HPLC analiza polifenola u biljnim vrstama: Achillea millefolium, Sambucus nigra i Artemisia absinthium

Živković, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:302653

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Zrinka Živković

HPLC analiza polifenola u biljnim vrstama: *Achillea millefolium, Sambucus nigra* i *Artemisia absinthium*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fitofarmacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen je na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Marijane Zovko-Končić.

Veliku zahvalu upućujem mentorici izv.prof.dr.sc. Marijani Zovko-Končić na stručnom usmjeravanju, pomoći i vodstvu te savjetima i strpljenju.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za farmakognoziju na susretljivosti i pomoći prilikom izvođenja ovog rada.

Također, zahvaljujem se svim učiteljima, nastavnicima i profesorima koji su doprinjeli mom osobnom rastu tokom sveukupnom školovanja.

I na kraju, zahvaljujem se svojim roditeljima Mariji i Stanislavu, mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tokom moga školovanja.

Sadržaj

1.UVOD 1
1.1. ISPITIVANE BILJNE VRSTE 1
1.1.1. *Artemisia absinthium* 1
1.1.2. *Achillea millefolium* 2
1.1.3 *Sambucus nigra* 3
1.2. ŠEĆERNA BOLEST (diabetes mellitus) 4
1.3. POLIFENOLI 6
1.3.1. Flavonoidi 6
1.3.2. Fenolne kiseline 7
1.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI – HPLC 8
1.5. GRANIČNE VRIJEDNOSTI UTVRĐIVANJA (OTKRIVANJA) 9
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA 10
3. MATERIJALI I METODE ISPITIVANJA 11
3.1. MATERIJAL 11
3.1.1. Biljni materijal 11
3.1.2. Kemikalije 11
3.1.3. Instrumenti 11
3.2. METODE ISPITIVANJA 12
3.2.1. Izrada standardne otopine 12
3.2.2. Izrada ekstrakta 13
3.2.3. HPLC analiza 14
3.2.4. Baždarni dijagrami i kvantifikacija 16
4. REZULTATI 17
4.1. BAŽDARNI PRAVCI 17
4.1.1. Baždarni pravci standarada 17
4.1.1.1. Luteolin 17
4.1.1.2. Klorogenska kiselina 19
4.1.1.3. Ferulična kiselina 21
4.1.1.4. Ružmarinska kiselina 23
4.2. Kvantitativna analiza fenolnih sastavnica 25
4.2.1. *Achillea millefolium* 25
4.2.2. *Sambucus nigra* 27
4.2.3. *Artemisia absinthium* 29

6. ZAKLJUČCI 32
7. LITERATURA 33
8. SAŽETAK 35

1.UVOD

1.1. ISPITIVANE BILJNE VRSTE

1.1.1. *Artemisia absinthium*

Pelin (*Artemisia absinthium*, Asteraceae) je zeljasta trajnica koja raste na suhom i kamenitom tlu. U narodu je poznata kao ljekovita i gorka biljka. Kao ljekovita droga koristi se zelen pelina (Absinthii herba). Absinthii herba sadržava 0,15-0,4% gorkih seskviterpenskih laktona, među kojima su najvažniji absintin i artabisin, zatim 0,2-1,5% eteričnog ulja (sastav ovisi o kemotipu), flavonoidne glikozide, fenolne kiseline, kumarine i lignane. (Kuštrak, 2005).

Tradicionalno se koristi kao antihelmintik, koleretik, antiseptik, purgativ, digestiv, diuretik, stimulator menstruacijskog ciklusa te u liječenju leukemije i skleroze. Neke studije su ukazale na zaštitni učinak ekstrakta pelina kod akutne bolesti jetre što se može pripisati njegovoj antioksidativnoj i/ili imunomodulacijskoj aktivnosti i time znanstveno opravdati tradicionalnu uporabu (Riahi i sur., 2013.). Farmaceutski oblik u kojem pelin dolazi je biljni pripravak u tekućim ili krutim dozirnim oblicima ili kao biljni čaj za oralnu uporabu (www.ema.europa.eu/ema/).

Slika 1. *Artemisia absinthium*, pelin

1.1.2. *Achillea millefolium*

Stolisnik (*Achillea millefolium,*Asteraceae) je višegodišnja biljka koja raste po livadama, pašnjacima, poljima i vrtovima. Aromatičnog je mirisa te blago gorkog okusa.

Kao ljekovita droga koristi se zelen stolisnika (Millefolii herba) te stolisnikov cvijet (Millefolii flos). Stolisnik sadrži 0,2-1% eteričnog ulja, čiji sastav jako ovisi o podrijetlu biljnog materijala. To je morfološki, citogenetski i kemijski jako polimorfna vrsta. Europska farmakopeja propisuje najmanji sadržaj proazulena u drogi čime su svojte bez proazulena isključene iz uporabe kao ljekovita droga. Uz eterično ulje, u stolisniku ima flavonoida-7-*O*-glikozida apigenina i luteolina, *C*-glikozilflavona-orijentina i izoorijentina, fenolkarboksilnih kiselina i kumarina.

Stolisnik i njegovi ljekoviti pripravci djeluju protuupalno, spazmolitski, antimikrobno i antifugalno. Prema rezultatima istraživanja japanskih autora, pripravci stolisnika imaju i antitumorsko djelovanje. Stolisnik se koristi za otklanjanje tegoba kao što su dispeptičke tegobe, grčevi u želučano-probavnom traktu. Lokalno se primjenjuje kod kožnih bolesti (Kuštrak, 2005).

Slika 2. *Achillea millefolium*, stolisnik

1.1.3 *Sambucus nigra*

Bazga (*Sambucus nigra*,Caprifoliaceae) je biljna vrsta čiji su listovi i stabljike otrovni. Jestivi dijelovi su cvjetovi i plodovi. Bazga ima dugu povijest tradicionalnog korištenja kao ljekovito bilje te je mnogo korištena među travarima (www.pfaf.org). Infuzijska otopina od bazginih cvjetova smatra se dobrim lijekom kod mnogih bolesti. Sadržava važne flavonoide (Dawidowicz i sur., 2006.). Osušene zrele ili svježe bobice preporučuju se za liječenje konstipacije, kao diuretik te za ublažavanje boli u gornjem dišnom sustavu (Gamze Duymus i sur., 2014).

Slika 3. *Sambucus nigra*, bazga

1.2. ŠEĆERNA BOLEST (diabetes mellitus)

Diabetes mellitus definira se povišenom koncentracijom glukoze u krvi uz nedostatno izlučivanje ili potpuni izostanak izlučivanja inzulina iz gušterače uz koje se može i ne mora javiti i oslabljeno djelovanje inzulina. Razlikujemo četiri kategorije šećerne bolesti: tip 1 (o inzulinu ovisan dijabetes, Insulin Dependent Diabetes Mellitus, IDDM), tip 2 (dijabetes neovisan o inzulinu, Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM), tip 3 (različiti specifični razlozi vode do povišene koncentracije glukoze u krvi) i tip 4 (gestacijski dijabetes).

Karakteristična značajka dijabetesa tipa 1 je selektivno uništavanje beta stanica gušterače te teška ili potpuna deficijencija inzulina. Ovaj tip dijabetesa dijeli se na još dva podtipa s obzirom na to je li uzrok njegovog nastanka imunološke, što je najčešće, ili idiopatske prirode. Iako se većini pacijenata dijagnosticira prije navršene tridesete godine, ovaj tip bolesti može se javiti u bilo kojoj dobi. Terapija inzulinom je neophodna kod dijabetesa tipa 1. Prestanak uzimanja inzulina može dovesti do dijabetičke ketoacidoze ili smrti pacijenta. Dijabetička ketoacidoza uzrokovana je nedovoljnom razinom ili potpunom odsutnošću inzulina što dovodi do otpuštanja masnih kiselina i posljedičnog formiranja toksičnih razina ketonskih tijela.

Za dijabetes tipa 2 karakteristična je otpornost tkiva na djelovanje inzulina u kombinaciji s relativnom deficijencijom u izlučivanju inzulina. Postoje individualne razlike među pacijentima ovisno o tome kolika je rezistencija na inzulin ili deficijencija beta stanica. Te abnormalnosti mogu biti blage ili teške. Iako se kod pacijenata s ovim tipom dijabetesa inzulin proizvodi u beta stanicama gušterače, ipak se ne uspijeva nadjačati rezistencija tkiva pa razina glukoze u krvi raste. Smanjeno djelovanje inzulina također utječe na metabolizam masti, rezultirajući porastom razine slobodnih masnih kiselina te triglicerida, kao i recipročnim niskim razinama lipoproteina visoke gustoće (HDL). Pacijenti oboljeli od dijabetesa tipa 2 ne trebaju nužno terapiju inzulinom da bi preživjeli, no više od 30% njih imat će koristi od takve terapije za kontroliranje razine glukoze u krvi. Vjerojatno je da će 10–20% pacijenata kojima je isprva dijagnosticiran dijabetes tip 2 bolovati ujedno i od dijabetesa tipa 1 ili sporo napredujućeg tipa 1 (latentnog autoimunog dijabetesa odraslih – LADA) te će s vremenom trebati potpuno nadomještanje inzulina. Iako se kod dijabetesa tipa 2 uobičajeno ne razvijaju ketoze, ketoacidoza se može javiti kao posljedica stresa, infekcije, ili korištenja lijekova koji pojačavaju rezistenciju na inzulin (npr. kortikosteroidi). Dehidracija kod neliječenog ili loše reguliranog dijabetesa tipa 2 može dovesti do životno ugrožavajuće neketonske hiperosmolarne kome. U ovom stanju, koncentracija glukoze u krvi može narasti 6-20 puta od normalne razine i dolazi do promjene mentalnog stanja ili osoba gubi svijest. Važna je hitna medicinska intervencija te rehidracija.

Kod dijabetesa tipa 3 postoji nekoliko mogućih specifičnih uzroka povišene koncentracije glukoze u krvi: kirurško uklanjanje gušterače, pankreatitis, bolesti nepovezane s gušteračom, terapija lijekovima itd. Gestacijski dijabetes (dijabetes tip 4) definira se kao bilo koja abnormalnost u koncentraciji glukoze u krvi prvi put zabilježena u trudnoći. Tijekom trudnoće, placenta i hormoni placente stvaraju inzulinsku rezistenciju koja je najizraženija u zadnjem trimestru. Procjena rizika za razvoj dijabetesa preporuča se već pri prvom prenatalnom posjetu liječniku (Katzung i sur., 2011).

Tablica 1. Tipovi šećerne bolesti

TIP1-IDDM	**TIP2-NIDDM**
smanjeno izlučivanje ili potpuni izostanak izlučivanja inzulina	izlučivanje normalno ili povišeno
mlade osobe	odrasle, starije osobe
autoimuna bolest / genetski	obiteljski / genetski
nagli nastup bolesti	polagan nastup bolesti
dijagnoza - ketoza + hiperglikemija	prekomjerna tjelesna težina
10% dijabetičke populacije	80-90% dijabetičke populacije

1.3. POLIFENOLI

Organizam posjeduje brojne mehanizme za smanjenje štetnih utjecaja ROS (eng. *reactive oxygen species*) na stanice i tkiva. Međutim, pravilnom prehranom u organizam se unose brojni egzogeni antioksidansi koji također pomažu organizmu u borbi protiv oksidativnog stresa. Polifenoli su bioaktivni biljni produkti, raznolika skupina sekundarnih metabolita, koji su uključeni u brojne metaboličke procese. Najčešće su prisutni u listovima, cvjetovima i drvenastim dijelovima biljaka. Zbog kemijskih svojstava fenolne skupine mogu stupiti u reakcije sa slobodnim radikalima i na taj način smanjiti njihov utjecaj. Odlikuje ih visoka antioksidativna aktivnost za koju je zaslužan njihov redoks potencijal, pri čemu djeluju kao donori vodikovog atoma (Amarowicz i sur., 2004). Zastupljenost i raznolikost fenolnih spojeva u biljnom svijetu je velika. S obzirom na strukturne karaktristike polifenola, razlikujemo fenolkarboksilne kiseline i derivate, flavonoide, kumarine, lignane, trjeslovine i antranoide (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).

1.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi spadaju u skupinu polifenola. To su ubikvitarni spojevi u biljnom kraljevstvu i ne mogu se sintetizirati u životinjskom organizmu. Građeni su od fenolnog aglikona, i jednog ili više šećera vezanih na njega, a karakterizira ih antioksidativna i antiradikalna aktivnost (Kazazić, 2004). Osnovna struktura aglikona flavonoida ima oblik C6-C3-C6-benzenski prsten kondenziran s γ-pironom koji je vezan s još jednom benzenskom jezgrom (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008). Razlikujemo 6 osnovnih skupina flavonoida: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavonoidi, antocijani i flavani. Međusobno se razlikuju po strukturi prstena C (laktonskog prstena). Flavoni i flavanoli imaju dvostruku vezu na položaju 2-3, a izoflavonidi fenolnu skupinu vezanu na položaju 3. Flavani uključuju katehine, leukoantocijanidine, proantocijanidine i tanine, a dolaze u obliku mono-, di- i tri-mera.

Do danas je identificirano više od 4000 spojeva. Antioksidativnu aktivnost određuje raspored i vrsta supstituenata, planarnost molekule te broj i vrsta vezanih šećera (Kazazić, 2004.). Antioksidativna aktivnost se bazira na primanju nesparenih elektrona slobodnih radikala, doniranju vodikovih atoma, keliranju iona prijelaznih metala, aktiviranju antioksidacijskih enzima, inhibiranju oksidaze i sinergističkom djelovanju s fiziološkim antioksidansima. Osim antioksidativnog, treba spomenuti i antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno djelovanje flavonoida (Kazazić. 2004). Djeluju i diuretski, spazmolitički, koleretski i dijaforetski (Kuštrak, 2005).

1.3.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline prisutne u biljnim drogama dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne. Mogu postojati u slobodnom obliku ili u obliku estera i glikozida. Osnovnu strukturu hidroksibenzojevih predstavlja C6-C1 jedinica, a međusobne razlike proizlaze iz hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena. U biljnim drogama zastupljenije su hidroksicimetne kiseline (C6-C3) koje se međusobno razlikuju prema hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena. Među njima su najučestalije kavena i kumarinska kiselina. Ugavnom se nalaze u obliku estera, a rjeđe u slobodnom obliku (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).

1.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI – HPLC

HPLC je visoko efikasna razdjelna kromatografija koja se u 75% primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. Osnovni konstrukcijski dijelovi HPLC kromatogramu su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor. Otapala koja se koriste kao pokretna faza moraju biti visoke čistoće i valja ih osloboditi otopljenih plinova i suspendiranih čestica. Uzorak se unosi "-*autosampler-om*-" ili manualno mikrolitarskom špricom kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje tz. petlju u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. Kratka pretkolona služi da bi analitičku kolonu zaštitili od topljivih onečišćenja iz uzorka. Analitička kolona je najčešće cijev izrađena iz nehrđajućeg čelika, duljine 150 ili 250 milimetara, a unutarnjeg promjera 4,6 milimetara, punjena česticama veličine 3,5 ili 5 mikrometara. Za detekciju se koriste spektroskopski, fluorescencijski ili elektrokemijski detektori te detektori indeksa loma. Kao nosač tekuće nepokretne faze najčešće se koristi silikagel.

Valja razlikovati izokratnu od gradijentne HPLC. Kod izokratne radi se s jednim otapalom stalnog sastava, ali se bolje i brže odjeljivanje postiže primjenom gradijentnog ispiranja kada se sastav pokretne faze stalno mijenja. HPLC se koristi za odjeljivanja i određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Naprimjer, važna je primjena HPLC u ispitivanjima hrane, tla, zraka na prisustvo i sadržaj štetnih tvari poput pesticida, polikloriranih bifenila ili policikličkih aromatskih ugljikovodika. HPLC se primjenjuje i za odjeljivanje alkana, lipida, sterodia, šećera i lipofilnih vitamina (Luterotti, 2012).

1.5. GRANIČNE VRIJEDNOSTI UTVRĐIVANJA (OTKRIVANJA)

Najveći značaj za odabiranje neke analitičke reakcije imaju granične vrijednosti utvrđivanja tj. mogućnost sigurnog dokazivanja što manje mase analita pomoću odabranog analitičkog postupka. Granična vrijednost se može izraziti u kvalitativnom (granica identifikacije) i kvantitativnom (granica dokazivanja, određivanja) smislu (Svjetlana Luterotti, 2012). **Granica dokazivanja** (engl. Limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode. **Granica određivanja** (engl. Limit of quantification, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku i moguće ju je odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. LOD i LOQ se ispituju razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer standardne devijacije (SD je standardno odstupanje vrijednosti ispod površine pika) i nagiba kalibracijskog pravca.

$$\mathbf{LOD = 3{,}3 \times SD/SL}$$

$$\mathbf{LOQ = 10 \times SD/SL,}$$

gdje je SD standradno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je SL nagib kalibracijskog pravca (Nigović, Jurišić-Grubišić, Vuković, 2007).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Uporaba tradicionalnih lijekova i ljekovitog bilja široko je rasprostranjena u većini zemalja kao terapijsko sredstvo za održavanje zdravlja. Ljekovito bilje često sadrži značajne količine aktivnih tvari koje mogu pomoći pri liječenju ili smanjivanju simptoma određenih bolesti. U ovom radu istražena je prisutnost polifenolnih sastavnica u tri različite biljke (bazga, pelin i stolisnik) koje se tradicionalno koriste za snižavanje šećera u krvi tj, u liječenju šećerne bolesti, a koje su prikupljene na području Velebita te Bosne i Hercegovine.

3. MATERIJALI I METODE ISPITIVANJA

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljni materijal

Ispitivani su listovi i nadzemni dijelovi biljne vrste *Artemisia absinthium*, nadzemni dijelovi biljne vrste *Achillea millefolium* te listovi biljne vrste *Sambucus nigra*. Biljni materijal prikupljen je na Velebitu (stolisnik), te na području Bosne i Hercegovine (pelin, bazga).

3.1.2. Kemikalije

Za izradu mobilnih faza korišteni su metanol, mravlja kiselina i voda za HPLC (J.T.Baker, SAD) mravlja kiselina (Scharlau, Španjolska), 96%-tni etanol (GRAM – MOL.d.o.o., Hrvatska). Za izradu baždarnih pravaca korišteni su standardi klorogenske kiseline, ružmarinske kiseline, ferulične kiseline, luteolina, kavene kiseline, sinapične kiseline, p-kumarne kiseline, kvercetina, kemferola te fisetina (Sigma-Aldrich, SAD). Sve korištene kemikalije bile su visokog stupnja čistoće (*p.a*).

3.1.3. Instrumenti

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje biljnog materijala (UD Corporation, SAD), centrifuga (Tehtnica železniki, Slovenija), precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital 10P, Bandelin electronic, Njemačka), DAD detektor (Agilent Technologies 1260 Infinity), rotavapor (Büchi, Njemačka) i HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, USA).

3.2. METODE ISPITIVANJA

3.2.1. Izrada standardne otopine

Standardne otopine klorogenske kiseline, ružmarinske kiseline, ferulične kiseline te luteolina dobivene su otapanjem približno 1 mg standarda u 5 ml metanola čime je dobivena približna koncentracija u iznosu od 0,2 mg/ml. Pripremljene otopine su profiltrirane (0,43 µm) te su do uporabe čuvane u hladnjaku na 4 °C.

Tablica 2. Koncentracije standardnih otopina korištenih u ovom radu

Naziv standarda	**Masa odvage**	**Koncentracija**
Klorogenska kiselina	1 mg	0,2 mg/ml
Ferulična kiselina	1,12 mg	0,224 mg/ml
Ružmarinska kiselina	1,06 mg	0,212 mg/ml
Luteolin	1,15 mg	0,23 mg/ml
Kvercetin	1,18 mg	0,24 mg/ml
Kemferol	1,14 mg	0,23 mg/ml
Kavena kiselina	9,48 mg	1,9 mg/ml
Sinapična kiselina	1 mg	0,2 mg/ml
Fisetin	1.08 mg	0,216 mg/ml
P-kumarna kiselina	1,17 mg/m	0,234 mg/ml

3.2.2. Izrada ekstrakta

Osušeni i očišćeni biljni materijal je ručno usitnjen, a zatim samljeven u prah u mlinu za usitnjavanje biljnog materijala te prosijan kroz sito (veličina mrežice 850 μm).

Za ekstrakciju je uzet 1 dio droge (2g) i preliven s 10 dijelova otapala (80% etanol ili voda). Uzorci su stavljeni 60 minuta na ultrazvučnu kupelj (80 ºC). Ekstrakcijska smjesa je centrifugirana, a supernatant prebačen u odmjernu tikvicu od 25 ml. Droga u epruveti je dva puta ispirana s 10 ml 80%-tnog etanola za etanolni ekstrakt, odnosno s 10 ml pročišćene vode za reagense. Suspenzija je centrifugirana, a supernatant spojen s ekstraktom u odmjernoj tikvici. Sadržaj tikvice je nadopunjen do oznake. Ekstrakt svakog uzorka je uparavan na rotavaporu na 30 ºC i ostavljen u eksikatoru preko noći (etanolni ekstrakt) ili liofiliziran (vodeni ekstrakt).

Za daljnje ispitivanje izrađeno je 6 ekstrakata kako je prikazano u Tablici 3, tako da se približno 8 mg suhe tvari vodenog ekstrakta otopilo u 4 ml filtrirane vode za HPLC, odnosno približno 8 mg suhe tvari etanolnog ekstrakta u 4 ml smjese etanola i vode (etanol:voda = 4:1). Uzorci su zatim do kraja otopljeni na ultrazvučnoj kupelji te su filtrirani kroz filtar (veličina pora 0,45 μm).

Tablica 3. Koncentracije ispitivanih ekstrakata

Biljna vrsta	**Otapalo**	**Skraćeni naziv ekstrakata**	**Koncentracija**
Artemisia absinthium	Etanol (80%)	AA-E	2,005 mg/ml
Artemisia absinthium	Voda	AA-V	2,018 mg/ml
Achillea millefolium	Etanol (80%)	AM-E	1,98 mg/ml
Achillea millefolium	Voda	AM-V	2,23 mg/ml
Sambucus nigra	Etanol (80%)	SN-E	1,99 mg/ml
Sambucus nigra	Voda	SN-V	2,022 mg/ml

3.2.3. HPLC analiza

HPLC analiza etanolnih i vodenih ekstrakata provedena je na HPLC-u s DAD detektorom. Separacija je provedena na Zorbax C18 koloni (250 mm x 4,6 mm sa veličinom čestica od 5 µm, Agilent Technologies, USA). Za mobilnu fazu A korištena je smjesa vode za HPLC, metanola i mravlje kiseline (93:5:2), a za mobilnu fazu B smjesa vode za HPLC, metanola i mravlje kiseline (3:95:2). Eluacija sastavnica provedena je pri brzini protoka od 1.0 ml/min, a aplicirani volumen iznosio je 10 µl. Separacija se provodila na temperaturi od 40 °C primjenom metode gradijenta sljedećim rasporedom: 0 min 20% B, 10 min 40% B, 35 min 50% B, 45 min 80% B, 50 min 20% B. Ovi uvjeti bili su održavani 10 minuta i zatim vraćeni na početne unutar 3 minute. Kromatogrami uzoraka i standarada promatrani su na slijedećim valnim duljinama: 270 nm, 290 nm i 320 nm. Kvantifikacija kromatografskih pikova izvršena je na valnim duljinama na kojima pojedine sastavnice pokazuju najveću apsorpciju UV zračenja, kako slijedi: na valnoj duljini 270 nm kvantificirani su baicalein, krizin, luteolin, kvercetin i kemferol, a na valnoj duljini 290 nm kvantificiran je hesperetin. Na valnoj duljini 320 nm kvantificirane su slijedeće fenolne kiseline: klorogenska, kavena, p-kumarna, sinapična, ferulična, ružmarinska te flavonoid fisetin.

Komponente etanolnih i vodenih ekstrakata identificirane su uspoređivanjem njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima standarada fenolnih kiselina (klorogenska, kavena, p-kumarna, sinapična, ferulična, ružmarinska) te retencijskim vremenima standarada flavonoida (fisetin, luteolin,

kvercetin i kemferol). Njihova prisutnost dodatno je potvrđena uspoređivanjem UV-spektara pripadajućih kromatografskih pikova u uzorku i pikova čistih standarada. Kvantifikacija ispitivanih komponenti provedena je pomoću baždarnih pravaca standarada te je izražena u mg standarda na 1 g uzorka.

3.2.4. Baždarni dijagrami i kvantifikacija

Baždarni dijagrami su dobiveni apliciranjem 2, 4, 6, 8 i 10 μL otopine standarda istom metodom na HPLC-u. Konstruirani su baždarni pravci koji pokazuju ovisnost površine ispod krivulje o masi standarda. Iz jednadžbe dobivenog pravca izračunata je masa standarda koja odgovara dobivenoj površini ispod krivulje te je prema sljedećoj formuli izračunat maseni udio standarda u uzorku (mg/g):

$$w(\text{mg/g}) = m1 \times V1 / m2 \times V2$$

V1 - volumen priređene otopine uzorka u μL
V2 - volumen injekcije u μL
m1 - masa standarda
m2 - odvaga uzorka u mg

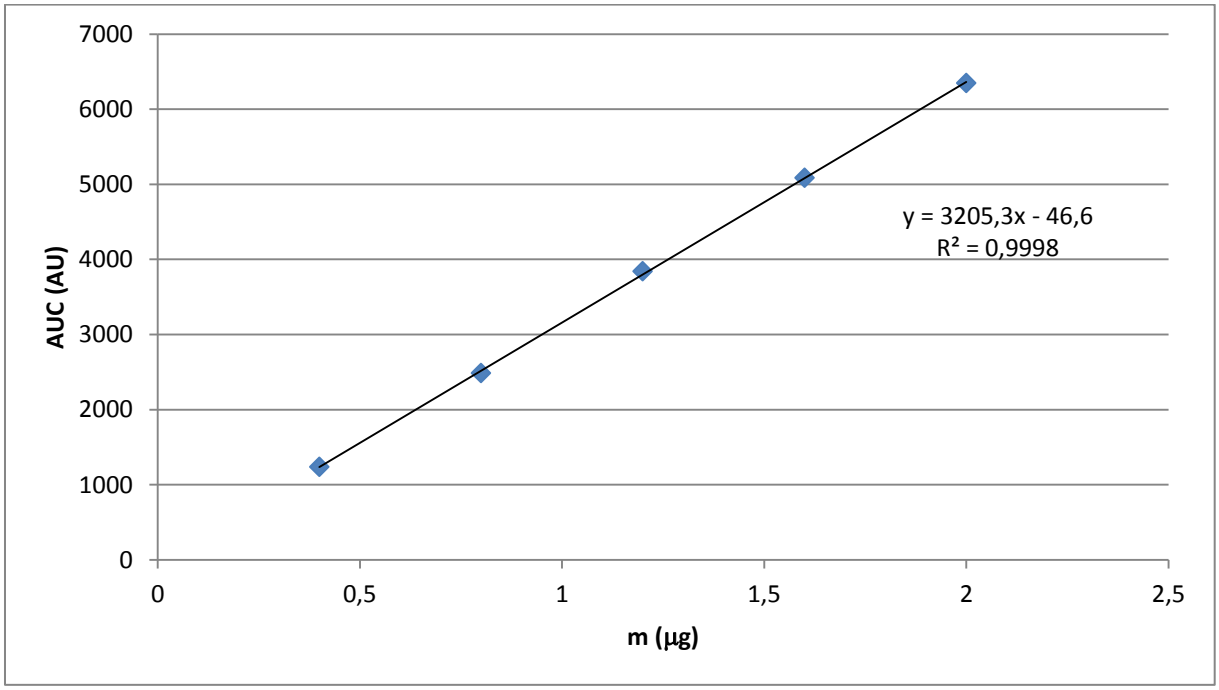
4. REZULTATI

4.1. BAŽDARNI PRAVCI

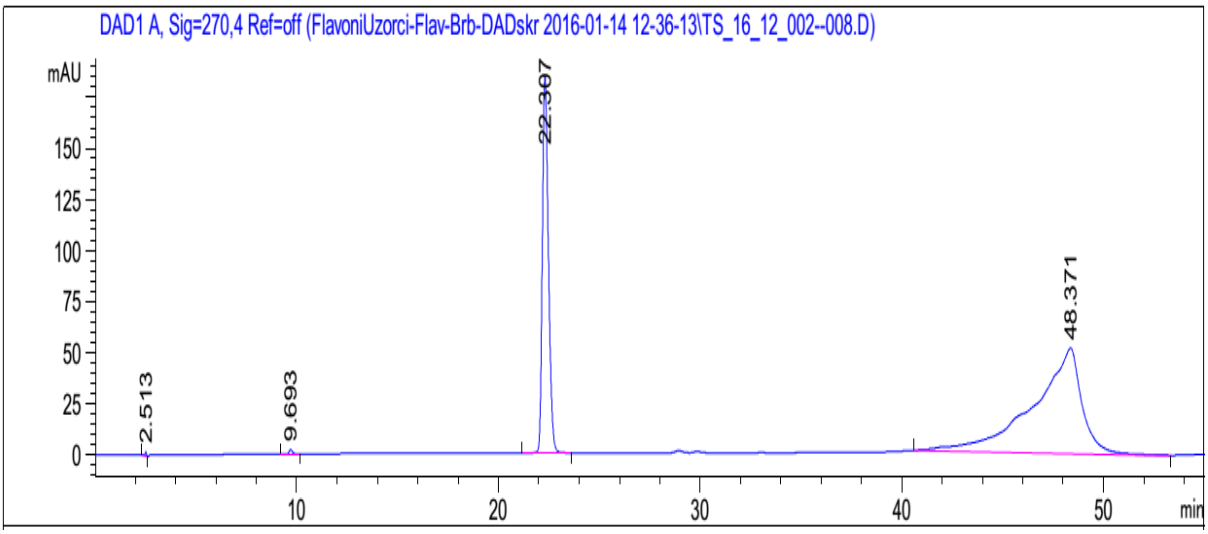
4.1.1. Baždarni pravci standarada

4.1.1.1. Luteolin

Izrađen je baždarni pravac (Graf 1) za luteolin koji pokazuje retencijsko vrijeme od 22,307 minuta na valnoj duljini λ=270 nm (Slika 4) te je dobivena sljedeća jednadžba: y = 3205,3x - 46,60 gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu luteolina u µg. Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih formula te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi 0,025 µg/ml, a LOQ iznosi 0,077 µg/ml.



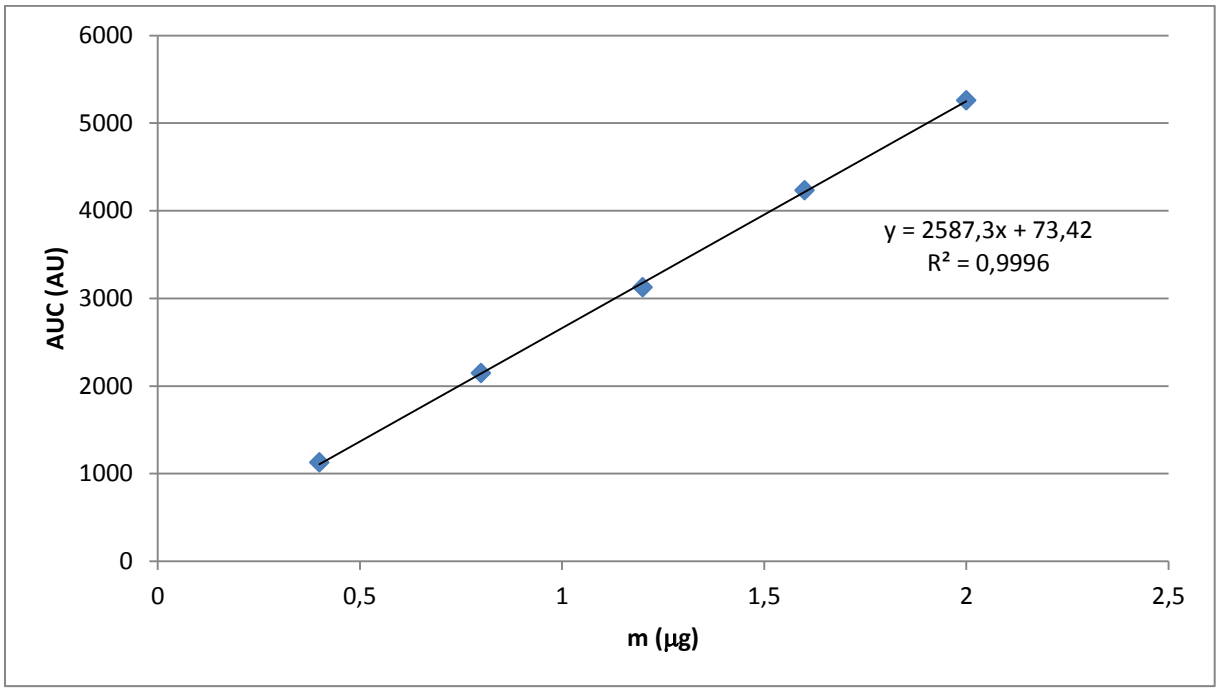
Graf 1. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi luteolina.



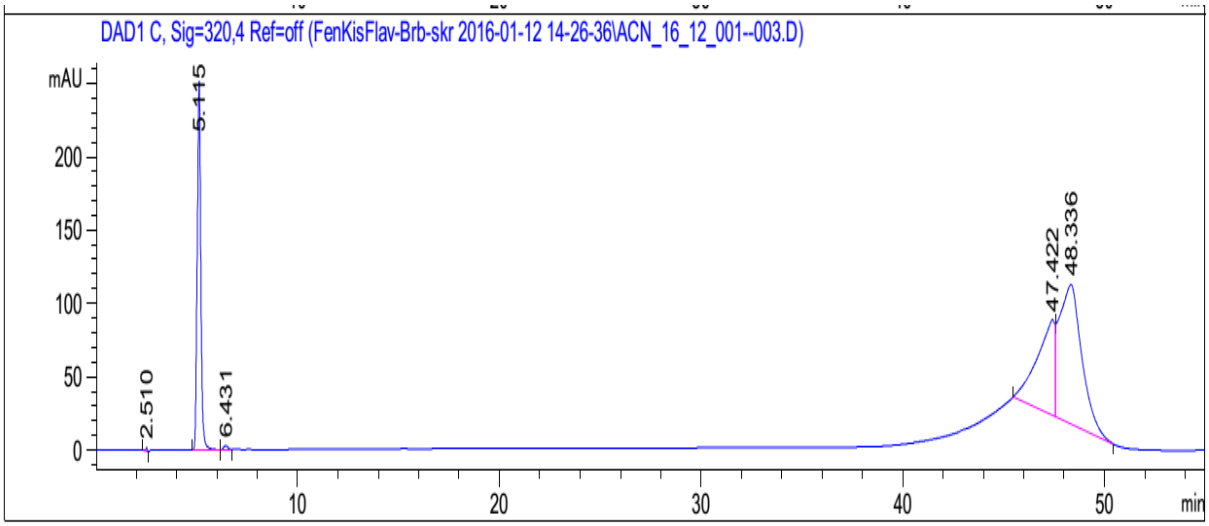
Slika 4. Kromatogram standarda luteolina.

4.1.1.2. Klorogenska kiselina

Izrađen je baždarni pravac za klorogensku kiselinu (Graf 2) koja pokazuje retencijsko vrijeme u iznosu od 5,115 minuta na valnoj duljini λ=320 nm (Slika 5) te je dobivena sljedeća jednadžba: y = 2587,3x +73,42, gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu klorogenske kiseline u µg. Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih formula te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi 0,04 µg/ml, a LOQ iznosi 0,11 µg/ml.



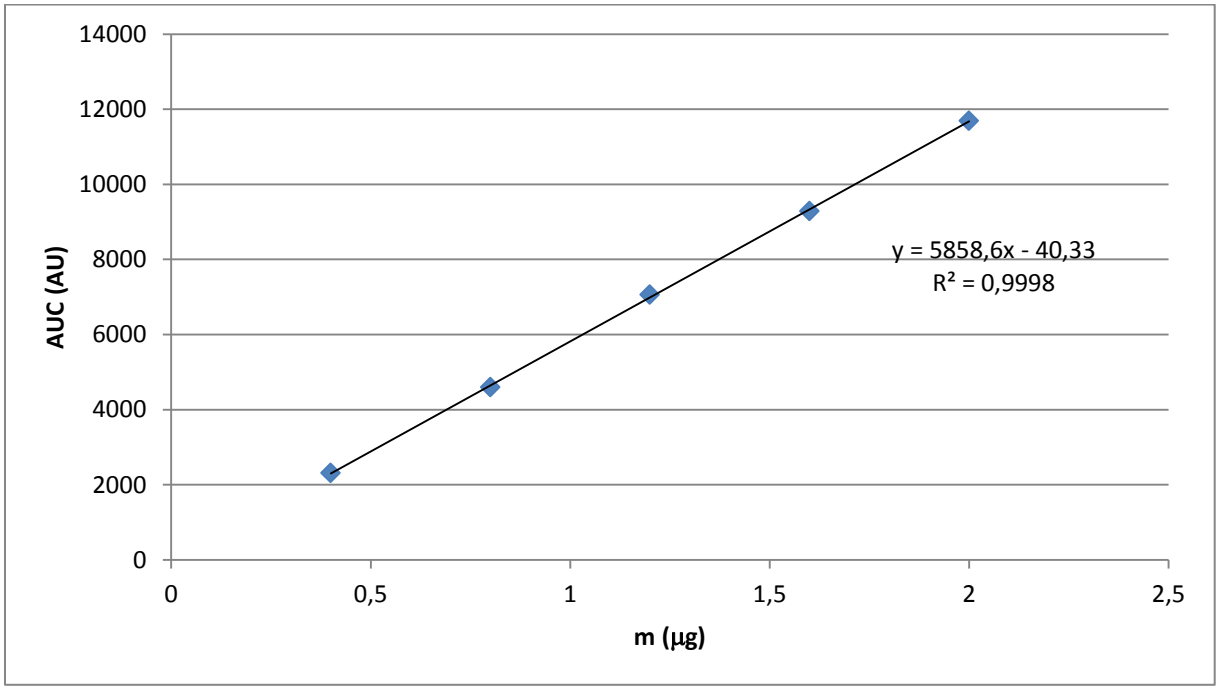
Graf 2. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi klorogenske kiseline.



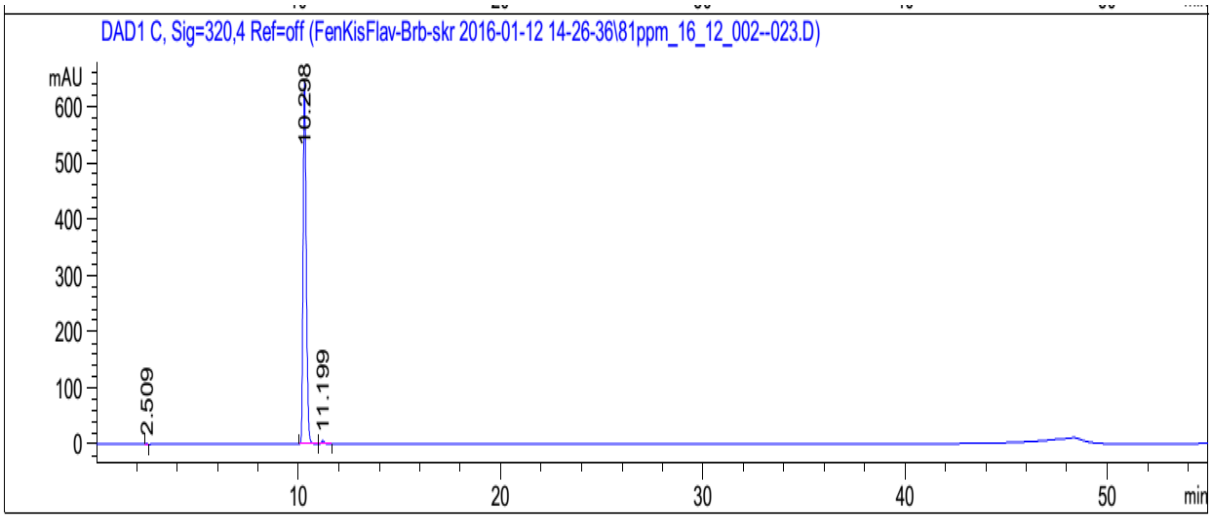
Slika 5. Kromatogram standarda klorogenske kiseline.

4.1.1.3. Ferulična kiselina

Izrađen je baždarni pravac za feruličnu kiselinu (Graf 3) koja pokazuje retencijsko vrijeme u iznosu od 10,208 minuta na valnoj duljini λ=320nm (Slika 6) te je dobivena sljedeća jednadžba: y = 5858,6x - 40,33, gdje y predstavlja površinu ispod kromatografaskog pika, a x masu ferulične kiseline u µg. Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih formula te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi 0,027 µg/ml, a LOQ iznosi 0,081 µg/ml.



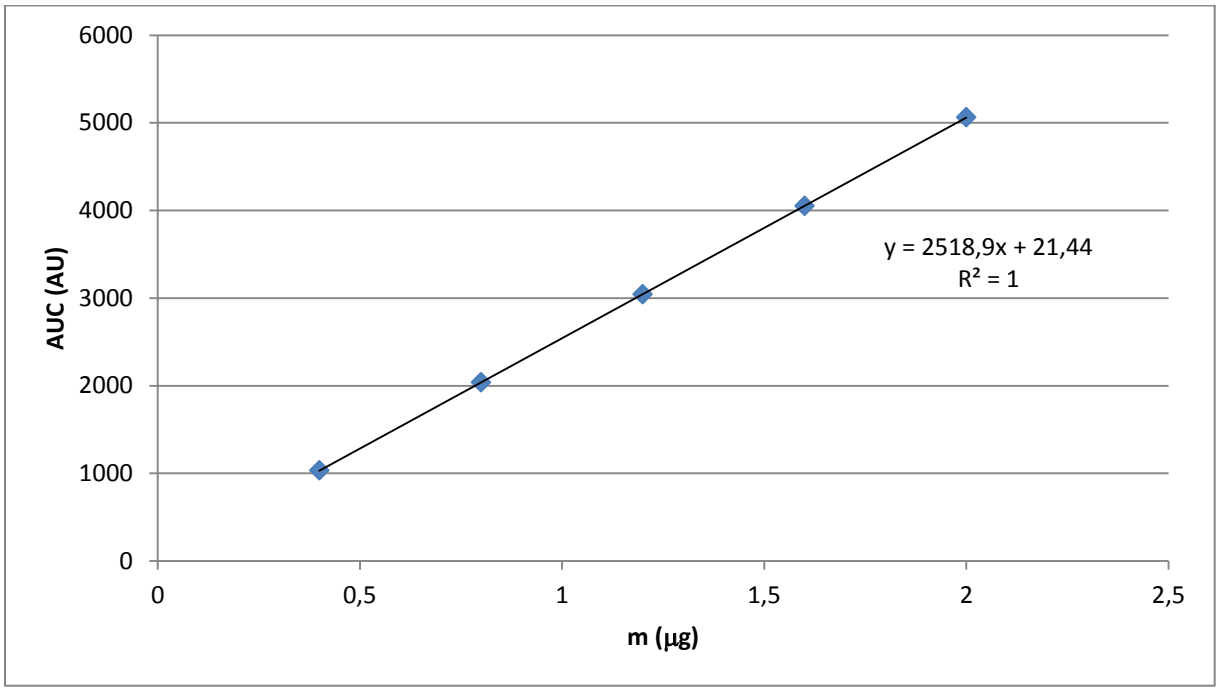
Graf 3. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi ferulične kiseline.



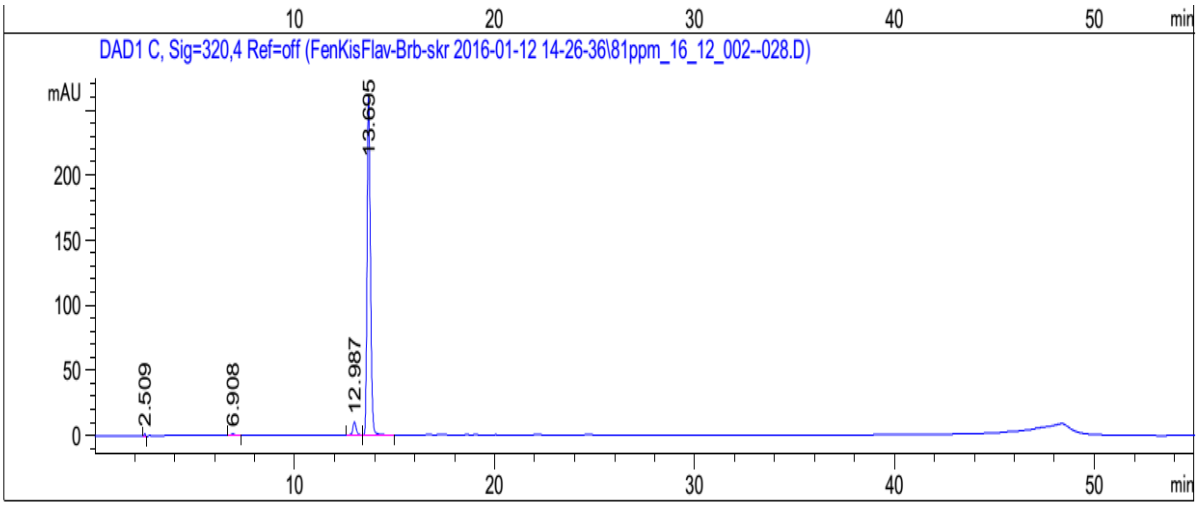
Slika 6. Kromatogram standarda ferulične kiseline.

4.1.1.4. Ružmarinska kiselina

Izrađen je baždarni pravac za ružmarinsku kiselinu (Graf 4) koja pokazuje retencijsko vrijeme u iznosu od 13,695 minuta na valnoj duljini λ=320 nm (Slika 7) te je dobivena sljedeća jednadžba: y = 2581,9x + 21,44, gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu ružmarinske kiseline u µg. Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih formula te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi 0,003 µg/ml, a LOQ iznosi 0,001 µg/ml.



Graf 4. Baždarni pravac ovisnost površine ispod krivulje o masi ružmarinske kiseline.

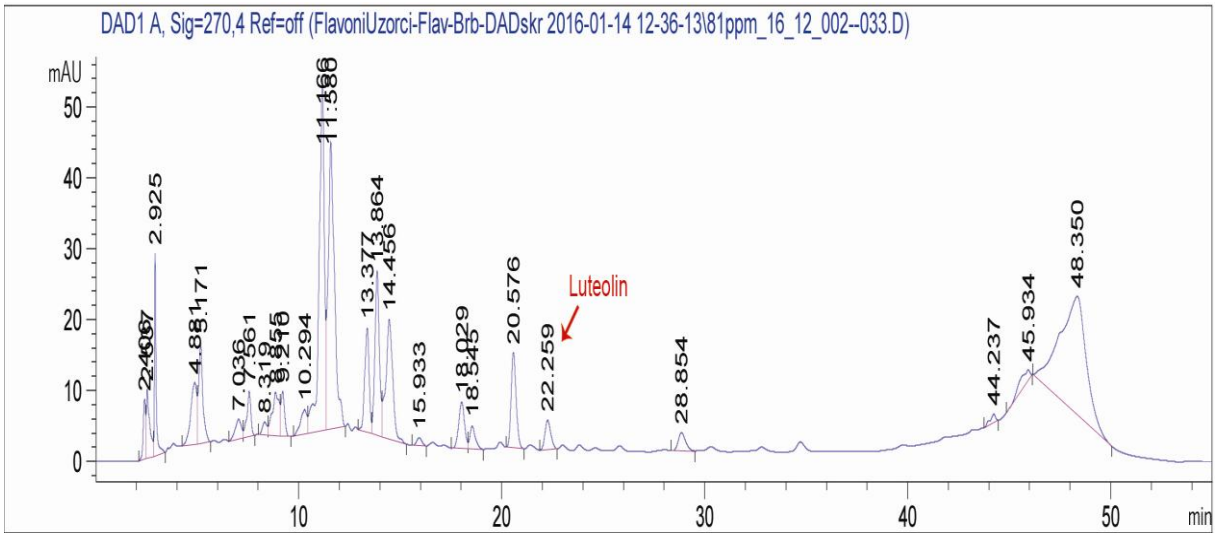


Slika 7. Kromatogram standarda ružmarinske kiseline.

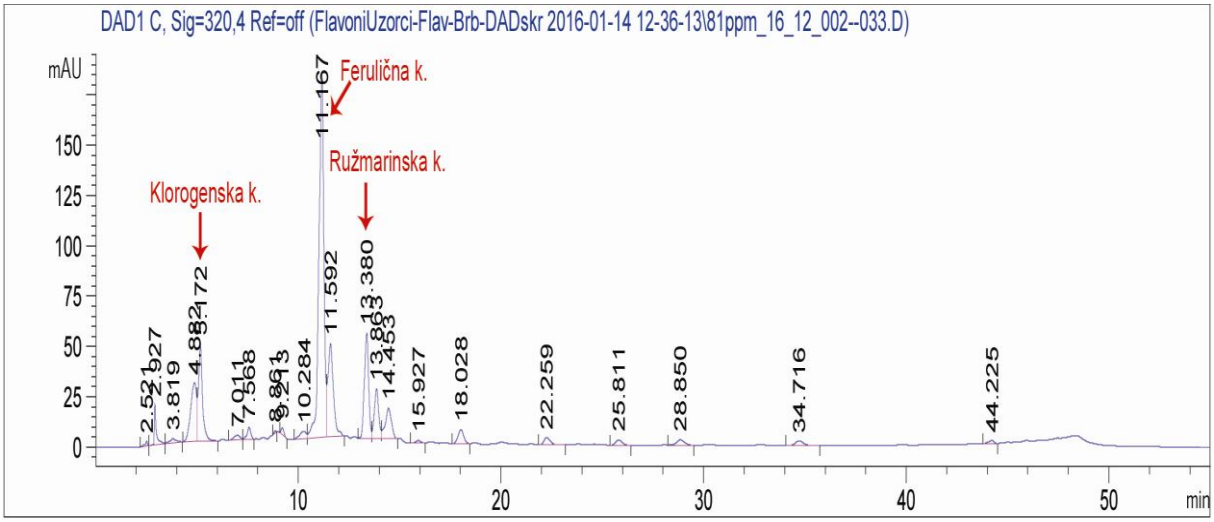
4.2. Kvantitativna analiza fenolnih sastavnica

4.2.1. *Achillea millefolium*

HPLC analiza etanolnog ekstrakta biljne vrste *Achillea millefolium* (Slika 8 i Slika 9) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarda (Slika 4, 5, 6, 7) i usporedba UV spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u ekstraktu prisutne sljedeće fenolne kiseline: klorogenska kiselina, ferulična kiselina, ružmarinska kiselina te flavonoid luteolin. Klorogenska kiselina prisutna je u količini od 11,77 mg/g, ferulična kiselina u količini od 26,74 mg/g, ružmarinska u količini od 14,87 mg/g. Flavonoid luteolin prisutan je u količini od 2,048 mg/g. Svi navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.

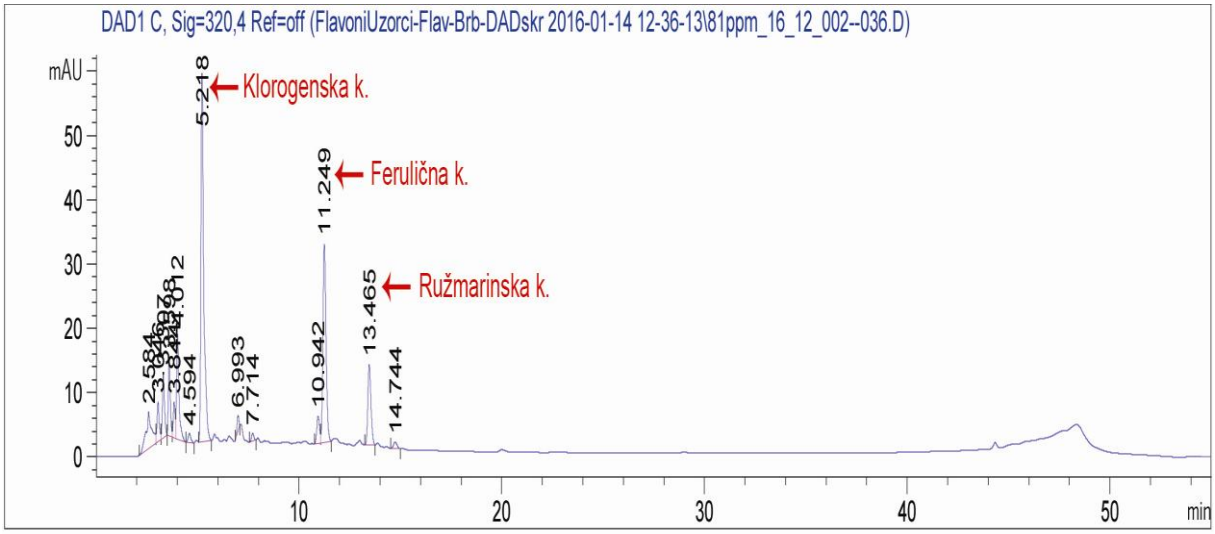


Slika 8. Kromatogram uzorka AM-E na 270 nm.



Slika 9. Kromatogram uzorka AM-E na 320 nm.

Analiza vodenog ekstrakta biljne vrste *Achillea millefolium* (Slika 10) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarda (Slika 5, 6, 7) i usporedba UV-spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u ekstraktu prisutne sljedeće fenolne kiseline: klorogenska kiselina, ferulična kiselina te ružmarinska kiselina. Klorogenska kiselina prisutna je u količini od 16,71 mg/g, ferulična kiselina u količini od 8,6 mg/g te ružmarinska u količini od 3,85 mg/g. Svi navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.

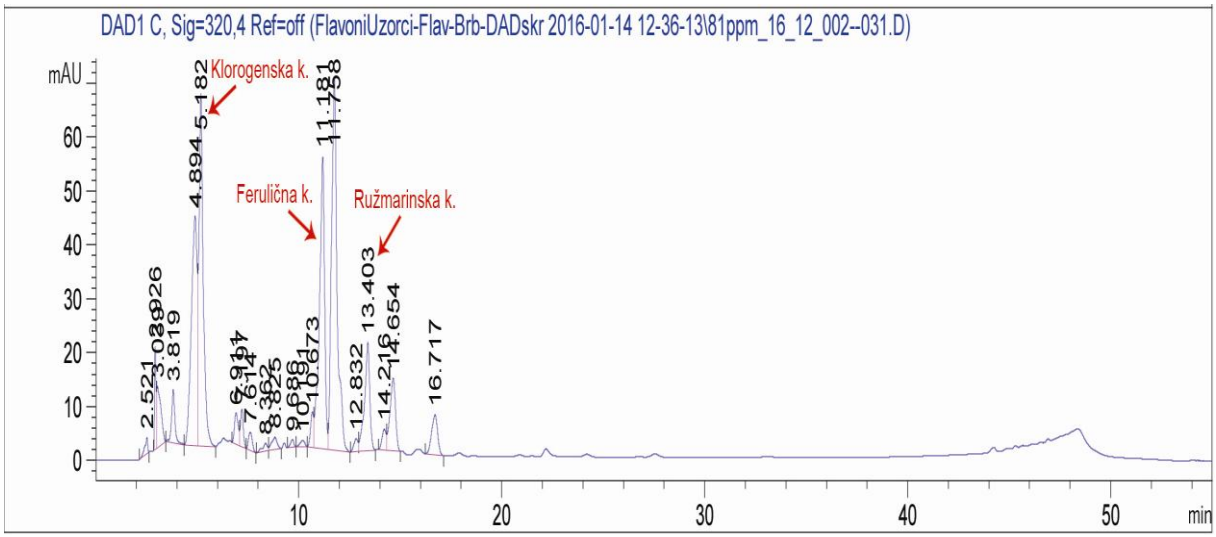


Slika 10. Kromatogram uzorka AM-V na 320 nm.

U uzorcima nisu pronađene *p*-kumarna, kavena i sinapična kiselina te flavonoidi fisetin, kvercetin i kemferol.

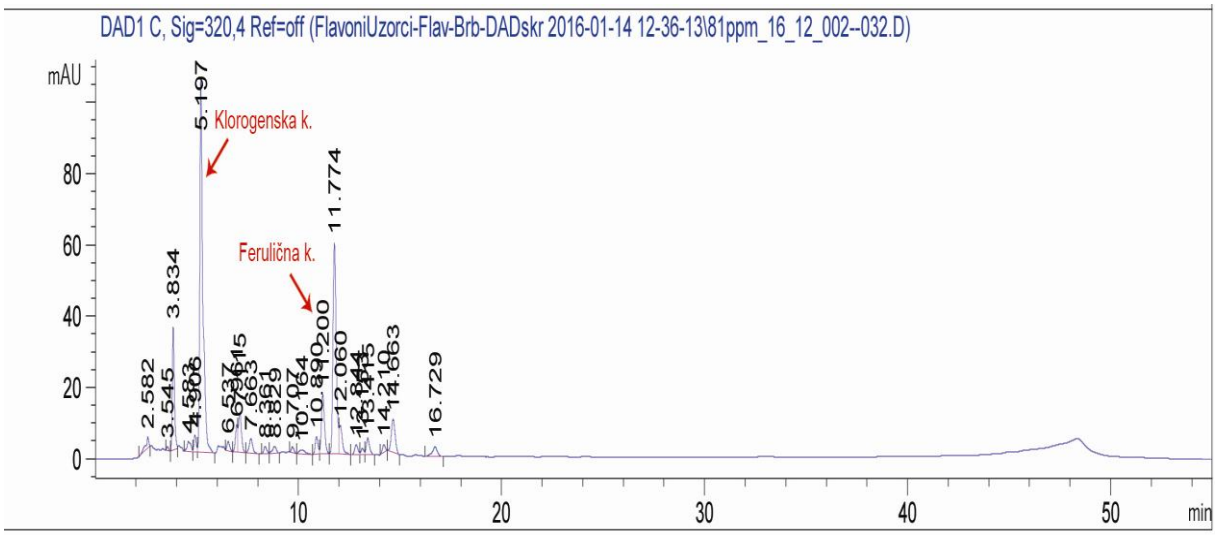
4.2.2. *Sambucus nigra*

Analiza etanolnog ekstrakta biljne vrste *Sambucus nigra* (Slika 11) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarda (slika 5, 6, 7) i usporedba UV-spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u ektraktu prisutne sljedeće fenolne kiseline: klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina te ferulična kiselina. Klorogenska kiselina prisutna je u količini od 17,55mg/g, ferulična kiselina u količini od 8,47mg/g te ružmarinska kiselina u količini od 6,72 mg/g. Svi navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 11. Kromatogram uzorka SN-E na 320 nm.

Analiza vodenog ekstrakta biljne vrste *Sambucus nigra* (Slika 12) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarda (slika 5, 6) i usporedba UV-spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u ekstraktu prisutne sljedeće fenolne kiseline: klorogenska kiselina i ferulična kiselina. Klorogenska kiselina prisutna je u količini od 19,7 mg/g, a ferulična kiselina u količini od 1,84 mg/g. Svi navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.

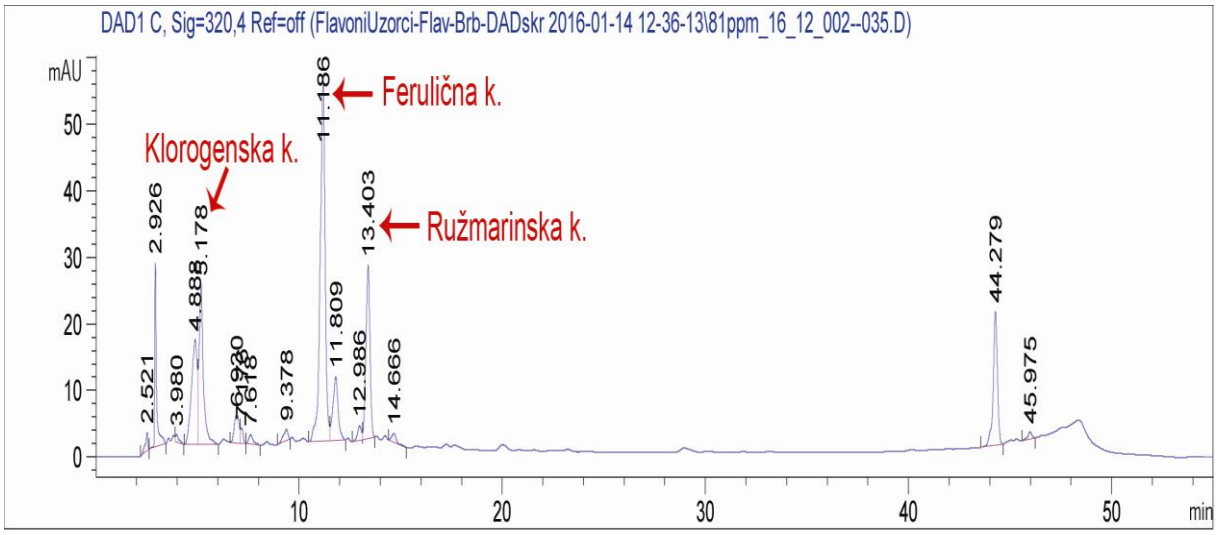


Slika 12. Kromatogram uzorka SN-V na 320 nm.

U uzorcima nije utvrđena prisutnost *p*-kumarne, sinapične i kavene kiseline, kao ni flavonoida kvercetina i fisetina.

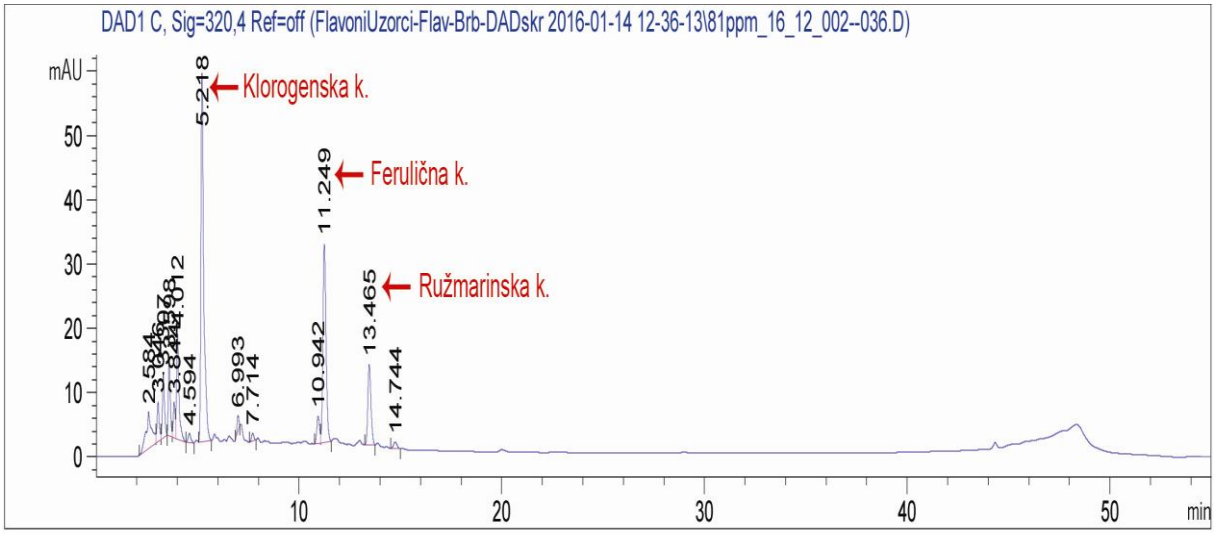
4.2.3. *Artemisia absinthium*

Analiza etanolnog ekstrakta biljne vrste *Artemisia absinthium* (Slika 13) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarda (Slika 5, 6 i 7) i usporedba UV-spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u uzorku prisutne sljedeće fenolne kiseline: klorogenska, ferulična te ružmarinska. Klorogenska kiselina prisutna je u količini od 4,94 mg/g, ferulična kiselina u količini od 8,18 mg/g, dok je ružmarinska kiselina prisutna u količini od 6,62 mg/g. Svi navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 13. Kromatogram uzorka AA-E na 320 nm.

Analiza vodenog ekstrakta biljne vrste *Artemisia absinthium* (Slika 14) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarda (Slika 5, 6 i 7) te usporedba UV-spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u uzorku prisutne sljedeće fenolne kiseline: ružmarinska, klorogenska te ferulična. Klorogenska kiselina pronađena je u količini od 9,23 mg/g, ferulična kiselina u količini od 3,13 mg/g te ružmarinska kiselina u količini od 2,22 mg/g. Svi navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 14. Kromatogram uzorka AA-V na 320 nm.

Prisutnost *p*-kumarne, sinapične te kavene kiseline, kao ni flavonoida kvercetina nije utvrđena u uzorcima.

Poznato je da polifenoli mogu usporiti razvoj dijabetičkih komplikacija te se može pretpostaviti da se tradicionalna uporaba djelomično temelji na dokazanim flavonoidima i fenolnim kiselinama. Klorogenska kiselina potencijalno ima ulogu u smanjenju komplikacija koje nastaju kod dijabetesa kao što je naprimjer dijabetička retinopatija (Shin JY i sur., 2013), ružmarinska kiselina ima potencijalnu antioksidativnu zaštitu β-stanica gušterače (Govindaraj i sur., 2015), ferulična kiselina prema studiji koju su proveli Sompong i suradnici značajno smanjuje koncentraciju glikoziliranog hemoglobina (Sompong i sur., 2015).

Ipak, da bi se dokazale ove pretpostavke potrebno je provesti dodatna, po mogućnosti klinička istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

Cilj ovog ispitivanja bio je odrediti kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola prisutnih u biljnim vrstama *Sambucus nigra, Achillea millefolim* i *Artemisia absinthium.* Navedene biljne vrste se dugi niz godina koriste u narodnoj medicini za liječenje ili ublažavanje tegoba šećerne bolesti.

Ispitivanjem je utvrđen sastav etanolnog i vodenog ekstrakta biljne vrste *Sambucus nigra*, a on je sljedeći: u etanolnom ektraktu prisutna je klorogenska kiselina, ferulična kiselina i ružmarinska kiselina. U vodenom ekstraktu prisutna je klorogenska kiselina i ferulična kiselina. Nadalje, sastav etanolnog ekstrakta biljne vrste *Achillea millefolium* je sljedeći: prisutna je klorogenska kiselina, ferulična kiselina, ružmarinska kiselina te flavonoid luteolin,dok je u vodenom ekstraktu prisutna klorogenska kiselina, ferulična kiselina te ružmarinska kiselina. Analizom biljne vrste *Artemisia absinthium* utvrđen je sastav etanolnog ekstrakta, a on glasi: klorogenska kiselina, ferulična kiselina te ružmarinska kiselina. Rezultati analize vodenog ekstrakta su sljedeći: klorogensk kiselina, ferulična kiselina te ružmarinska kiselina.

7. LITERATURA

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. Food Chemistry, 2004, 551-562.

Artemisia absinthium, 2002.,http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal_med_000001.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d, (pristupljeno 3.10.2015)

Betram G. Katzung, Susan B. Masters, Anthony J. Trevor. Temeljna i klinička farmakologija. Medicinska naklada Zagreb, 2011, 727-730.

Davidowicz AL, Wianowska D, Baraniak B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* (antioxidant properties of extracts). LWT – Food Science and Technology, 2006, 308-315.

Gamze Duymus H, Göger F, K. Hüsnü Can Baser H. In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of eldberry extracts. Food Chemistry, 2014, 119-122.

Govindaraj J, Sorimuthu Pillai S. Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protect pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetes rats, Molecular and cellular biochemistry, 2015, 143-59.

Kazazić S.P. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. Arh Hig Rada Toksikol, 2004, 279-290.

Kuštrak D. Farmakognozija-fitofarmacija.Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, 341-344, 408-409.

Nigović B, Jurišić Grubišić R, Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova 2. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2007.

Riahi L, Chograni, Elferchichi M, Zaouali Y, Zoghlami N, Mliki A. Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contens between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. Industrial Crops and Products, 2013, 290-296.

http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Sambucus+nigra, (pristupljeno 3.10.2015)

Shin JY, Sohn J, Park KH. Chlorogenic acid decreases retinal vascular hypermeability in diabetic rat model. Journal od Korean medical science 2013, 608-13

Svjetlana Luterotti. Uvod u kemijsku analizu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2012, 222-224.

Sompong W, Cheng H, Adisakwattana S. Protective effects of ferulic acid on high glucose-induced protein glycation, lipid peroxidation and membrane ion pump activity in human erythrocytes. PLoS One 2015.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz farmakognozije 1. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2008.

8. SAŽETAK

Mnoge biljne vrste sadrže različite aktivne supstancije koje mogu pomoći pri liječenju ili ublažavanju simptoma određenih bolesti. Jedna vrsta takvih aktivnih tvari su polifenoli, za koje u posljednje vrijeme raste zanimanje upravo zbog brojnih znanstvenih dokaza o njihovom pozitivnom učinku na zdravlje.

U ovom radu korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) za kvalitativnu i kvantitativnu analizu polifenola u tri biljne vrste: *Sambucus nigra, Artmisiia absinthium* i *Achillea millefolium.* Detekcija ispitivanih polifenola izvršena je pomoću DAD detektora.

U etanolnom ekstraktu biljne vrste *Achillea millefolium* pronađena je klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina, ferulična kiselina te flavonoid luteolin, dok su u vodenom ekstraktu pronađene ferulična kiselina, klorogenska kiselina te ružmarinska kiselina. U etanolnom ekstraktu biljne vrste *Sambucus nigra* pronađene su klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina te ferulična kiselina, a u vodenom ekstraktu pronađene su klorogenska kiselina i ferulična kiselina. U vodenom i etanolnom ekstraktu biljne vrste *Artemisia absinthium* pronađene su klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina i ferulična kiselina.

Many plant species contain different substances which can help in treatment of some disease or in reduction of their symptoms. One type of such active substances are polyphenols. Lately, interest for polyphenols is growing because of the scientific evidence of their positive effect on human health.

In this study, we used HPLC for qualitative and quantitative analysis of polyphenols in three different plant species: *Sambucus nigra, Artemisia absinthium* and *Achillea millefolium.* Detection of tested polyphenols was performed with DAD-detector.

In ethanol extract of *Achillea millefoilum* we found ferulic acid, rosmarinic acid, chlorogenic acid and flavonoid luteolin. In aqueous extract we found rosmarinic acid, chlorogenic acid and ferulic acid. In ethanol extract of *Sambucus nigra* we found chlorogenic acid, ferulic acid and rosmarinic acid and i aqueous extract we found chlorogenic acid and ferulic acid. In aqueous and ethanol extract of *Artemisia absinthium* we found rosmarinic acid, ferulic acid and chlorogenic acid.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/II, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

***HPLC analiza polifenola u biljnim vrstama:* Achillea millefolium, Sambucus nigra *i* Artemisia absinthium**

Zrinka Živković

SAŽETAK

Mnoge biljne vrste sadrže različite aktivne supstancije koje mogu pomoći pri liječenju ili ublažavanju simptoma određenih bolesti. Jedna vrsta takvih aktivnih tvari su polifenoli, za koje u posljednje vrijeme raste zanimanje upravo zbog brojnih znanstvenih dokaza o njihovom pozitivnom učinku na zdravlje. U ovom radu korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) za kvalitativnu i kvantitativnu analizu polifenola u tri biljne vrste: *Sambucus nigra, Artmisiia absinthium* i *Achillea millefolium.* Detekcija ispitivanih polifenola izvršena je pomoću DAD detektora. U etanolnom ekstraktu biljne vrste *Achillea millefolium* pronađena je klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina, ferulična kiselina te flavonoid luteolin, dok su u vodenom ekstraktu pronađene ferulična kiselina, klorogenska kiselina te ružmarinska kiselina. U etanolnom ekstraktu biljne vrste *Sambucus nigra* pronađene su klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina te ferulična kiselina, a u vodenom ekstraktu pronađene su klorogenska kiselina i ferulična kiselina. U vodenom i etanolnom ekstraktu biljne vrste *Artemisia absinthium* pronađene su klorogenska kiselina, ružmarinska kiselina i ferulična kiselina.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 14 grafičkih prikaza, 3 tablice i 15 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: HPLC-analiza, polifenoli, *Artemisia absinthium*, *Achillea millefolium*, *Sambucus nigra*

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko-Končić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko-Končić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Suzana Inić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Ožujak, 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

HPLC analysis of polyphenols in plant species: *Achillea millefolium*, *Sambucus nigra* i *Artemisia absinthium*

Zrinka Živković

SUMMARY

Many plant species contain different substances which can help in treatment of some disease or in reduction of their symptoms. One type of such active substances are polyphenols. Lately, interest for polyphenols is growing because of the scientific evidence of their positive effect on human health. In this study, we used HPLC for qualitative and quantitative analysis of polyphenols in three different plant species: *Sambucus nigra, Artemisia absinthium* and *Achillea millefolium.* Detection of tested polyphenols was performed with DAD-detector. In ethanol extract of *Achillea millefoilum* we found ferulic acid, rosmarinic acid, chlorogenic acid and flavonoid luteolin. In aqueous extract we found rosmarinic acid, chlorogenic acid and ferulic acid. In ethanol extract of *Sambucus nigra* we found chlorogenic acid, ferulic acid and rosmarinic acid and i aqueous extract we found chlorogenic acid and ferulic acid. In aqueous and ethanol extract of *Artemisia absinthium* we found rosmarinic acid, ferulic acid and chlorogenic acid.

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

Thesis includes: 40 pages, 14 figures, 3 tables and 15 references. Original is in Croatian language.

Keywords: HPLC-analysis, polyphenols, *Artemisia absinthium, Achillea millefolium, Sambucus nigra*

Mentor: **Marijana Zovko-Končić**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko-Končić**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Ortner Hadžiabdić, **Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Suzana Inić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2016.