja njihovih antioksidacijskih svojstava i



uloge u prevenciji različitih bolesti. Glavni čimbenik koji je odgađao provedbu istraživanja bila je značajna različitost i složenost kemijskih struktura (Scalbert i sur., 2005).

Postoje recentni dokazi koji jasno pokazuju koliki je doprinos polifenola u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka i osteoporoze, također se otvaraju i potencijalne mogućnosti u prevenciji dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti. Primjerice, crno vino je bogat izvor polifenolnih antioksidansa i smatra se uzrokom fenomena „francuski paradoks“, što označava zapanjujuće nisku pojavnost koronarnih bolesti srca u Francuskoj, unatoč konzumaciji hrane s puno masnoća, a upravo je povezana s konzumacijom crnog vina koje sadrži visoke količine polifenolnih spojeva. Polifenolni antioksidansi prisutni u ekstradjevičanskom maslinovom ulju zaslužni su za pozitivan učinak mediteranske prehrane na zdravlje (Castañer i sur., 2011; Scalbert i sur., 2005).

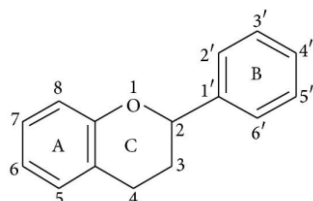
Iz *in vitro* istraživanja ili pokusa na životinjama potječe puno dokaza o prevenciji bolesti primjenom polifenola te se koriste znatno veće doze od onih koje ljudi unose prehranom. Nužno je poznavanje metabolizma, bioraspoloživosti i rasprostranjenost različitih polifenolnih spojeva te njihovog sadržaja u hrani. Takva saznanja bitna su za razumijevanje odnosa između rizika za razvoj različitih bolesti i unosa polifenola hranom. Kako bioraspoloživost polifenolnih spojeva značajno varira između različitih vrsta tih spojeva, ne mora značiti da će polifenoli najzastupljeniji u našoj prehrani imati i najbolju bioraspoloživost. Iako je dokazano da polifenoli poboljšavaju status biomarkera oksidativnog stresa, i dalje postoje nesuglasice vezane uz značaj biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti primijenjene metode. Javlja se i studije koje pokazuju prooksidativni učinak polifenola kojim posljedično mogu inducirati apoptozu i inhibirati staničnu proliferaciju. Takav se kontradiktoran rezultat javlja zbog činjenice da polifenolne tvari čini velik broj različitih spojeva s različitim biološkim djelovanjem, stoga se učinak jednog polifenolnog spoja ne može generalizirati za ostale spojeve (Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

Polifenoli moduliraju aktivnost velikog broja enzima (ciklooksigenaza, telomeraza, lipooksigenaza) te staničnih receptora budući da se kao fitokemikalije nalaze u gotov svim namirnicama biljnog podrijetla. Prisutna je također interferencija s različitim signalnim putevima te time utjecaj na transdukciju signala, a sve je više dokaza koji govore o pozitivnom utjecaju polifenola na regulaciju staničnog ciklusa i na funkciju trombocita (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004).

### 1.3.2. Flavonoidi i fenolne kiseline

#### *Strukturne značajke flavonoida*

Flavonoidi su prirodni fenolni spojevi koji su naziv dobili po svojoj karakterističnoj žutoj boji (lat. *flavus* = žut), iako se ovdje ubrajaju i crvenomodro obojeni antocijani. Flavonoidi pripadaju velikoj skupini prirodnih polifenolnih spojeva koji imaju strukturu tipa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem) (Slika 4). Kod većine flavonoida tri se ugljikova atoma povezuju s kisikom i tvore središnji šesteročlani heterociklički prsten. Ako su aromatski prsteni međusobno odijeljeni jednim tročlanim mostom, onda su to pravi flavonoidi. Strukturne varijante s etilenskim mostom su izoflavonoidi, dok je kod neoflavonoida most jednočlan (Vladimir-Knežević, 2008).

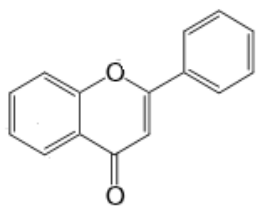


**Slika 4.** C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> struktura flavonoida.

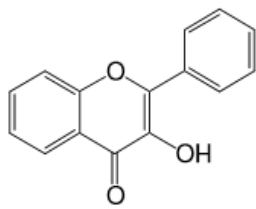
Flavonoidi se međusobno razlikuju po stupnju oksidacije heterocikličkog prstena, položaju i broju hidroksilnih i metoksilnih skupina na benzenskim jezgrama, te po vezanim šećerima.

Flavonoidnim derivatima (Slika 5) pripadaju: flavoni, flavonoli (3-hidroksiflavoni), flavanoni (2,3-dihidroflavoni), flavanonoli (3-hidroksi-2,3-dihidroflavoni), izoflavoni (5-fenilbenzo- $\gamma$ -pironi), antocijanidini (derivati 2-fenil-3,5,7-trihidrobenzopirilijeva hidroksida), leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli), katehini (flavan-3-oli), kalkoni (derivati benzalacetofenona) i auron (derivati benzalkularan-3-ona). Najzastupljeniji flavonoidi u prirodi su flavoni i flavonoli (Toplak Galle, 2001; Wagner, 1993).

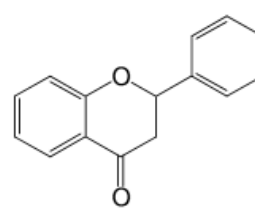
Po svojem kemijskom sastavu flavonoidi su heterozidi (glikozidi), građeni su od dva dijela: glikonske (šećerne) i aglikonske (nešećerne) komponentne. Aglikonska komponenta je derivat 2-fenil-dihidrobzenopirana (flavana) te se flavonoidi nazivaju još i benzopiranskim heterozidima. Uglavnom prevladavaju 3- i 7-heterozidi iako šećerni ostatak može biti vezan u bilo kojem položaju. Od monosaharida su najzastupljeniji D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, D-ksiloza i L-arabinoza, a od disaharida rutinoza (L-ramnozido-6-D-glukoza), soforoza (D-glukozido-2-D-glukoza) i sambubioza (D-ksilozido-2-D-glukoza) (Harborne, 1964).



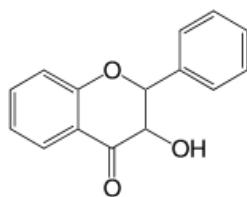
Flavon



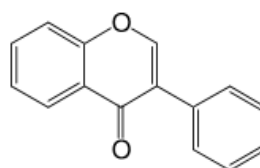
Flavonol



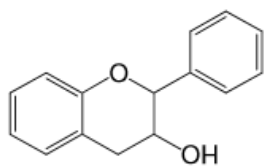
Flavanon



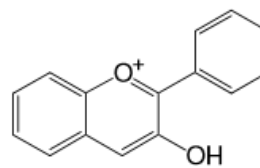
Flavanonol



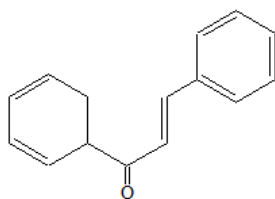
Izoflavon



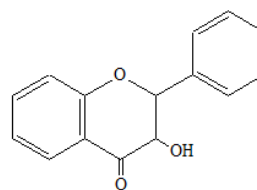
Katehin



Antocijanidin



Kalkon



Leukocijanidin

**Slika 5.** Osnovne strukture flavonoida.

## *Biološki učinci flavonoida*

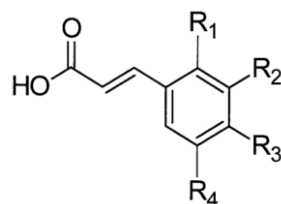
Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, od algi do kritosjemenjača. Sastavni su dio gotovo svih viših biljaka, a najviše ih ima u mladim listovima, cvjetnim pupoljcima i nezrelim plodovima (Vladimir-Knežević, 2008).

Metabolizam, bioraspoloživost i biološka aktivnost flavonoida u ljudskom organizmu ovisi o konfiguraciji, ukupnom broju hidroksilnih skupina i razmještanju funkcionalnih skupina na osnovnoj flavonoidnoj strukturi. Flavonoidi posjeduju različite farmakološke učinke zbog svoje inhibicije, odnosno u manjem dijelu indukcije enzima. Inhibiraju enzime poput ciklooksigenaze, histidin-dekarboksilaze, cAMP-fosfodiesteraze, lipooksigenaze, fosfolipaze, hijaluronidaze, ksantinoksidaza, aldoza-reduktaze, dok induciraju enzime arilhidrolazu i epoksid-hidrolazu. Dokazana su različita farmakološka djelovanja flavonoida: antifungalno, antiviralno, antimikrobno, protuupalno, analgetičko, antialergijsko, antimalaričko, hipoglikemijsko, diuretičko, dijaforetičko, spazmolitičko, antiulkusno, antihipertenzivno, antiaritmično, antihepatotoksično, antikoagulirajuće, kardiotoničko, antitumorsko i antioksidativno djelovanje. U biljnim organizmima flavonoidi imaju značajnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa, regulaciji rasta te u obrani od mikroorganizama. Flavonoidi u hrani (voće i povrće) odgovorni su za okus, boju, prevenciju oksidacije masti te za zaštitu enzima i vitamina (Kuštrak, 2005; Jurišić, 2003).

## **Fenolne kiseline**

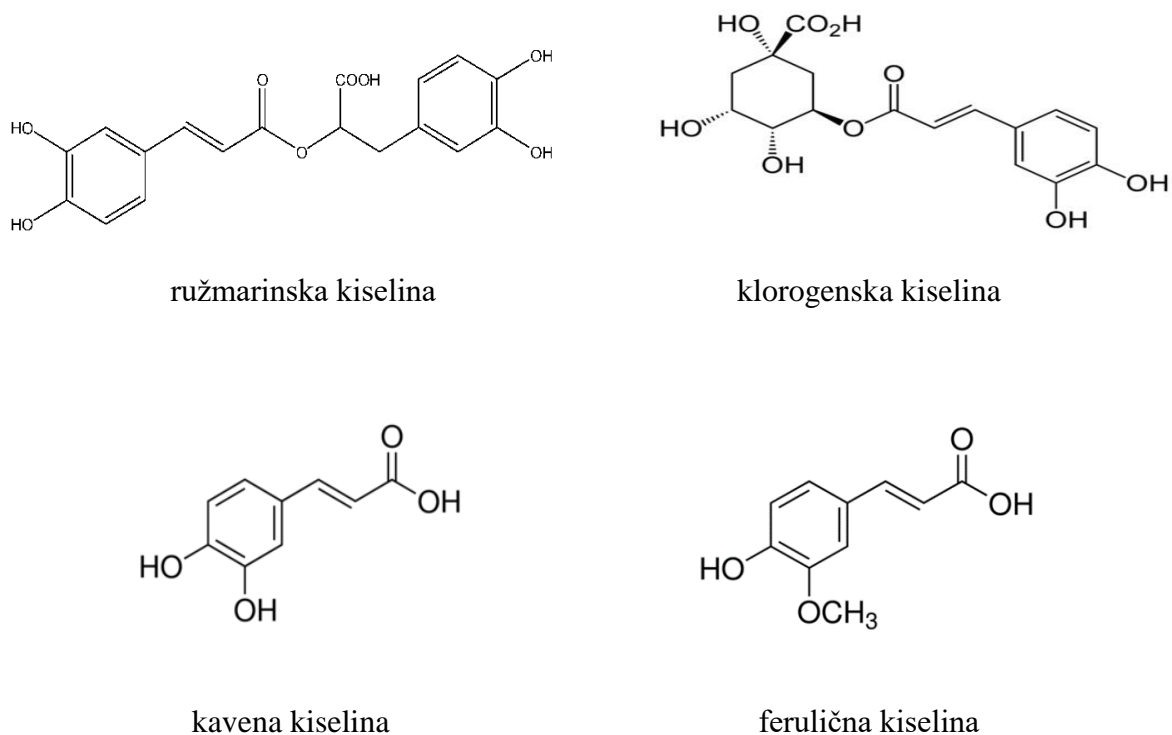
### *Strukturne značajke fenolnih kiselina*

Fenolne kiseline nazivaju se još i fenilkarboksilne kiseline, prirodni su fenolni spojevi koji po svojem kemijskom sastavu pripadaju u fenilpropane. Dijeleg se u dvije skupine, derivate cimetine kiseline, s općom formulom C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, i derivate benzojeve kiseline, s općom formulom C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Mogu biti slobodne ili vezane s drugim spojevima (Vladimir-Knežević, 2008).



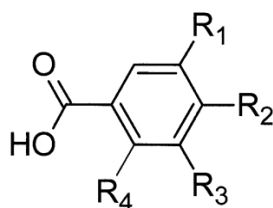
**Slika 6.** Osnovna struktura derivata cimetine kiseline.

Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su kavena, ružmarinska, ferulična i sinapinska kiselina. U biljnim vrstama rjeđe dolaze u slobodnom obliku, većinom dolaze u obliku estera. Od vezanih fenolnih kiselina, vrlo su rasprostranjene klorogenska (ester kavene i kina kiseline), cikorijska i ružmarinska kiselina u kojoj su kavena i 2-hidroksi-2,3-dihidro-kavena kiselina vezane na mliječnu kiselinu (Maleš i sur., 2008).



**Slika 7.** Najzastupljeniji derivati cimetne kiseline.

Elaginska, gentizinska, *p*-hidroksibenzojeva, galna, vanilinska i protokatehinska kiselina glavni su predstavnici derivata hidroksibenzojevih kiselina. Pojavljuju se u slobodnom obliku ili vezane u esterima i heterozidima. Također se mogu javiti u obliku aldehida, poput najraširenijeg vanilina i salicilaldehida (Maleš i sur., 2008; Vladimir-Knežević, 2008).



**Slika 8.** Osnovna struktura derivata hidroksibenzojeve kiseline.

### *Biološki učinici fenolnih kiselina*

Većina fenolnih kiselina pokazuje antioksidativnu moć zbog mogućnosti tvorbe stabilnih intermedijera sa slobodnim radikalima, odnosno hvataju slobodne kisikove i dušikove radikale. Kavena, klorogenska, ružmarinska i ferulična kiselina smanjuju aktivnost lipooksigenaze i sprječavaju lančane reakcije slobodnih radikala koji nastaju u organizmu. Mogu djelovati i citotoksično na tumorske stanice, no to ovisi o broju hidroksilnih skupina.

Klorogenska kiselina ima koleretički učinak, dok ružmarinska ima protuupalno djelovanje (Maleš i sur., 2008).

Klorogenska kiselina djeluje i kao antidijabetik; inhibicijom  $\alpha$ -glukozidaze, stimulira sekreciju inzulina te smanjuje toleranciju na glukozu i time snižava postprandijalnu koncentraciju glukoze u krvi. Također djeluje kao hipolipemik, inhibicijom HMG-CoA reduktaze, te time dovodi do hepatoprotektivnog, ateroskleroprotektivnog i kardioprotektivnog djelovanja. Nadalje, posjeduje antioksidativni, antibakterijski, antihipertenzivni i antitumorski učinak.

Ružmarinska kiselina posjeduje brojne farmakološke učinke, poput antibakterijskog, antioksidativnog i antitumorskog. Inhibicija enzima lipooksigenaze i ciklooksigenaze te blokada aktivacije komplemenata odgovorne su za protuupalni učinak.

Ferulična kiselina primjenjuje se u kozmetici zbog zaštitnog učinka od UV-zračenja, a koristi se i kao konzervans u prehrambenoj industriji (Meng i sur., 2013).

### **1.3.3. Trjeslovine**

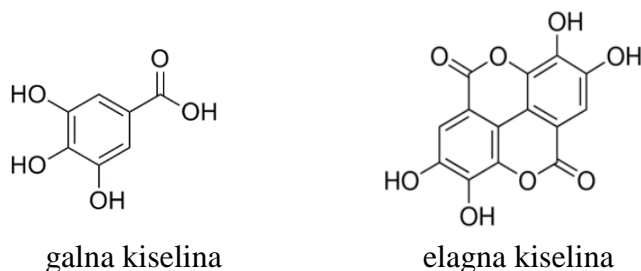
#### *Strukturne značajke trjeslovina*

Trjeslovine su skupina fenolnih spojeva koji su značajan produkt sekundarnog metabolizma biljaka. Prema kemijskoj strukturi to su derivati fenola i fenilkarboksilnih kiselina, a mogu se podijeliti u dvije glavne skupine:

1. Trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini, elegtanini);
2. Kondenzirane trjeslovine (katehinske trjeslovine) (Wagner, 1993).

### Trjeslovine koje hidroliziraju

Ova skupina trjeslovina sastoji se od molekula fenolnih kiselina (galne ili elagne kiseline) esterskom vezom povezanih na središnju molekulu šećera, najčešće glukoze. Iz samog naziva vidljivo je da su to spojevi topljivi u vodi djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima poput tanaze. Ovisno o produktu hidrolize, odnosno o fenolnoj kiselini koja nastaje, dalje se dijele na galotanine (sastavljeni od galne kiselina) ili elegtanine (sadrže elagnu kiselinu) (Vladimir-Knežević, 2008).

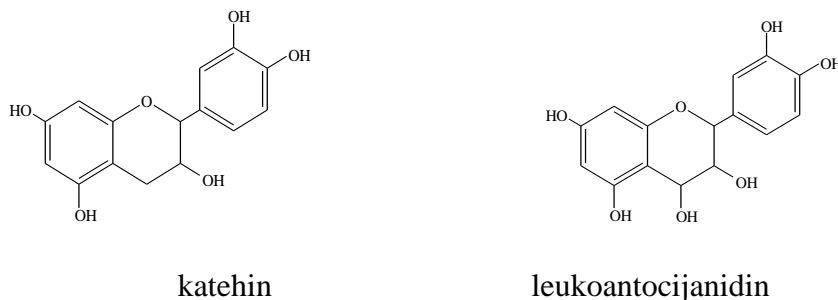


**Slika 9.** Kemijske strukture galne i elagne kiseline.

### Kondenzirane trjeslovine

Katehinske trjeslovine nazivaju se još i proantocijanidini jer daju antocijanidinske pigmente nakon oksidativnog cijepanja u vrućem alkoholu. Kondenzirani su proizvodi katehina koji sadrže flavan-3-ol i leukoantocijanidina s flavan-3,4-diolnom strukturom. U slabo kiselom mediju staničnog soka, enzimskim ili neenzimskim putem odvija se polimerizacija leukoantocijanidina ili katehina te nastaju katehinske trjeslovine, visokomolekularni spojevi topljivi u vodi. No, tijekom skladištenja jedan dio katehinskih trjeslovina kondenzacijom prelazi u netopljivi crveni produkt, flobafen (Jurišić, 2003).

Osnovni strukturni element kondenziranih trjeslovina kao polimernih spojeva je flavan-3-ol: katehin i epikatehin, galokatehin i epigalokatehin te fisetidin. Iz njih nastaju oligomeri i polimeri koji mogu imati i 50 monomernih jedinica (Vladimir-Knežević, 2008).



**Slika 10.** Struktura katehina i leukoantocijanidina.

### *Biološki učinici trjeslovina*

Trjeslovine su nereavnomjerno raspoređene u biljci, najviše ih ima kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi te plodovi. Najbogatije trjeslovinama su patološke tvorevine na listu nazvane Gallae ili šiške koje su nastale razvojem ličinke ose (na azijskom hrastu) ili vrste biljnih uši (na kineskom ruju) (Vladimir-Knežević, 2008).

Količina tanina varira u biljci, ovisno o različitim okolišnim i sezonskim klimatskim čimbenicima. Na produkciju i povećan udio tanina u biljci pogodno utječe suša, visoke temperature, svjetlost i slaba kvaliteta zemlje. Faza rasta biljke utječe na sezonsku varijabilnost sadržaja te je najintenzivnija sinteza tanina u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen rast te su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalođera, 2010).

Nije potpuno razjašnjeno fiziološko značenje trjeslovina. U prošlosti se smatralo da njihov gorak okus štiti biljku od štetočina, što se pokazalo netočnim. Pretpostavljalo se da su pričuvne tvari, no ne nalaze se u biljnim dijelovima koje služe kao spremnici pričuvnih tvari. No, poznato je da sudjeluju u tvarnoj izmjeni stvaranjem redoks sustava i da mogu zaštitno djelovati na neke heterozide (npr. arbutin) zbog svojstva inhibicije  $\beta$ -glukozidaze (Jurišić, 2003).

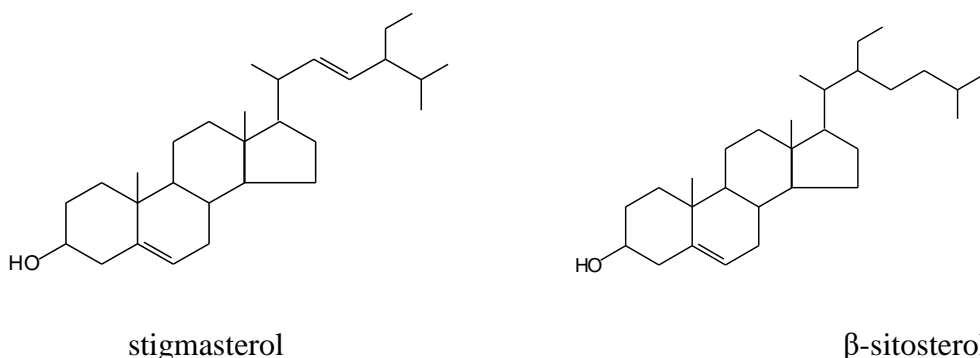
Kako s proteinima stvaraju netopljive soli ili teško topljive adicijske spojeve, te mogu same po sebi biti djelatne tvari ili djelovati sinergistički s drugima aktivnim tvarima pri čemu utječu na terapijski učinak glavne aktivne sastavnice, trjeslovine imaju široku primjenu u terapiji kao i kožarskoj industriji. Antimikrobno i antifungalno djeluju zbog precipitacije proteina. Adstringentni učinak zasniva se na činjenici da su trjeslovine sposobne tvoriti koagulacijske membrane na sluznicama i ranama, odnosno stvarati nepropustan sloj koji omogućuje da se ispod njega nesmetano odvija cijeljenje, te tako imaju eksternu primjenu u terapiji upale usne šupljine i ždrijela (angina, gingivitis, stomatitis), manjih opekline i ozeblina te hemoroida. Interno se kao adstringensi primjenjuju kod crijevnog i želučanog katara, hiperaciditetnog gastritisa te kod proljeva kao antidijaroici (Kalođera, 2010). Trjeslovine se koriste i kao antidoti, npr. kod trovanja crnom kavom, zbog sposobnost da s alkalodima i solima teških metala stvaraju talog (Jurišić, 2003).



### 1.3.4. Steroli

#### *Strukturne značajke sterola*

Poznati i kao steroidni alkoholi, pripadaju u steroidnu grupu organskih molekula koji nastaju od ugljikovodika sterana (ciklopentanoperhidrofenantrena,  $C_{17}H_{22}$ ). Nalaze se na membranama biljaka, životinja i mikroorganizama te redom imaju nazive fitosteroli, zoosteroli i mikosteroli. Najbitniji sterol animalnog podrijetla je kolesterol koji održava funkciju i strukturu stanične membrane te je bitan prekursor za steroidne hormone i vitamine topljive u mastima. Tri glavna predstavnika fitosterola su kampesterol te strukturno vrlo slični stigmasterol i  $\beta$ -sitosterol. Fitosteroli se mogu izolirati iz ulja različitih sjemenaka (pamučnih, kukuruznih, pšeničnih, ražovih i dr.) (Gordon, 2003). Struktura je formirana od grupe triterpena s tetracikličkom ciklopentanoperhidrofenantrenskom strukturom s postraničnim lancem na C-17. Četiri prstena A, B, C i D imaju trans konfiguraciju i dvije metilne skupine na C-18 i C-19 te karakterističnu hidroksilnu skupinu na C-3. Nezasićena dvostruka veza nalazi se između C-5 i C-6 atoma na prstenu B.



**Slika 11.** Sitosteroli.

#### *Biološki učinici sterola*

Kod benigne hiperplazije prostate koja ometa mokrenje, povećava učestalost i nagon ili izaziva probleme s pražnjenjem mjehura, koriste se konvencionalni lijekovi ili se poduzima kirurški zahvat. No, sve je češća primjena biljnih pripravaka u tu svrhu, iako nije u potpunosti poznato u kojoj su mjeri zapravo učinkoviti. Dokazano je da primjena  $\beta$ -sitosterola uzrokuje poboljšanje mokraćnih simptoma i protoka urina kod muškaraca s blagom do umjerenom benignom hiperplazijom prostate (Wilt, 1999).

Još nije u potpunosti upoznata uloga sterola u biljkama, no i dalje se provode istraživanja kako bi se dokazali potencijalni biološki učinci. S druge strane, poznata je uloga animalnih sterola u metabolizmu provitamina D, hormona, koenzima i žučnih kiselina.

Sitosteroli imaju hipokolesterolemički učinak, smanjujući razinu kolesterola koja ulazi u tijelo i može se koristiti u liječenju ateroskleroze. Natječu se s kolesterolom za apsorpcijska mjesta u probavnom traktu, čime se smanjuje razina  $\beta$ -lipoproteina u krvi, što sprječava nakupljanje aterosklerotičnog plaka u krvnim žilama (Jurišić, 1998). U hrani se dodaje kod pripreme margarina kako bi snizio razine kolesterola i pomogao u prevenciji srčanih oboljenja. FDA (Food and Drug Administration, SAD) dopušta da proizvođač označi da upotrebom sitosterola njegov proizvod služi u prevenciji koronarnih bolesti srca. Iako je dokazano da snižavaju razine kolesterola u krvi, nije poznat dugoročni učinak takvih proizvoda u prevenciji koronarnih bolesti srca (Law, 2000).

### 1.3.5. Triterpeni

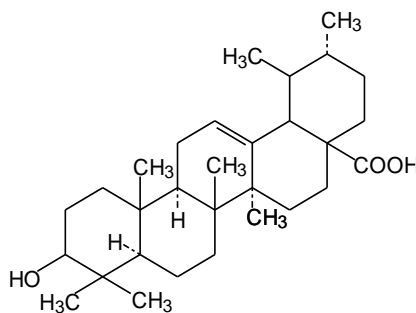
#### *Strukturne značajke triterpena*

Triterpeni pripadaju velikoj skupini prirodnih spojeva koje nazivamo terpenima. Naziv su dobili zbog izolacije iz terpentina, hlapljive tekućine iz borova drveta. Sve prirodne spojeve sa strukturom izoprena (2-metil-butadiena,  $C_5H_8$ ) ili njegovih polimera ubrajamo u terpene čija je struktura alifatska ili ciklička. Prema broju izoprenskih jedinica, mogu se svrstati u sedam skupina: semiterpeni ( $C_5$ ), monoterpeni ( $C_{10}$ ), seskviterpeni ( $C_{15}$ ), diterpeni ( $C_{20}$ ), triterpeni ( $C_{30}$ ), tetraterpeni ( $C_{40}$ ) i politerpeni ( $C_n$ ). Semiterpen je izopentenil pirofosfat, iz kojega biosintezom nastaju terpenske tvari. Triterpeni pentacikličke strukture su najvažniji, među koje spadaju i triterpenske kiseline, primjerice oleanolna i ursolna kiselina (Slika 12) (Jurišić, 2003).

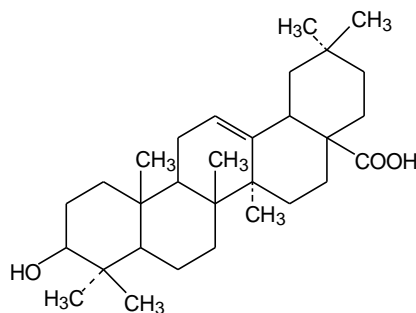
#### *Biološki učinici triterpena*

Triterpeni iz biljnih izvora mogu također izazvati toksične reakcije kod ljudi i ostalih sisavaca, no koriste se zbog svog anthelmintičkog, antiviralnog, antineoplastičkog i antiprotozoalnog djelovanja. Ursolna kiselina se rijetko javlja bez svog izomera, oleanolne kiselina, s kojom dijeli sličnu farmakološku aktivnost. Nazivi koji se koriste još za ursolnu kiselinu su urson, prunol, mikromerol ili malol. Utvrđena je medicinska djelotvornost njihove interne i topičke primjene: antitumorska (posebice na koži), hepatoprotektivna,

protuupalna (oralna i topička), antiulkusna, antimikrobna, antihiperlipemička i antiviralna. Ursolna i oleanolna kiselina također potiču rast kose i djeluju kao agensi protiv starenja kože (Jurišić, 2003).



ursolna kiselina



oleanolna kiselina

**Slika 12.** Strukture ursolne i oleanolne kiseline.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj je ovoga diplomskog rada kvalitativna fitokemijska karakterizacija lista i ploda biljne vrste *Arbutus unedo* L. (obična planika, maginja) prikupljenih 2014. i 2015. godine na području Malog Lošinja te na otoku Koločepu.

Na temelju dobivenih rezultata, može se usporediti varijabilnost sastava određenih bioaktivnih komponenata između dva ispitana biljna dijela te s obzirom na mjesto prikupljanja i vegetacijski period.

Kvalitativna analiza polifenola i trjeslovina provedena je općim reakcijama stvaranja boje i taloga. Dodatno je ispitana razlika među biljnim uzorcima s obzirom na prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju i kondenziranih trjeslovina. Kvalitativna analiza flavonoida, sterola i triterpenskih kiselina te triterpena ispitana je primjenom prikladnih metoda tankoslojne kromatografije.

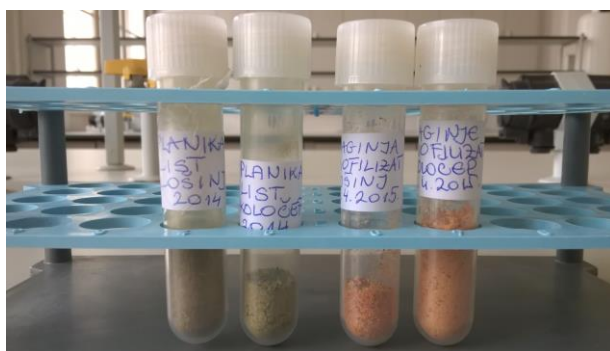
Svrha fitokemijske karakterizacije provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima vrste vrste *Arbutus unedo* L., a dobiveni rezultati mogu poslužiti kao osnova daljnjih istraživanja sadržaja farmakološki aktivnih komponenata te biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala biljnih pripravaka obične planike.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

Istraživanju su podvrgnuti na zraku osušeni listovi vrste *Arbutus unedo* L. prikupljeni 2014. godine na otoku Lošinju (područje Malog Lošinja) i na otoku Koločepu te plodovi maginje prikupljeni u srpnju 2015. godine na oba spomenuta lokaliteta. Prije analize, listovi obične planike pulverizirani su u mlinu za mljevenje biljnih droga, a plodovi liofilizirani.

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



Slika 13. Ispitivani biljni materijal.

#### 3.2. Aparatura i kemikalije

##### Aparati i pribor:

- TLC ploče s tankim slojem Kieselgela 60 F<sub>254</sub> i Kieselgur 60 F<sub>254</sub>;
- ultraljubičasta lampa za detekciju (Camag, Muttenez);
- kromatografske komore;
- lijevci za odjeljivanje;
- kalibrirane kapilare;
- epruvete, čaše, menzure, pipete, propipete, lijevci, kapaljke, filter papir, stakleni štapić;
- plamenik, tronožac, keramička mrežica, stalak, kleme;
- povratna hladila;

- tikvice s okruglim dnom i odmjerne tikvice.

Reagensi i standardi:

- acetanhidrid (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- aceton (Claro-Prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska);
- anisaldehyd (Fluka, Buchs, Švicarska);
- diklormetan (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- etanol (Carlo Erba, Francuska);
- etil acetat (Carlo Erba, Francuska );
- formaldehyd (Carlo Erba, Francuska);
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb);
- klorovodična kiselina, konc. (Kemika, Zagreb);
- kloroform (Carlo Erba, Francuska);
- metanol (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska);
- mravlja kiselina (TTT, Sveta Nedjelja);
- natrijev acetat trihidrat (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- NST (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- octena kiselina, led. (Panreac, Barcelona, Španjolska);
- olovov acetat (Kemika, Zagreb);
- polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- standardne tvari: kvercetin, rutin, kvervitrin, izokvercitrin, naringin, naringenin, ursolna kiselina, oleanolna kiselina, ferulična, kavena, klorogenska i ružmarinska kiselina (Roth, Karlsruhe, Njemačka),  $\beta$ -sitosterol (Fluka, Buchs), stigmasterol (Fluka, Buchs);
- sulfatna kiselina, konc. (Kemika, Zagreb);
- toluen (Alkaloid, Skopje);
- vanilin (Kemika, Zagreb);
- želatina (Sigma-Aldrich, Njemačka);
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje);
- željezov(III) klorid (Sigma-Aldrich, Njemačka)

### 3.3. Metode i postupci istraživanja

#### 3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola

*Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranje boja i taloga*

##### Priprava ekstrakta

Po 0,1 g oba ispitivana uzorka lista i ploda maginje pojedinačno se ekstrahira s 3 mL metanola 10 minuta na vodenoj kupelji (60 °C)

##### Opće reakcije

Reakcija promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge.

#### 3.3.2. Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina

*Tankoslojna kromatografija (TLC) flavonoida*

Biljni su uzorci pripremljeni pojedinačnom ekstrakcijom 0,2 g praškaste droge s 3 mL metanola, tijekom 10 min na vodenoj kupelji zagrijanoj na 60 °C. Usporedno ispitivanje prisutnosti flavonoida provodi se na tankom sloju Kieselgela 60 F<sub>254</sub> i Kieselgur 60 F<sub>254</sub> u dvije mobilne faze različitih sastava i omjera. Prva mobilna faza sastavljena je od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V). Druga mobilna faza sastavljena je od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami se promatraju pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i sur., 1983). Naturstoff-reagens se pripremi otapanjem 1 g β-etilaminoestera difenilborne kiseline u 100 mL metanola.

Za dobivanje referentnih kromatograma pripremljene su metanolne otopine (1 mg/mL) standarda flavonoida: kvercetin, rutina, kvercitrin, izokvercitrin i naringenin te metanolne standardne otopine fenolnih kiselina: ferulična, kavena, klorogenska i ružmarinska kiselina.

### **3.3.3. Kvalitativna analiza trjeslovina**

*Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga*

#### Priprava ekstrakta

Po 0,2 g oba uzorka lista i ploda pojedinačno se ekstrahira 10 minuta s 20 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakti se profiltriraju.

#### Opće reakcije

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

#### Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

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

#### Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

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

### **3.3.4. Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina**

#### Opća reakcija sterola

Steroli daju pozitivnu Liebermann-Burchardovu reakciju: nekoliko mg supstancije otopi se, uz blago zagrijavanje, u 0,5 mL acetanhidrida i doda jedna kap koncentrirane sulfatne kiseline. Pozitivnu reakciju predstavlja nastanak zelenog obojenja.



### Priprava metanolnih ekstrakata

2 g praškaste droge u tikvici se prelije s 15 mL metanola i ekstrahira 15 min na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt se profiltrira i upari do suha. Suhi ostatak se otopi u 2 mL smjese kloroforma i metanola (1:1, V/V).

#### *Tankoslojna kromatografija (TLC) sterola i triterpenskkih kiselina*

Pripremljeni metanolni ekstrakti točkasto su naneseni (po 5  $\mu$ L) na gotove ploče veličine 20×20 cm (adsorbens Kieselgela 60 F<sub>254</sub>) i razvijeni u sistemu otapala toluen-aceton (9:1, V/V). Po završetku odjeljivanja, osušene kromatografske ploče prskane su reagensom anisaldehyd – sulfatna kiselina. Reagens za detekciju pripremljen je miješanjem 0,5 mL anisaldehyda s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL koncentrirane sulfatne kiseline, točno tim redoslijedom. Nakon prskanja reagensom, kromatografske ploče zagrijavaju se nekoliko minuta na 105 °C do pojave karakterističnih obojenih mrlja odijeljenih supstancija. Kao poredbene tvari primijenjene su otopine  $\beta$ -sitosterola, stigmasterola te ursolna i oleanolna kiselina (Wagner i sur., 1983).

### **3.3.5. Kvalitativna analiza triterpena**

Metanolni ekstrakti pripreme se pojedinačnim ekstrakcijama s po 1 g pulveriziranih listova, odnosno plodova, s 10 mL 70%-tnog metanola, na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo, u trajanju od 30 minuta. Bistri filtrati upare se do suha, a ostatak otopi u malo metanola.

Po 20  $\mu$ L metanolne otopine nanese se na tanki sloj adsorbensa Kieselgela 60 F<sub>254</sub>. Odjeljivanje supstancija postiže se pomoću razvijaa diklormetan – etil-acetat (9:1; V/V), a njihova detekcija provodi se prskanjem kromatograma reagensom anisaldehyd – sulfatna kiselina i zagrijavanjem na 105 °C. Reagens za detekciju (Wagner i sur., 1983) pripremi se prema propisu opisanom u poglavlju 3.3.4.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola

*Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranje obojenja i taloga*

Dodatkom natrijevog hidroksida u metanolni ekstrakt ispitivanog biljnog uzorka, u epruveti je nastalo narančastosmeđe obojenje.

U reakciji na polifenole u ekstraktu ploda maginje s područja Malog Lošinja nastalo je narančasto obojenje jačeg intenziteta nego u reakciji s ekstraktom ploda obične planike s otoka Koločepa. Jači intenzitet ukazuje na veći sadržaj polifenolnih tvari u ekstraktu ploda s otoka Lošinja.



**Slika 14.** Plod (Mali Lošinj).



**Slika 15.** Plod (Koločep).

Ispitivanjem polifenola u ekstraktima listova obične planike s oba ispitana lokaliteta, dobivena su tamnozeleno obojenja približno istog intenziteta, što ukazuje na približno jednak udio polifenolnih tvari u oba uzorka.



**Slika 16.** List (Mali Lošinj).



**Slika 17.** List (Koločep).

## 4.2. Rezultati kvalitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina

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

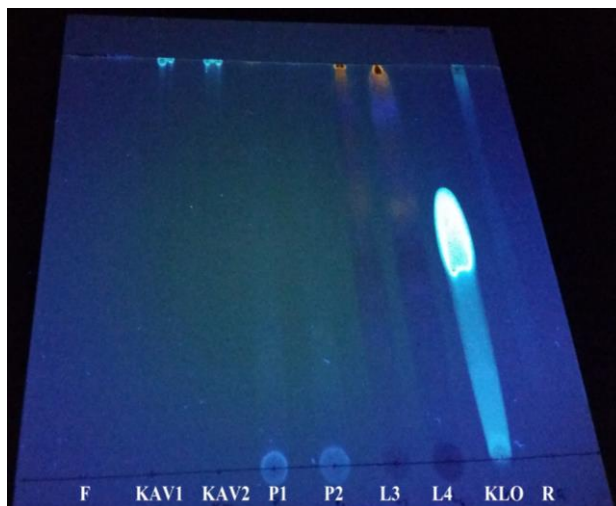
Provedena je usporedna analiza primjenom dvije stacionarne faze, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> i Kieselgur 60 F<sub>254</sub>, na koje su nanoseni metanolni ekstrakti droge te standardne otopine flavonoida (rutin, kvercitrin, izokvercitrin, kvercetin, naringenin) i fenolnih kiselina (ferulična, kavena, klorogenska i ružmarinska kiselina). Kao mobilne faze, korištene su dvije različite smjese otapala, **razvijatelj 1**: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i **razvijatelj 2**: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Obje ploče prskane su Naturstoff-reagensom i 5%-tnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG) te su potom kromatogrami promatrani pod UV svjetlom valne duljine 365 nm (Wagner i sur., 1983).

Na kromatogramima su uočene žute i narančaste fluorescirajuće zone karakteristične za flavonoide te plavozelene fluorescirajuće zone karakteristične za fenolne kiseline i/ili iridoidne tvari.

Žute i narančaste mrlje na vrhu kromatograma obilježja su nepolarnih flavonoidnih tvari i pripadaju aglikonima naringeninu, odnosno kvercetinu.

**Rezultati TLC s razvijanjem 1: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V) i stacionarnom fazom Kieselgur 60 F<sub>254</sub>**

Na kromatogramu s razvijanjem 1 i nepokretnom fazom Kieselgur 60 F<sub>254</sub>, vidljive su vrlo razvučene mrlje te se ne mogu kvalitetno detektirati kromatografske zone.



**Slika 18.** Kromatogram standardnih otopina fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

Nepokretna faza: Kieselgur 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

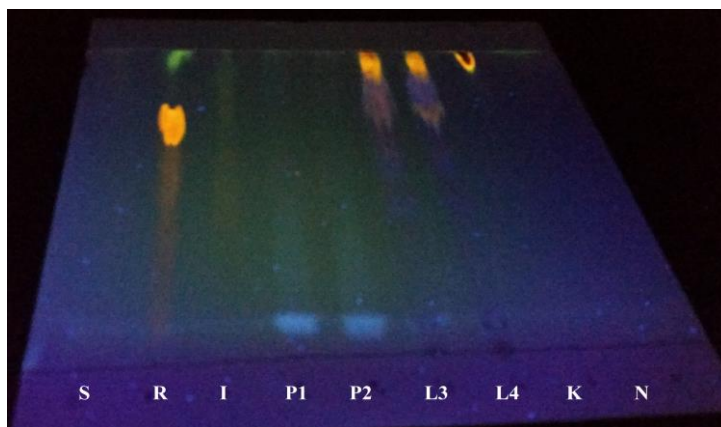
Pokretna faza: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **F**-ferulična kiselina, **KAV1**-kavena kiselina, **KAV2**-kavena kiselina, **P1**-plod Mali Lošinj, **P2**-plod Koločep, **L3**-list Mali Lošinj, **L4**-list Koločep, **KLO**-klorogenska kiselina, **R**-ružmarinska kiselina

**Rezultati TLC s razvijanjem 2: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i stacionarnom fazom Kieselgur 60 F<sub>254</sub>**

Iako je korištena druga mobilna faza, odjeljivanje uzorka nije bilo zadovoljavajuće. Budući da je korištena smjesa etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V), a ista stacionarna faza, zaključuje se da Kieselgur 60 F<sub>254</sub> nije prikladan za navedenu svrhu. Stoga su sva daljnja ispitivanja provedena na stacionarnoj fazi Kieselgel 60 F<sub>254</sub>.



**Slika 19.** Kromatogram standardnih otopina flavonoida te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

Nepokretna faza: Kieselgur 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

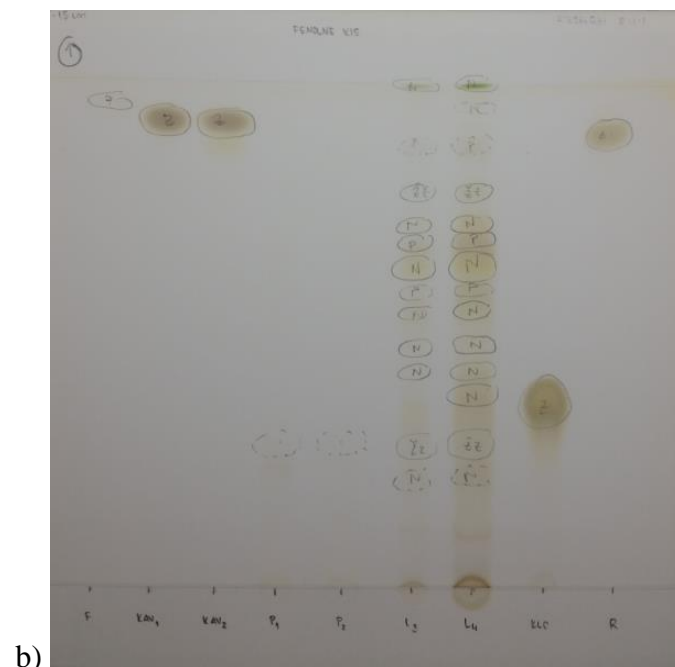
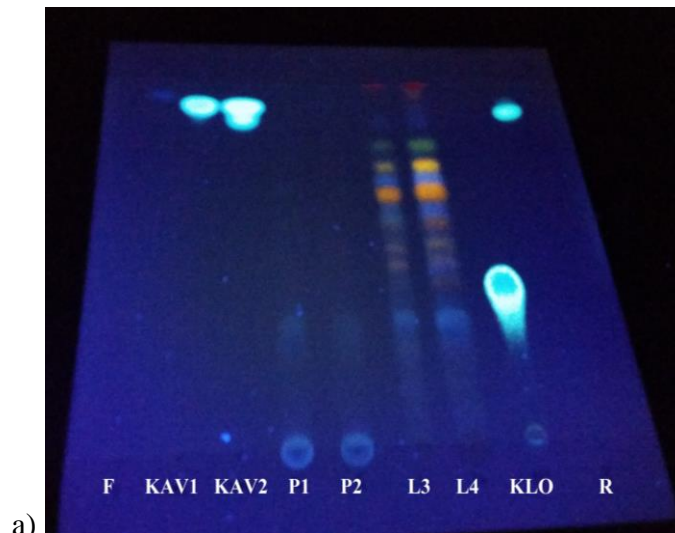
Pokretna faza etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **S**-smjesa rutina, kvervitrina, izokvercitrina, **R**-rutin, **I**-izokvercitrin, **P1**-plod Mali Lošinj, **P2**-plod Koločep, **L3**-list Mali Lošinj, **L4**-list Koločep, **K**-kvercetin, **N**-naringenin

**Rezultati TLC s razvijačem 1: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V) i stacionarnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub>**

Na kromatogramu s razvijačem 1 i nepokretnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub> vidljive su dobro odijeljene kromatografske zone. Plodovi imaju samo 1 kromatografsku zonu vrlo slabog intenziteta, svijetloplave fluorescencije, dok su listovi podijeljeni u 12 kromatografskih zona (područje Malog Lošinja) i 14 kromatografskih zona (područje Koločepa), različite žute, narančaste, plave i zelene fluorescencije. Standardne otopine ferulične, kavene i ružmarinske kiseline pokazuju plavu (ferulična), odnosno zelene fluorescencije (ostale standardne fenolne kiseline).



**Slika 20a i 20b.** Kromatogram standardnih otopina fenolnih kiselina te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

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

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

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **F**-ferulična kiselina, **KAV1**-kavena kiselina, **KAV2**-kavena kiselina, **P1**-plod Mali Lošinj, **P2**-plod Koločep, **L3**-list Mali Lošinj, **L4**-list Koločep, **KLO**-klorogenska kiselina, **R**-ružmarinska kiselina

*R<sub>f</sub>* vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom slučaju, b iznosi 15 cm.

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

UZORCI		F	KAV 1	KAV 2	P1	P2	L3	L4	KLO	R
ZONE										
1	a	-	-	-	-	-	3,20	3,40	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,21	0,23	-	-
2	a	-	-	-	4,30	4,30	4,20	4,20	-	-
	$R_f$	-	-	-	0,29	0,29	0,28	0,28	-	-
3	a	-	-	-	-	-	-	5,80	5,50	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	-	0,39	0,36	-
4	a	-	-	-	-	-	6,50	6,40	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,43	0,43	-	-
5	a	-	-	-	-	-	7,10	7,10	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,47	0,47	-	-
6	a	-	-	-	-	-	8,20	8,30	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,55	0,55	-	-
7	a	-	-	-	-	-	8,80	8,80	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,59	0,59	-	-
8	a	-	-	-	-	-	9,50	9,50	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,63	0,63	-	-
9	a	-	-	-	-	-	10,30	10,30	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,69	0,69	-	-
10	a	-	-	-	-	-	10,80	10,80	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,72	0,72	-	-
11	a	-	-	-	-	-	11,80	11,80	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,79	0,79	-	-
12	a	-	-	-	-	-	13,20	13,20	-	13,50
	$R_f$	-	-	-	-	-	0,88	0,88	-	0,90
13	a	-	14,00	13,90	-	-	-	14,30	-	-
	$R_f$	-	0,93	0,93	-	-	-	0,95	-	-
14	a	14,4	-	-	-	-	14,90	14,90	-	-
	$R_f$	0,96	-	-	-	-	0,99	0,99	-	-

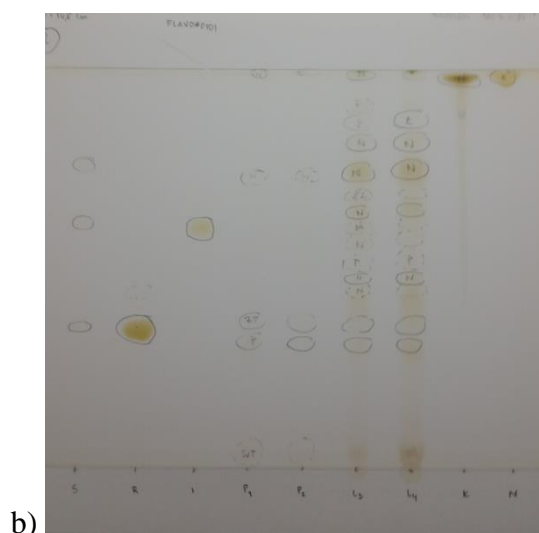
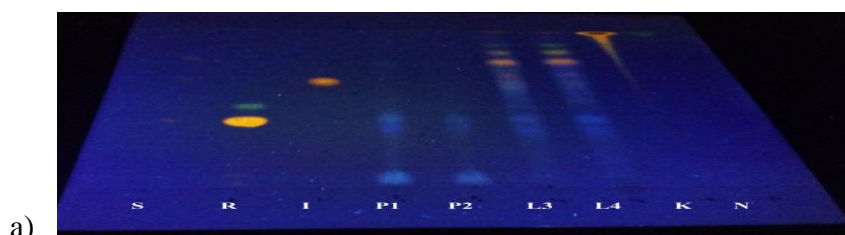
Temeljem položaja kromatografskih zona uzoraka i standarda te usporedbe izračunatih  $R_f$  vrijednosti, moguće je zaključiti sljedeće: najveći intenzitet razvijenih kromatografskih zona uočen je za uzorak lista s područja Koločepa (L4). Mrlje koje odgovaraju  $R_f$  vrijednostima standardnih otopina ferulične, kavene i ružmarinske kiseline podudaraju se s narančastim mrljama kvercetinog aglikona; to su nepolarni spojevi koji visoko putuju u primijenjenom razvijaju te je moguće međusobno prekrivanje plavozelenih (ferulična, ružmarinska i kavena kiselina) i narančastih mrlja (kvercetin). Zona klorogenske kiseline je plave boje, no  $R_f$  vrijednosti koje odgovaraju klorogenskoj kiselini uočene su kao svijetlonarančaste mrlje, stoga nije moguće sa sigurnošću potvrditi prisutnost spomenute fenolne kiseline u uzorcima



lista obične planike jer je moguće da su narančaste zone flavonoida prekrile plavkastu klorogensku kiselinu.

**Rezultati TLC s razvijanjem 2: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i stacionarnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub>**

Na kromatogramu promatranom pod UV-365 nm, s razvijanjem 2: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V), razvile su se različite kromatografske zone. Plodovi imaju 5 kromatografskih mrlja vrlo slabog intenziteta fluorescencije; prisutne su 3 plave i 2 narančaste zone. Kod listova s područja Malog Lošinja prisutno je 14 kromatografskih zona, i to 4 plave, 7 narančastih i 3 zone zelene fluorescencije. Kod uzorka lista s otoka Koločepa razvilo se 13 kromatografskih zona; 3 plave, 7 narančastih i 3 zone zelene fluorescencije. Standardne otopine rutina, izokvercitrina, kvercetina i naringenina razvijene su kao visoko putujuće zone narančaste (kvercetin) ili žute (naringenin) fluorescencije, te 3 polarnije zone narančastih fluorescencija (ostali standardni flavonoidi).



**Slika 21a i 21b.** Kromatogram standardnih otopina flavonoida te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

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

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

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Uzorci: **S**-smjesa rutina, kvervitrina, izokvercitrina, **R**-rutin, **I**-izokvercitrin, **P1**-plod Mali Lošinj, **P2**-plod Koločep, **L3**-list Mali Lošinj, **L4**-list Koločep, **K**-kvercetin, **N**-naringenin

R<sub>f</sub> vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom slučaju, b iznosi 14,8 cm.

**Tablica 3.** Prikaz kromatografskih zona (a) i pripadajućih R<sub>f</sub> vrijednosti za TLC sustav s razvijanjem 2 (etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda, 100:11:11:27, V/V) i stacionarnom fazom Kieselgel 60 F<sub>254</sub>.

UZORCI		S	R	I	P1	P2	L3	L4	K	N
ZONE										
1	a	-	-	-	0,50	0,60	-	-	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	0,03	0,04	-	-	-	-
2	a	-	-	-	4,70	4,60	4,60	4,60	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	0,32	0,31	0,31	0,31	-	-
3	a	5,20	5,30	-	5,50	5,40	5,30	5,30	-	-
	R <sub>f</sub>	0,35	0,36	-	0,37	0,37	0,36	0,36	-	-
4	a	-	6,50	-	-	-	6,60	6,60	-	-
	R <sub>f</sub>	-	0,44	-	-	-	0,45	0,45	-	-
5	a	-	-	-	-	-	7,10	7,10	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,48	0,48	-	-
6	a	-	-	-	-	-	7,60	7,60	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,51	0,51	-	-
7	a	-	-	-	-	-	8,50	8,50	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,58	0,58	-	-
8	a	9,10	-	8,90	-	-	9,00	9,00	-	-
	R <sub>f</sub>	0,62	-	0,60	-	-	0,61	0,61	-	-
9	a	-	-	-	-	-	9,60	9,60	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,65	0,65	-	-
10	a	-	-	-	-	-	10,20	10,2	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,69	0,69	-	-
11	a	11,20	-	-	10,80	10,80	11,10	11,10	-	-
	R <sub>f</sub>	0,76	-	-	0,73	0,73	0,75	0,75	-	-
12	a	-	-	-	-	-	12,30	12,30	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,83	0,83	-	-
13	a	-	-	-	-	-	13,00	13,00	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,88	0,88	-	-
14	a	-	-	-	-	-	13,10	-	-	-
	R <sub>f</sub>	-	-	-	-	-	0,89	-	-	-
15	a	-	-	-	14,70	14,70	14,70	14,70	14,60	14,70
	R <sub>f</sub>	-	-	-	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99

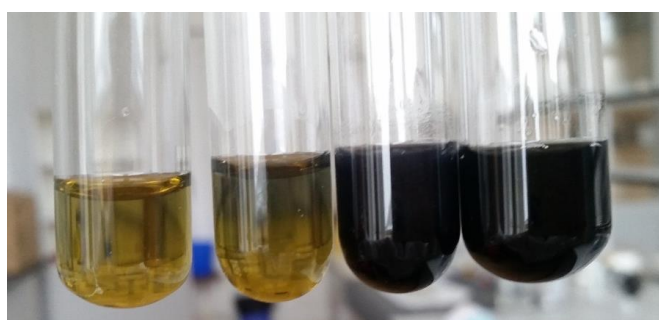
Na temelju položaja kromatografskih zona uzoraka i standarda te usporedbe izračunatih  $R_f$  vrijednosti (Tablica 3), moguće je zaključiti sljedeće: kao nepolarni aglikoni, najdalje putuju kvercetin (narančasta fluorescencije) i naringenin (žuta zona fluorescencije). Uočena je narančasta fluorescencija najvećeg intenziteta u listovima s podjednakim intenzitetom za oba lokaliteta. Kako je moguće da je došlo do prekrivanja žute fluorescencije naringenina, ne može se sa sigurnošću tvrditi njegova prisutnost/odsutnost. Rutin kao standardni flavonoid pokazuje intenzivnu narančasto obojenu kromatografsku zonu, dok je u uzorcima listova ta zona plave fluorescencije, vjerojatno zbog interferencije plavih zona fenolnih kiselina, te se ne može dokazati da se rutin nalazi u ispitivanim biljnim uzorcima. Prisutnost izokvercitrina može se potvrditi, i po  $R_f$  vrijednostima, i po narančasto obojenoj kromatografskoj zoni u oba uzorka lista.

### 4.3. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

#### 4.3.1. Rezultati dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

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

Dodatkom 5%-tne otopine željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge nastaje zelenoplavo obojenje različitog intenziteta, ovisno o području prikupljanja obične planike (Slika 22, Tablica 4).



**Slika 22.** Intenzitet obojenja u 1. reakciji dokazivanja trjeslovina.

U 1. epruveti ispitan je plod s područja Malog Lošinja; prisutno je svijetlozeleno obojenje.

U 2. epruveti ispitan je plod s područja Koločepa; prisutno je tamnije zeleno obojenje.

U 3. epruveti ispitan je uzorak lista s područja Malog Lošinja; uočeno je tamnozeleno do crno obojenje.

U 4. epruveti ispitan je uzorak lista s područja Koločepa; uočen je isti intenzitet obojenja kao i kod lista s područja Malog Lošinja.

**Tablica 4.** Intenzitet obojenja za 1. reakciju dokazivanja trjeslovina.

DIO BILJKE	INENZITET OBOJENJA
plod (Mali Lošinj)	+
plod (Koločep)	++
list (Mali Lošinj)	+++
list (Koločep)	+++

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

Reakcijom trjeslovina sa željezovim(III) amonijevim sulfatom nastaje zelenoplavo obojenje najvećeg intenziteta kod ekstrakta listova vrste *Arbutus unedo* s područja Malog Lošinja i Koločepa (Tablica 5, Slika 23).

**Tablica 5.** Intenzitet obojenja za 2. reakciju dokazivanja trjeslovina.

DIO BILJKE	INENZITET OBOJENJA
plod (Mali Lošinj)	+
plod (Koločep)	++
list (Mali Lošinj)	+++
list (Koločep)	+++



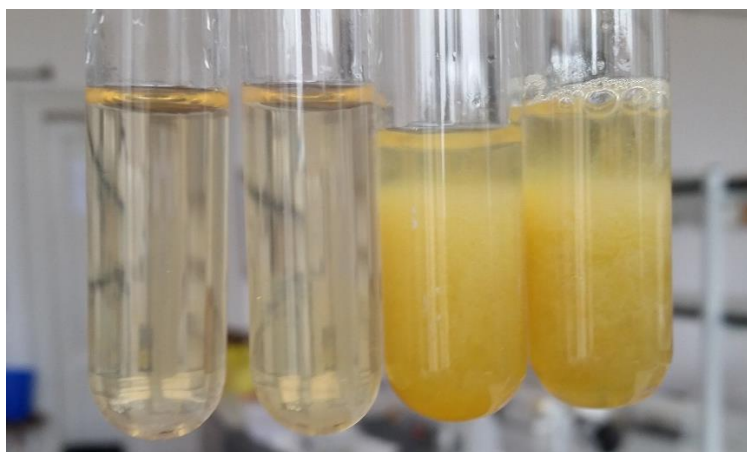
**Slika 23.** Intenzitet obojenja za 2. reakciju dokazivanja trjeslovina.

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

Trjeslovine s olovovim acetatom stvaraju pahuljasto zamućenje narančaste boje koje je većeg intenziteta kod ekstrakata lista te nema razlike u intenzitetu s obzirom na područje skupljanja, dok je kod ekstrakata ploda maginje s oba lokaliteta uočeno svijetložuto obojenje (Tablica 6, Slika 24).

**Tablica 6.** Intenzitet obojenja za 3. reakciju dokazivanja trjeslovina.

DIO BILJKE	INENZITET OBOJENJA
plod (Mali Lošinj)	+
plod (Koločep)	+
list (Mali Lošinj)	+++
list (Koločep)	+++



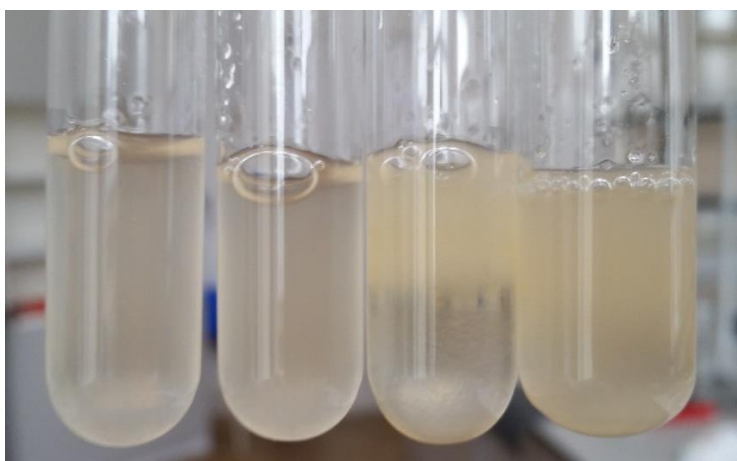
**Slika 24.** Intenzitet obojenja za 3. reakciju dokazivanja trjeslovina.

### 4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

U reakciji s 1%-tnom otopinom želatine nastaje blijedožuto zamućenje, od čega je u ekstraktu oba uzorka lista obične planike intenzivnije obojenje nego u ekstraktima plodova s oba lokaliteta (Tablica 7, Slika 25).

**Tablica 7.** Intenzitet obojenja za 4. reakciju dokazivanja trjeslovina.

DIO BILJKE	INENZITET OBOJENJA
plod (Mali Lošinj)	+
plod (Koločep)	+
list (Mali Lošinj)	+++
list (Koločep)	++



**Slika 25.** Intenzitet obojenja za 4. reakciju dokazivanja trjeslovina.

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

Dodatkom 1%-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt droge nastaju različita obojenja i intenziteti reakcije. Od tamnije ružičaste u 1. epruveti, gdje su plodovi s područja Malog Lošinja, preko svijetloružičastog obojenja u 2. epruveti (plod s lokaliteta Koločep), do svjetlije i tamnije nijanse narančaste u ekstraktima analiziranih uzoraka listova vrste *Arbutus unedo* L. (Tablica 8, Slika 26).

**Tablica 8.** Intenzitet obojenja za 5. reakciju dokazivanja trjeslovina.

DIO BILJKE	INENZITET OBOJENJA
plod (Mali Lošinj)	++
plod (Koločep)	+
list (Mali Lošinj)	++
list (Koločep)	+++



**Slika 26.** Intenzitet obojenja za 5. reakciju dokazivanja trjeslovina.

#### 4.3.2. Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina

Dodatkom formaldehida i klorovodične kiseline nastaje talog netopljiv u otopini kalijeve hidroksida. Na filter papiru zaostaje smeđi talog samo kod ekstrakta listova obične planike kao dokaz prisutnosti kondenziranih trjeslovina (Tablica 9).

**Tablica 9.** Prisutnost taloga kod reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina.

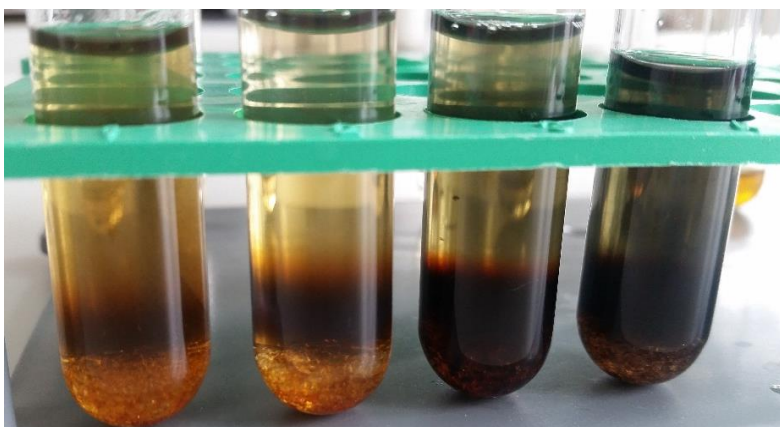
DIO BILJKE	TALOG
plod (Mali Lošinj)	0
plod (Koločep)	0
list (Mali Lošinj)	+
list (Koločep)	+

#### 4.2.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju

U filtratu koji je dobiven reakcijama taloženja kondenziranih trjeslovina, dodatkom 1 g natrijeva acetata trihidrata, bez protresivanja, i 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata, nastaje ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH. Reakcija je intenzivnija za oba ekstrakta lista obične planike, što ukazuje na veći udio ispitivanih tvari u tim biljnim dijelovima (Tablica 10, Slika 27).

**Tablica 10.** Ljubičasti prsten kod reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju.

DIO BILJKE	INENZITET OBOJENJA
plod (Mali Lošinj)	+
plod (Koločep)	++
list (Mali Lošinj)	+++
list (Koločep)	+++



Slika 27. Ljubičasti prsten u reakciji dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju.

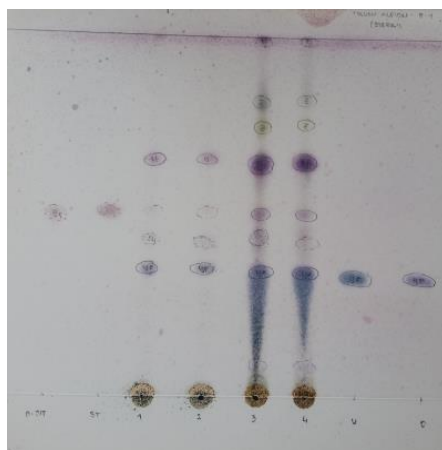
#### 4.4. Rezultati kvalitativne analize sterola i triterpenskih kiselina

##### Rezultati TLC analize s razvijačem 1: toluen – aceton (9:1, V/V)

Metanolni ekstrakti plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L. podvrgnuti su kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, u razvijaču toluen – aceton (9:1, V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provedena je prskanjem kromatograma reagensom anisaldehyd-sulfatna kiselina, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C.

Sastavnice plodova s oba ispitivana lokaliteta razdijeljene su u 4 kromatografske zone ljubičastog obojenja, različitog intenziteta, dok su ekstrakti listova pokazali 8 odijeljenih kromatografskih zona, svijetlo do tamno ljubičastog ili smeđeg obojenja. Standardne otopine  $\beta$ -sitosterola i stigmasterola razvijene su kao svijetloljubičaste zone iste  $R_f$  vrijednosti, dok su triterpenske kiseline, ursolna i oleanolna, ljubičastoplavo obojene, s također istim  $R_f$  vrijednostima. U svim ispitanim ekstraktima vidljiva je intenzivna ljubičastoplavo obojena zona koja bojom i položajem odgovara poredbenim triterpenskim kiselinama, ursolnoj i/ili oleanolnoj kiselini ( $R_f = 0,31$ ). Također je u svim ispitanim uzorcima uočena ljubičastoplavo obojena zona koja odgovara stigmasterolu i/ili  $\beta$ -sitosterolu, s vrlo bliskim  $R_f$  vrijednostima (0,47 i 0,48). Na startnoj su liniji zaostale hidrofilne smeđe zone u sva tri ekstrakta (vjerojatno šećerne komponente) s  $R_f$  vrijednostima 0,07, a najudaljenije od starta ( $R_f = 0,97$  i 0,98) nalaze se najlipoflinije komponente predstavljene kao ljubičaste kromatografske zone blizu fronta koje su uočene samo kod metanolnih ekstrakata listova.





**Slika 28.** Kromatogram standardnih otopina sterola i triterpenskikh kiselina te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

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

Pokretna faza: toluen – aceton (9:1, V/V).

Detekcija: reagens anisaldehyd-sulfatna kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Metanolni biljni ekstrakti: **βST**-β-sitosterol, **ST**-stigmasterol, **1**-plod Mali Lošinj, **2**-plod Koločep, **3**-list Mali Lošinj, **4**-list Koločep, **U**-ursolna kiselina, **O**-oleanolna kiselina

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom slučaju, b iznosi 15,7 cm.

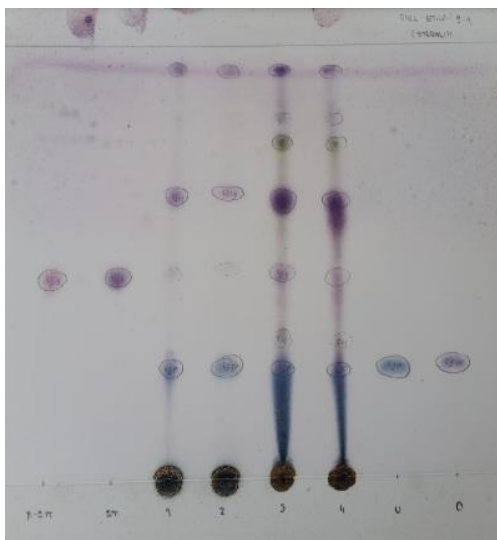
**Tablica 11.** Prikaz kromatografskih vrijednosti (a) i pripadajućih  $R_f$  vrijednosti sterolnih zona za razvijatelj 1: toluen – aceton (9:1, V/V).

UZORAK		βST	ST	1	2	3	4	U	O
ZONE									
1	a	-	-	-	-	1,20	1,20	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,07	0,07	-	-
2	a	-	-	5,20	5,20	5,20	5,00	4,80	4,90
	$R_f$	-	-	0,33	0,33	0,33	0,32	0,31	0,31
3	a	-	-	6,40	6,40	6,50	6,30	-	-
	$R_f$	-	-	0,41	0,41	0,41	0,40	-	-
4	a	7,50	7,60	7,80	7,80	7,70	7,50	-	-
	$R_f$	0,47	0,48	0,50	0,50	0,49	0,47	-	-
5	a	-	-	10,00	10,00	9,80	9,80	-	-
	$R_f$	-	-	0,64	0,64	0,62	0,62	-	-
6	a	-	-	-	-	11,50	11,60	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,73	0,74	-	-
7	a	-	-	-	-	12,70	12,70	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,81	0,81	-	-
8	a	-	-	-	-	15,40	15,30	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,98	0,97	-	-

## Rezultati TLC analize s razvijanjem 2: diklormetan - etilacetat (9:1, V/V)

Metanolni ekstrakti plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L. podvrgnuti su kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, u razvijaju diklormetan – etilacetat (9:1, V/V). Detekcija je provedena prskanjem kromatograma reagensom anisaldehyd-sulfatna kiselina, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C.

Razvoj kromatografske ploče prati isti slijed kao i kod prve mobilne faze (toluen – aceton, 9:1, V/V), jednako je kromatografskih zona razvijeno iz ekstrakata plodova i listova, no putovanje standardnih otopina i metanolnih ekstrakata uzoraka obične planike kod prve mobilne faze ima veći pomak od starta. U prvoj je mobilnoj fazi za 1. odijeljenu kromatografsku zonu ljubičastoplave boje postignut  $R_f = 0,33$ , dok je s drugom mobilnom fazom taj  $R_f$  bio nešto niži (0,24). Osim toga, početna kromatografska zona razvijena prvom mobilnom fazom za ekstrakte listova nije bila vidljiva u kromatografskom razdvajanju s drugim razvijanjem. Nadalje, najlipofilnija zona koja se u razvijaju 1 javlja samo kod listova, ovdje je prisutna i kod oba ploda, s  $R_f$  vrijednostima 0,94. S ovom su mobilnom fazom razvijene zone  $\beta$ -sitosterola i stigmasterola intenzivnijeg ljubičastog obojenja,  $R_f = 0,45$  (u prvom kromatografskom sustavu dobivene su  $R_f$  vrijednosti 0,47 i 0,48).



**Slika 29.** Kromatogram standardnih otopina sterola i triterpenskkih kiselina te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

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

Pokretna faza: diklormetan - etilacetat (9:1, V/V).

Detekcija: reagens anisaldehyd-sulfatna kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Metanolni biljni ekstrakti:  **$\beta$ ST**- $\beta$ -sitosterol, **ST**-stigmasterol, **1**-plod Mali Lošinj, **2**-plod Koločep, **3**-list Mali Lošinj, **4**-list Koločep, **U**-ursolna kiselina, **O**-oleanolna kiselina

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom slučaju, b iznosi 15,7 cm.

**Tablica 12.** Prikaz kromatografskih vrijednosti (a) i pripadajućih  $R_f$  vrijednosti sterolnih zona za razvijač 2: diklormetan – etilacetat (9:1, V/V).

UZORAK		$\beta$ ST	ST	1	2	3	4	U	O
ZONE									
1	a	-	-	3,80	3,70	3,70	3,60	3,70	3,80
	$R_f$	-	-	0,24	0,24	0,24	0,23	0,24	0,24
2	a	-	-	-	-	4,80	4,70	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,31	0,29	-	-
3	a	7,00	7,10	7,10	7,20	7,20	6,90	-	-
	$R_f$	0,45	0,45	0,45	0,46	0,46	0,44	-	-
4	a	-	-	10,00	10,10	9,80	9,80	-	-
	$R_f$	-	-	0,64	0,64	0,62	0,62	-	-
5	a	-	-	-	-	12,00	11,90	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,76	0,76	-	-
6	a	-	-	-	-	12,90	12,90	-	-
	$R_f$	-	-	-	-	0,82	0,82	-	-
7	a	-	-	14,80	14,80	14,80	14,80	-	-
	$R_f$	-	-	0,94	0,94	0,94	0,94	-	-

## 4.5. Rezultati kvalitativne analize triterpena

### Rezultati TLC analize s razvijačem 1: toluen – aceton (9:1, V/V)

Ekstrakti plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L. pripremljeni su sa 70%-tnim metanolom te podvrgnuti kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, u razvijaču toluen – aceton (9:1, V/V). Detekcija se provodi prskanjem reagensom anisaldehyd-sulfatna kiselina i zagrijavanjem na 105 °C.

Usporedbe radi, ovdje su uključene i sterolne poredbene supstancije kako bi se uočilo kako ekstrakcijsko sredstvo utječe na kromatografska odjeljivanja. Poredbene triterpenske tvari odijeljene su u 1 zonu ljubičaste boje.  $R_f$  vrijednosti za kvalitativnu analizu sterola i triterpenskih kiselina ne odstupaju znatno od ovog kromatografskog odjeljivanja.

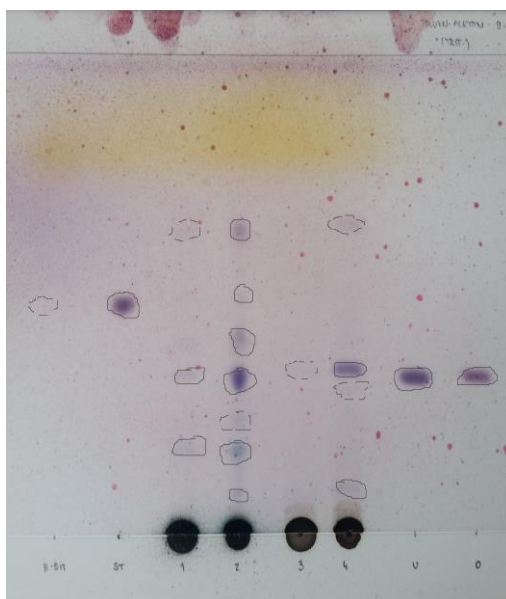
Rezultati poglavlja 4.4.:  $R_f(\beta$ ST) = 0,47;  $R_f$ (ST) = 0,48;  $R_f$ (U) = 0,31;  $R_f$ (O) = 0,31.

Rezultati poglavlja 4.5.:  $R_f(\beta$ ST) = 0,47;  $R_f$ (ST) = 0,47;  $R_f$ (U) = 0,32;  $R_f$ (O) = 0,32.

Triterpeni plodova s područja Malog Lošinja podijeljeni su u 4 kromatografske zone svijetloljubičaste boje, kao i u poglavlju 4.4., no ovdje su slabijeg intenziteta.

Triterpeni plodova s otočnog područja Koločepa podijeljeni su u 7 ljubičastih/plavih zona, za razliku od 4 zone u prethodnoj TLC analizi. Listovi s područja Malog Lošinja pokazali su samo jednu triterpensku zonu, i to vrlo slabog intenziteta, dok se kod prethodnog kromatografskog odjeljivanja jasno vidjelo 7 kromatografskih zona različitih boja. Također je u prethodnoj TLC analizi razvijeno 7 kromatografskih zona za listove s područja Koločepa, no ovdje su jedva vidljive 4 kromatografske zone svijetloljubičaste boje.

Mobilna faza ostala je ista, toluen – aceton (9:1, V/V); promijenjeno je samo ekstrakcijsko sredstvo (zamijenjen je metanol za 70 %-tni metanol) i vidljive su jasne razlike. Ova kromatografska ploča vrlo je slabo razvijena, uzorci su podijeljeni u manje kromatografskih zona i obojenja su slabijeg intenziteta najvjerojatnije zbog lošije ekstrakcije listova i plodova maginje.



**Slika 30.** Kromatogram standardnih otopina sterola i triterpenskih kiselina te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

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

Pokretna faza: toluen – aceton (9:1, V/V).

Detekcija: reagens anisaldehyd-sulfatna kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Metanolni biljni ekstrakti: **βST**-β-sitosterol, **ST**-stigmasterol, **1**-plod Mali Lošinj, **2**-plod Koločep, **3**-list Mali Lošinj, **4**-list Koločep, **U**-ursolna kiselina, **O**-oleanolna kiselina

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom slučaju, b iznosi 15,8 cm.

**Tablica 13.** Prikaz kromatografskih vrijednosti (a) i pripadajućih  $R_f$  vrijednosti triterpenskih zona za razvijatelj 1: toluen – acetone (9:1, V/V).

UZORAK		$\beta$ ST	ST	1	2	3	4	U	O
ZONE									
1	a	-	-	-	1,20	-	1,40	-	-
	$R_f$	-	-	-	0,08	-	0,08	-	-
2	a	-	-	2,70	2,30	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	0,17	0,15	-	-	-	-
3	a	-	-	-	3,30	-	4,60	-	-
	$R_f$	-	-	-	0,21	-	0,29	-	-
4	a	-	-	5,10	5,00	5,20	5,30	5,10	5,10
	$R_f$	-	-	0,32	0,32	0,33	0,34	0,32	0,32
5	a	-	-	6,30	6,30	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	0,40	0,40	-	-	-	-
6	a	7,40	7,40	-	7,60	-	-	-	-
	$R_f$	0,47	0,47	-	0,48	-	-	-	-
7	a	-	-	9,80	9,90	-	10,10	-	-
	$R_f$	-	-	0,62	0,63	-	0,64	-	-

#### Rezultati TLC analize s razvijanjem 2: diklormetan – etilacetat (9:1, V/V)

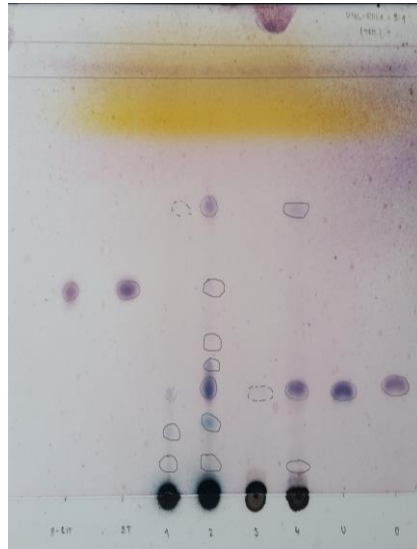
Uspoređujući  $R_f$  vrijednosti poredbenih supstancija s poglavljem 4.4., ne uočavaju se nikakva odstupanja u njihovom položaju niti broju kromatografskih zona. Plodovi s područja Malog Lošinja imaju isti broj zona, no ovdje su slabijeg intenziteta i razlikuju se značajno u  $R_f$  vrijednostima, odnosno položaju na kromatografskoj ploči.

Rezultati poglavlja 4.4.:  $R_f(P1)_{1zona} = 0,24$ ;  $R_f(P1)_2 = 0,45$ ;  $R_f(P1)_3 = 0,64$ ;  $R_f(P1)_4 = 0,94$ .

Rezultati poglavlja 4.5.:  $R_f(P1)_1 = 0,07$ ;  $R_f(P1)_2 = 0,15$ ;  $R_f(P1)_3 = 0,22$ ;  $R_f(P1)_4 = 0,63$ .

Također, kao i kod razvijanja 1, plodovi s područja Koločepa imali su 7 kromatografskih zona, za razliku od 4 kromatografske zone iz poglavlja 4.4. Listovi s područja Malog Lošinja razdvojeni u jednu vrlo slabo obojenu kromatografsku zonu ( $R_f = 0,21$ ), dok je kod razvijanja 1 postignuta  $R_f$  vrijednost 0,33. Listovi s područja Koločepa imali su jednak broj zona kao s razvijanjem 1 te bliske  $R_f$  vrijednosti. Listovi u poglavlju 4.4. razdvojeni su u 7 kromatografskih zona različitog obojenja.

Ova kromatografska ploča najslabije je razvijena od svih zbog nepogodnog sredstva za ekstrakciju i lošijeg razvijanja. Najbolji razvoj kromatografske ploče uočen je kod kvalitativne analize sterola i triterpenskih kiselina (poglavljje 4.4.) gdje je korišten metanol kao ekstrakcijsko sredstvo i razvijatelj 1, toluen – acetone (9:1, V/V).



**Slika 31.** Kromatogram standardnih otopina sterola i triterpenskih kiselina te metanolnih ekstrakata plodova i listova vrste *Arbutus unedo* L.

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

Pokretna faza: diklormetan - etilacetat (9:1, V/V).

Detekcija: reagens anisaldehyd-sulfatna kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Metanolni biljni ekstrakti: **βST**-β-sitosterol, **ST**-stigmasterol, **1**-plod Mali Lošinj, **2**-plod Koločep, **3**-list Mali Lošinj, **4**-list Koločep, **U**-ursolna kiselina, **O**-oleanolna kiselina

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom slučaju, b iznosi 15,9 cm.

**Tablica 14.** Prikaz kromatografskih vrijednosti (a) i pripadajućih  $R_f$  vrijednosti triterpenskih zona za razvijatelj 2: diklormetan – etilacetat (9:1, V/V).

UZORAK		βST	ST	1	2	3	4	U	O
ZONE									
1	a	-	-	1,10	1,10	-	1,00	-	-
	$R_f$	-	-	0,07	0,07	-	0,06	-	-
2	a	-	-	2,30	2,90	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	0,15	0,18	-	-	-	-
3	a	-	-	3,50	3,60	3,40	3,50	3,60	3,70
	$R_f$	-	-	0,22	0,23	0,21	0,22	0,23	0,23
4	a	-	-	-	4,40	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	-	0,28	-	-	-	-
5	a	-	-	-	5,20	-	-	-	-
	$R_f$	-	-	-	0,33	-	-	-	-
6	a	7,10	7,20	-	7,20	-	7,10	-	-
	$R_f$	0,45	0,45	-	0,45	-	0,45	-	-
7	a	-	-	10,00	10,00	-	9,80	-	-
	$R_f$	-	-	0,63	0,63	-	0,62	-	-

## 5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedeno je fitokemijsko istraživanje listova i plodova vrste *Arbutus unedo* L. prikupljenih 2014., odnosno 2015. godine, a koje je uključivalo kvalitativnu analizu polifenolnih sastavnica, flavonoida i fenolnih kiselina, trjeslovina, sterola, triterpena i triterpenskih kiselina.

Kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga, kao dio kvalitativne analize polifenola, oni su dokazani u svim ispitanim uzorcima, s malim varijabilnostima u intenzitetu obojenja kod plodova s obzirom na područje prikupljanja. Za plodove s Malog Lošinja dokazan je veći intenzitet obojenja, što ukazuje na veći udio polifenola u tom uzorku ploda. Ekstrakti listova s oba ispitana lokaliteta navedenom su analizom pokazali sličan intenzitet obojenja.

Primjenom metode tankoslojne kromatografije (TLC) pretpostavljena je prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina te je provedena usporedna analiza uz dvije stacionarne faze: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> i Kieselgur 60 F<sub>254</sub> te s dva razvijača: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V) i etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Detekcija je provedena NST/PEG reagensom, a zatim su kromatogrami promatrani pod UV svjetlom valne duljine 365 nm. Stacionarna faza Kieselgur 60 F<sub>254</sub> nije omogućila dobro odjeljivanje kromatografskih zona, jedino je bilo oučljivo plavo obojenje za fenolne kiseline i narančasto za flavonoidne heterozide kao polarne sastavnice. Upotrebom stacionarne faze Kieselgel 60 F<sub>254</sub> postignuta su dobra razdvajanja flavonoida i srodnih tvari na kromatografske zone različitih intenziteta fluorescence: narančaste zone pripadaju flavonoidnim spojevima, a plave zone fenolnim kiselinama i/ili iridoidima. Kod ekstrakta listova uočeno je više narančastih zona nego kod ekstrakta plodova, što ukazuje na veću prisutnost flavonoidnih spojeva u tim biljnim dijelovima. Analogno tome, uočeno je i više plavih kromatografskih zona u ekstraktu listova te su time bogatiji fenolnim kiselinama u odnosu na plodove maginje. Općenito je kod listova postignuto vrlo slično razdvajanje, s malim razlikama u broju kromatografskih zona s obzirom na lokalitet, dok je kod plodova uočen jednak broj kromatografskih zona kao i intenzitet fluorescence. Iako  $R_f$  vrijednosti pojedinih kromatografskih zona odgovaraju vrijednostima za fenolne kiseline, odnosno flavonoide, nije moguće sa sigurnošću potvrditi prisutnost ili odsutnost svih poredbenih tvari u ekstraktu listova zbog fluorescence različitog obojenja, a koja se javlja zbog međusobnog prekrivanja plavih zona (fenolne kiseline i/ili iridoidi) i narančastih mrlja (flavonoidi). Jedino se sa sigurnošću može potvrditi prisutnost izokvercitrina u uzorcima listova s oba lokaliteta, i po  $R_f$  vrijednostima, i po intenzitetu narančastih kromatografskih zona.

Kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga dokazane su trjeslovine u svim uzorcima, s odstupanjima u intenzitetu obojenja. Najintenzivnije reakcije su prisutne kod listova, bez obzira na lokalitet, dok su kod plodova veći intenzitet uglavnom imali oni s područja Koločepa. U plodovima nisu dokazane kondenzirane trjeslovine, dok su trjeslovine koje hidroliziraju prisutne u svim uzorcima; intenzivnija reakcija dobivena je za uzorke listova, a najslabija je bila za plodove s područja Malog Lošinja.

Kromatografijom na tankom sloju Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, uz razvijač 1 (toluen – aceton, 9:1, V/V) i razvijač 2 (diklormetan – etilacetat, 9:1, V/V) te detekcijom s anisaldehyd – sulfatna kiselina reagensom i zagrijavanje na 105 °C, provedena je kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina. Prisutnost stigmasterola i  $\beta$ -sitosterola u ispitanim uzorcima ne može se odvojeno potvrditi jer su im  $R_f$  vrijednosti vrlo bliske i imaju slične ljubičaste kromatografske zone. Isto vrijedi za ursolnu i oleanolnu kiselinu u ispitanim biljnim uzorcima. Uporabom razvijača 2, na kromatogramu uzoraka razvijen je jednak broj kromatografskih zona, no uz slabije razdvajanje. Kvalitativna analiza triterpena provedena je kao usporedba s prethodno opisanim TLC analizama, no uz ekstrakcijsko sredstvo 70%-tni metanol, za razliku od kvalitativne analize sterola i triterpenskih kiselina gdje je korišten metanol. Uočen je znatno lošiji razvoj kromatografskih zona, a obojenja su bila slabijeg intenziteta. Uspoređujući sva 4 kromatograma s obzirom na razvijač i ekstrakcijsko sredstvo, najbolje razdvajanje postignuto je ekstrakcijom metanolom, uz razvijač toluen – aceton (9:1, V/V), dok je najlošije razdvajanje i intenzitet obojenja prisutan primjenom 70%-tnog metanola kao ekstrakcijskog sredstva, u sustavu otapala diklormetan – etilacetat (9:1, V/V).



## 6. LITERATURA

Afkir S, Nguelefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyayat A. Arbutus unedo prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of Arbutus unedo in L-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(2), 288–295

Arbutus <https://www.britannica.com/plant/Arbutus> pristupljeno 22.07.2019.

Arbutus unedo <https://hirc.botanic.hr/fcd> pristupljeno 23.07.2019.

Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.

Bnouham M, Merhfour FZ, Ziyayat A, Aziz M, Legssyer A, Mekhfi H. Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Hum Exp Toxicol*, 2010, 29, 865-871.

Bravo L. Polyphenols : Chemistry, Dietary sources, Metabolism, and Nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 1998, 56(11), 317-333

Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr*, 2011, 30, 490-493.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 2007, 43, 348-361.

El Haouari M, López JJ, Mekhfi H, Rosado J, Salido GM. Antiaggregant effects of Arbutus unedo extracts in human platelets. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113, 325-331.

El Haouari, M, Mekhf H, Anti-platelet aggregation effects of extracts from Arbutus unedo leaves, *Plant Science Today*, 2007, vol. 4, no. 2, 68.

Ericaceae <https://www.britannica.com/plant/Ericales#ref595104> pristupljeno 22.07.2019.

Ericaceae <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Ericaceae/> pristupljeno 22.07.2019.

Gordon MH. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Elsevier Science Ltd, 2003, str. 2287-2292.

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog bilja. Rijeka, Ex libris, 2005, str. 273  
dvosupnice/vrijesovke/planika.

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

Jurica K, Brčić Karačonji I, Mikolić A, Milojković-Opsenica D, Benković V, Kopjar N. In vitro safety assessment of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 2018, str. 1261-1278.

Jurišić R. Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L., Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2003.

Jurišić R. Kemotaksonomska istraživanja vrsta roda *Teucrium*, Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1998, str. 43

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

Kivcak B, Mert T, Demirci B, Baser K. Composition of the essential oil of *Arbutus unedo*. *Chem Nat Compd*, 2001, 37, 445-446

Law MR. Plant sterol and stanol margarines and health. *West J Med*, 2000, 173(1), 43–47.

Maleš Z, Plazibat M, Vundać VB, Zuntar I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm*, 2006, 56, 245–250.

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

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

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

Mariotto S, Ciampa AR, de Prati AC, Darra E, Vincenzi S, Segal M, Cavalieri E, Shoji K, Suzuki H. Aqueous extract of *Arbutus unedo* inhibits STAT1 activation in human

breast cancer cell line MDA-MB-231 and human fibroblasts through SHP2 activation. Bentham Science Publ Ltd, 2008, str. 219-228

Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 1-11.

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD (2014) Arbutus unedo L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 2014, 19, 15799-823.

Moualek I, Aiche GI, Guechaoui NM, Lahcene S, Houali K. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Arbutus unedo aqueous extract. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2016, 6 (11), 937-944.

Mrabti HN, El Abbas Faouzi M, Mayuk FM, Makrane H, Limas-Nzouzi N, Dibong SD, Cherrah Y, Elombo FK, Gressier B, Desjeux JF, Eto B. Arbutus unedo L. (Ericaceae) inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rodents. *J Ethnopharmacology*, 2019, 235, 385-391

Mrabti HN, Jaradat N, Fichtali I, Ouedrhiri W, Jodeh S, Ayesh S, Cherrah Y, Faouzi MEA. Separation, Identification, and Antidiabetic Activity of Catechin Isolated from Arbutus unedo L. Plant Roots. *Plants (Basel)*, 2018, str. E31.

Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA. Arbutus unedo L. and its benefits on human health. *J Food Nutr Res*, 2011a, 50, 73-85.

Orak HH, Yagar H, Isbilir SS, Demirci AS, Gümüş T, Ekinçi N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf, *Food Sci Biotechnol.*, 2011, 20 (5) 1249-1256.

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

Pavlović DR, Branković S, Kovačević N, Kitić D, Veljković S. Comparative study of spasmolytic properties, antioxidant activity and phenolic content of Arbutus unedo from Montenegro and Greece. *Phytother Res*, 2011, 25, 749-754

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

- Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 2009, 58, 121-128.
- Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.
- Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The „French paradox“ and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med*, 2001, 32, 314-318.
- Šilić Č. Atlas dendroflora (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine. Matica Hrvatska, Čitluk, 2005, str. 59.
- Toplak Galle K. Hrvatsko ljekovito bilje. Zagreb, Mozaik knjiga, 2001. str. 18-19.
- Vidrih R, Hribar J, Prgomet Ž, Poklar Ulrich N. The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits., *Croat J Food Sci Technol*, 2013, 5(1), 29-33.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije, Interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 20-21.
- Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, nastavni materijal. Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14
- Wagner H. Pharmazeutische Biologie, Drogen und ihre Inhaltsstoffe, 5. neubearbeitete Auflage. Stuttgart-New York, Gustav Fischer Verlag, 1993, str. 39, 147, 244-249, 267.
- Wilt TJ, Ishani A, MacDonald R, Stark G, Mulrow CD, Lau J. Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *BJU International*, 1999, 83, 976-983
- Zakon o lijekovima, Narodne novine broj 100 (NN 76/13, 90/14; 100/18).

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

### Sažetak

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska analiza biološki aktivnih tvari listova i plodova vrste *Arbutus unedo* L. (obična planika, maginja), prikupljenih s otoka Lošinja (lokalitet Mali Lošinj) i Koločepa. Prisutnost polifenolnih spojeva dokazana je kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Kvalitativna analiza fenolnih kiselina (ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske) te flavonoida (rutin, kvercetin, naringenin) provedena je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC). Dokazana je prisutnost flavonoidnih tvari te fenolnih kiselina i/ili iridoida, a sa sigurnošću je detektiran izokvercitrin. Kvalitativna analiza trjeslovina provedena je općim reakcijama stvaranja boje i taloga te je potvrđena prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju i kondenziranih trjeslovina u svim ispitanim uzorcima. Kvalitativna analiza triterpena, sterola i triterpenskih kiselina provedena je TLC analizom i potvrđena je njihova prisutnost u svim ispitanim uzorcima. Nije uočena značajna varijabilnost ispitivanih bioaktivnih tvari obične planike s obzirom na različite lokalitete sabiranja biljnog materijala. Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja doprinos dosadašnjem istraživanju roda *Arbutus* te upotpunjuje znanstvene spoznaje o fitoterapijskom potencijalu maginje.

## Summary

A phytochemical analysis of bioactive compounds of leaves and fruits of *Arbutus unedo* L. gathered from the islands of Lošinj (population Mali Lošinj) and Koločep has been carried out in this graduate thesis. The presence of polyphenols has been demonstrated by general chemical reactions of developing colored products and precipitates. The qualitative analysis of phenolic acids (ferulic, caffeic, chlorogenic and rosmarinic acid) and flavonoids (rutin, quercetin, naringenin) was performed using thin layer chromatography (TLC). The presence of various flavonoid substances, as well as phenolic acids and/or iridoids was noticed, but it has only been confirmed for isoquercitrin. A qualitative analysis of tannins was conducted by general reactions of color and precipitate formation, which confirmed the presence of hydrolysable and condensed tannins in all examined samples. A qualitative analysis of sterols, triterpenic acids and triterpenes was performed by TLC analysis and their presence has been confirmed in all examined samples. Considering the place of collecting, no significant variability in the content of the bioactive substances occurs. The conducted phytochemical characterization represents a contribution to the scientific research of the genus *Arbutus*, expanding the existing knowledge of biological activity and phytotherapeutic potential of *Arbutus unedo* L.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### KVALITATIVNA FITOKEMIJSKA ANALIZA LISTA I PLODA VRSTE *ARBUTUS UNEDO* L. (ERICACEAE) S PODRUČJA KVARNERA I DALMACIJE

Monika Perica

#### SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska analiza biološki aktivnih tvari listova i plodova vrste *Arbutus unedo* L. (obična planika, maginja), prikupljenih s otoka Lošinja (lokalitet Mali Lošinj) i Koločepa. Prisutnost polifenolnih spojeva dokazana je kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Kvalitativna analiza fenolnih kiselina (ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske) te flavonoida (rutin, kvercetin, naringenin) provedena je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC). Dokazana je prisutnost flavonoidnih tvari te fenolnih kiselina i/ili iridoida, a sa sigurnošću je detektiran izokvercitrin. Kvalitativna analiza trjeslovina provedena je općim reakcijama stvaranja boje i taloga te je potvrđena prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju i kondenziranih trjeslovina u svim ispitanim uzorcima. Kvalitativna analiza triterpena, sterola i triterpenskih kiselina provedena je TLC analizom i potvrđena je njihova prisutnost u svim ispitanim uzorcima. Nije uočena značajna varijabilnost ispitivanih bioaktivnih tvari obične planike s obzirom na različite lokalitete sabiranja biljnog materijala. Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja doprinos dosadašnjem istraživanju roda *Arbutus* te upotpunjuje znanstvene spoznaje o fitoterapijskom potencijalu maginje.

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

Rad sadrži: 58 stranica, 31 slika, 14 tablica i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Arbutus unedo* L., polifenoli, flavonoidi, trjeslovine, steroli, triterpeni, kvalitativna analiza, TLC

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Živka Juričić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### QUALITATIVE PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF LEAVES AND FRUITS OF *ARBUTUS UNEDO* L. (ERICACEAE) FROM KVARNER AREA AND DALMATIA

**Monika Perica**

#### SUMMARY

A phytochemical analysis of bioactive compounds of leaves and fruits of *Arbutus unedo* L. gathered from the islands of Lošinj (population Mali Lošinj) and Koločep has been carried out in this graduate thesis. The presence of polyphenols has been demonstrated by general chemical reactions of developing colored products and precipitates. The qualitative analysis of phenolic acids (ferulic, caffeic, chlorogenic and rosmarinic acid) and flavonoids (rutin, quercetin, naringenin) was performed using thin layer chromatography (TLC). The presence of various flavonoid substances, as well as phenolic acids and/or iridoids was noticed, but it has only been confirmed for isoquercitrin. A qualitative analysis of tannins was conducted by general reactions of color and precipitate formation, which confirmed the presence of hydrolysable and condensed tannins in all examined samples. A qualitative analysis of sterols, triterpenic acids and triterpenes was performed by TLC analysis and their presence has been confirmed in all examined samples. Considering the place of collecting, no significant variability in the content of the bioactive substances occurs. The conducted phytochemical characterization represents a contribution to the scientific research of the genus *Arbutus*, expanding the existing knowledge of biological activity and phytotherapeutic potential of *Arbutus unedo* L.

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

Thesis includes: 58 pages, 31 figures, 14 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Arbutus unedo* L. polyphenols, flavonoids, tannins, sterols, triterpenes, qualitative analysis, TLC

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

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Živka Juričić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Željka Vanić, Ph.D.** Associated Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.