Sadržaj fenola i flavonoida metanolnih ekstrakata listova vrsta roda Globularia

Hariri, Suzana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:739532

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Suzana Hariri

Sadržaj fenola i flavonoida metanolnih ekstrakata listova vrsta roda *Globularia*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutska botanika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Kroate Hazler Pilepić.

.

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Kroati Hazler Pilepić na pruženoj prilici i pomoći pri izradi ovog rada.

Najljepša hvala asistentici Maji Friščić, mag. pharm., na strpljivosti i velikoj pomoći pri izvođenju i pisanju rada, a najviše na ugodnom društvu.

Zahvaljujem se svojoj dragoj obitelji i prijateljima koji su uvijek bili uz mene, za njihovu bezuvjetnu ljubav, podršku i razumijevanje.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. VRSTE RODA *Globularia* L. 2

1.1.1. *Globularia alypum* L. 3

1.1.2. *Globularia cordifolia* L. 4

1.1.3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O.Schwarz 5

1.1.4. *Globularia punctata* Lapeyr. 6

1.2. DJELOVANJE, PRIMJENA I KEMIZAM VRSTA RODA *Globularia* L. 7

1.3. POLIFENOLI 8

1.3.1. Folin-Ciocalteuov reagens u određivanju ukupnih fenola 9

1.4. FLAVONOIDI 10

1.4.1. Najčešće primjenjivane metode u određivanju flavonoida 12

1.5.ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA 13

2. OBRAZLOŽENJE TEME 15

3. MATERIJALI I METODE 17

3.1. MATERIJALI 18

3.1.1. Biljni materijal 18

3.1.2. Kemikalije 19

3.1.3. Uređaji 19

3.2. METODE ISPITIVANJA 20

3.2.1. Priprema biljnog materijala 20

3.2.2. Priprema ekstrakata 20

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola 22

3.2.4. Određivanje flavonoida 23

3.2.5. Statistička obrada podataka 25

4. REZULTATI 26

4.1. ODREĐIVANJE FENOLA 27

4.1.1. Baždarni pravac galne kiseline 27

4.1.2. Sadržaj ukupnih fenola 29

4.2. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA 34

4.2.1. Baždarni pravac kvercetina 34

4.2.2. Sadržaj flavonoida 36

5. RASPRAVA 41
6. ZAKLJUČCI 45
7. LITERATURA 47
8. SAŽETAK/SUMMARY 51
8.1. Sažetak 52
8.2. Summary 53
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD ... 54

1. UVOD

1.1. Vrste roda *Globularia* L.

Vrste roda *Globularia* pripadaju porodici Plantaginaceae. To su grmaste, polugrmaste ili trajne zeljaste biljke. Ovom rodu pripadaju 22 do 23 različite vrste. One su uglavnom rasprostranjene u mediteranskom području, od kuda se šire prema sjevernoj Europi i sjeveroistočnoj Africi. Najčešće su nađene na otvorenim, suhim i kamenitim područjima.

Listovi su kožasti, jednostavni, obično lopatastog ili obrnuto jajastog oblika, a na vrhu mogu biti urezani ili nazubljeni s par zubića. Listovi mogu biti izmjenično smješteni na stabljici, dok su na dnu stabljike najčešće smješteni u rozeti. Na vrhu stabljike se nalaze glavičasti cvatovi s dvospolnim, zigomorfnim cvjetovima. Čaška se sastoji od pet lapova. Vjenčić je cjevast, sulatičan, dvousnat i plave je boje. Vrste roda *Globularia* imaju četiri dvomoćna prašnika, plod je jednosjemeni oraščić (Kadereit, 2004).

1.1.1. *Globularia alypum* L.

Hrvatski naziv ove biljke je grmasta glavulja (http://hirc.botanic.hr/fcd).
Biljka raste na području Mediterana. U Hrvatskoj ova vrsta raste jedino na području Konavoskih stijena (Šugar, 1994).

Biljka je polugrm ili grm visine do 100 cm, čija stabljika je obično uspravna, ali može biti i prilegnuta. Maleni, zimzeleni listovi nisu smješteni u rozeti, već se nalaze na svim mlađim dijelovima stabljike. Listovi su duguljastog i usko ovalnog oblika, boja im je svjetlo ili plavičasto zelena. Na rubu su čitavi ili s dva do tri zuba na vrhu. Mirisni i plavičasti cvjetovi se razvijaju u cvatnim glavicama, a pojavljuju se u vrijeme zime ili proljeća na vrhu ogranaka ili postrance na malim grančicama. Cvatne glavice su obavijene jajastim, kožastim braktejama, koje su trepavičasto dlakave na rubu, dok im je samo gornja strana jače dlakava (Kušan, 1943).



Slika 1. *Globularia alypum* L. (www.florealpes.com)

1.1.2. *Globularia cordifolia* L.

Hrvatski naziv ove biljke je srcolika glavulja (http://hirc.botanic.hr/fcd).
Raširena je po planinama središnje i južne Europe, od Karpata do sjeveroistočne Španjolske (Tutin i sur., 1972).

To je prilegnuti i jako razgranati polugrm s bezlisnim izdancima dugim do 8 cm na vrhu kojih su cvatne glavice. Listovi su lopatasti i često nazubljeni s tri zuba na vrhu. Nalaze se u rozetama na postranim izdancima (Kušan, 1943).



Slika 2. *Globularia cordifolia* L. (luirig.altervista.org)

1.1.3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O.Schwarz

Hrvatski naziv ove biljke je modra glavulja (http://hirc.botanic.hr/fcd).
Raširena je na jugoistočnim Alpama, planinama Balkanskog poluotoka te u središnjim i južnim Apeninama.

Nekada se ova biljka smatrala podvrstom vrste *Globularia cordifolia* te je nosila naziv *Globularia cordifolia* L. subsp. *bellidifolia*. Međutim, ova biljka je robusnija. Listovi su dugi 20-90 mm, a širina im je 2-5 mm. Listovi su uglavnom kopljastog oblika, na vrhu neznatno nazubljeni (Tutin i sur., 1972).



Slika 3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O.Schwarz (luirig.altervista.org)

1.1.4. *Globularia punctata* Lapeyr.

Hrvatski naziv ove biljke je Vilkomova glavulja (http://hirc.botanic.hr/fcd).
Raširena je od sjeverne Francuske, Češke, Slovačke do sjeverne Španjolske, južne Italije i sjeveroistočne Grčke.

Biljka je visoka do 30 cm s uspravnom stabljikom, koja završava s jednom cvatnom glavicom, a nosi na sebi obilje jajastih ili lancetastih listova. Ostali su listovi smješteni u rozeti na dnu stabljike i lopatastog su oblika. Prosječan promjer cvatnih glavica je oko 1,5 cm (Kušan i sur., 1945; Tutin i sur., 1972).



Slika 4. *Globularia punctata* Lapeyr. (https://commons.wikimedia.org)

1.2. Djelovanje, primjena i kemizam vrsta roda *Globularia* L.

Globularia alypum L., poznata lokalno pod nazivom *taselgha*, jedna je od najčešće primjenjivanih biljaka u narodnoj medicini država Sjeverne Afrike. Listovi te biljke često se koriste kao hipoglikemik, laksativ, diuretik, purgativ, za smirenje želučanih tegoba te u liječenju hemoroida i kardiovaskularnih bolesti (Amessis-Ouchhemoukh i sur., 2014). Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da ekstrakti listova ove vrste mogu inhibirati djelovanje acetilkolinesteraze, odnosno da posjeduju protuupalni (Khlifi i sur., 2013), nefroprotektivni (Feriani i sur., 2017) i antioksidativni učinak (Khlifi i sur., 2011).

Glavne djelatne tvari vrste *G. alypum* su fenolni spojevi i iridoidi (Amessis-Ouchhemoukh i sur., 2014), pri čemu se u fenolne spojeve ubrajaju derivati hidroksicimetne kiseline, flavoni, iridoidi i feniletanoidi (Feriani i sur., 2017). Pokazalo se da bi antioksidativni učinak ove vrste mogao biti povezan sa sadržajem fenola i flavonoida, kao i da su fenolnim spojevima posebno bogati metanolni ekstrakti listova (Khlifi i sur., 2011). Također je primijećeno da su sadržaj fenolnih spojeva i antioksidativni učinak ove vrste povišeni u usporedbi s nekim drugim biljnim vrstama koje se primjenjuju u narodnoj medicini (Djeridane i sur., 2006).

Povećan sadržaj fenolnih spojeva utvrđen je i kod vrste *G. meridionalis*, kod koje su se flavonoidi i feniletanoidi također pokazali kao sastavnice s najvećim antioksidativnim potencijalom (Tundis i sur., 2012). Navedena vrsta, kao i njoj srodne vrste *G. cordifolia* i *G. punctata*, posjeduju slične spojeve kao vrsta *G. alypum* (Friščić i sur., 2016).

1.3. Polifenoli

Polifenoli su velika skupina biljnih sekundarnih metabolita. Glavna značajka njihove strukture je postojanje jednog ili više aromatskih prstenova s jednom ili više hidroksilnih grupa. Više od 8000 različitih polifenolnih struktura je identificirano u različitim biljnim vrstama, a sintetiziraju se iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put.

Polifenole možemo podijeliti u četiri glavne skupine:
1- fenolne kiseline (derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline)
2- flavonoidi (kalkoni, flavanoni, flavanonoli, flavoni i flavonoli)
3- tanini
4- stilbeni

Rasprostranjeni su u različitim dijelovima biljke: listovima, cvjetovima, plodovima i drvenastim dijelovima. Netopljivi fenoli su sastavni dio staničnih stijenki, dok su topljivi fenoli smješteni unutar vakuola biljnih stanica. Glavna im je uloga zaštita biljke od ultraljubičastog zračenja i patogena, ali doprinose i njihovoj boji, mirisu, okusu i oksidativnoj stabilnosti.

Polifenoli se u velikim količinama nalaze u voću, povrću, žitaricama, crnom vinu, čaju i kavi. Čaša crnog vina, čaja ili kave sadrži oko 100 mg polifenola, dok voće kao što su grejp, jabuka, kruška i trešnja sadrže 200-300 mg polifenola po 100 g svježeg voća. Djeluju kao hvatači slobodnih radikala, što doprinosi njihovom antioksidativnom učinku, a uz to posjeduju i antibakterijsko djelovanje te sudjeluju u prevenciji infekcija, upala i alergija (Pandey i Rizvi, 2009; Ozcan i sur., 2014).

Većina polifenola prisutnih u hrani dolazi u obliku estera, glikozida ili polimera te u tom obliku ne mogu biti apsorbirani. Prije apsorpcije trebaju se hidrolizirati što se obično događa pod djelovanjem crijevne mikroflore. Nakon apsorpcije modificiraju se reakcijama konjugacije u jetri (metilacijom, sulfatacijom i/ili glukuronidacijom). Kao rezultat toga nastaju novi metaboliti koji su različiti od onih prisutnih u hrani (Pandey i Rizvi, 2009).

1.3.1. Folin-Ciocalteuov reagens u određivanju ukupnih fenola

Jedna od najčešće korištenih analitičkih metoda za određivanje ukupnih fenola je metoda u kojoj se koristi Folin-Ciocalteuov reagens (F-C reagens). To je kolorimetrijska metoda temeljena na reakcijama prijenosa elektrona između Folin-Ciocalteuovog reagensa i fenolnih komponenata. Ova je metoda bila razvijena s ciljem poboljšanja starije metode koja je koristila Folin-Denisov reagens za određivanje ukupnog sadržaja proteina u namirnicama. Folin-Ciocalteuov reagens za razliku od Folin-Denisovog reagensa sadrži veći udio molibdena što mu povećava osjetljivost i točnost.

Folin-Ciocelteuov reagens priprema se otapanjem 100 g natrijevog volframata ($Na_2WO_4*2H_2O$) i 25 g natrijevog molibdata ($Na_2MoO_4*2H_2O$) u 700 mL destilirane vode, nakon čega se u otopinu dodaje 50 mL koncentrirane klorovodične kiseline (HCl) i 50 mL 85%-tne fosforne kiseline. Ovakva otopina refluksira se 10 sati uz zagrijavanje. Nakon hlađenja, dodaje se 150 g litijevog sulfata ($LiSO_4*4H_2O$) da bi se spriječilo zamućenje koje može utjecati na rezultate. Konačni reagens je žute boje.

Reakcija kojom se stvara plava boja u ovoj metodi je oksidacija fenola, odnosno redukcija molibdena u F-C reagensu. Reakcija se odvija pri vrijednosti pH ~ 10, koja se postiže dodatkom natrijevog karbonata u reakcijski medij. Pod takvim uvjetima dolazi do disocijacije fenolnih protona i nastanka fenolnih iona te redukcije F-C reagensa (Sanchez-Rangel i sur., 2013).

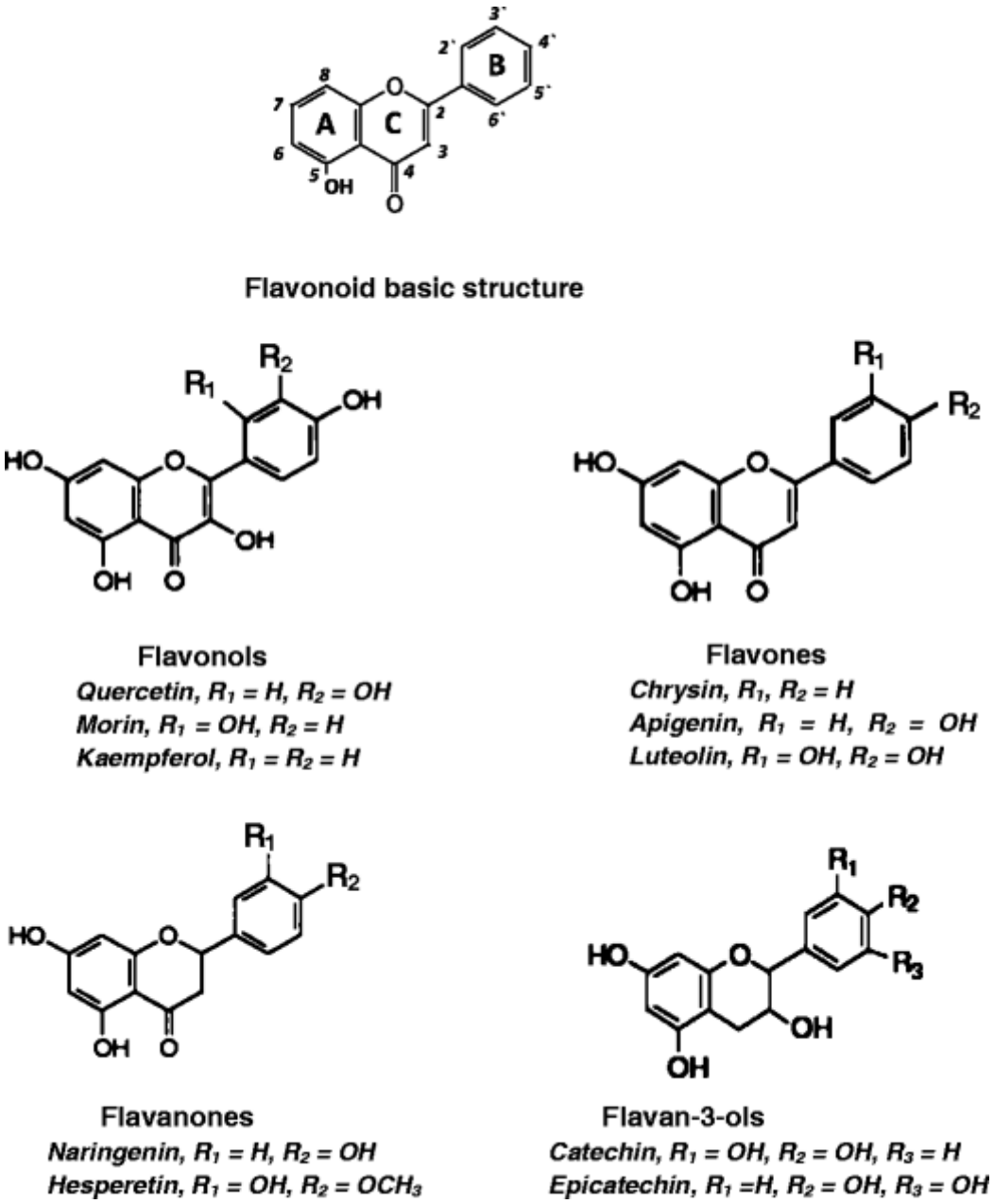
$$Mo(VI) + e(\text{iz fenola}) \rightarrow Mo(V) \qquad (pH \sim 10)$$

1.4. Flavonoidi

Flavonoidi su biljni sekundarni metaboliti iz skupine polifenola. Najzastupljeniji su od svih polifenola te čine više od 6000 različitih struktura. Flavonoidi imaju nisku molekularnu masu, a u strukturi sadrže 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena (C6-C3-C6) (Ozcan i sur., 2004). Različite skupine flavonoida se međusobno razlikuju po broju i rasporedu hidroksilnih grupa te opsegu njihove alkilacije i glikozilacije (Pandey i Rizvi, 2009).

Nalaze se u brojnim biljkama, a smješteni su u plodovima, sjemenkama, cvjetovima i listovima. Imaju vrlo važnu ulogu u biljkama, u zaštiti od UV-zračenja, pigmentacije i biljojeda te djeluju antioksidativno, antimikrobno, antifungalno, a većina njih su odgovorni za atraktivnu boju plodova, cvjetova i listova (Cherrak i sur., 2016).

Kod ljudi, flavonoidne biljne droge imaju različit farmakološki učinak te djeluju spazmolitski, diuretski, protuupalno, koleretski, antialergijsko, estrogeno i antihepatotoksično (Kuštrak, 2005). Danas se najvažnijim učinkom flavonoida smatra njihova antioksidativna aktivnost, prisutna zahvaljujući fenolnim hidroksilnim skupinama koje mogu biti lako oksidirane, a koja ih čini metom za daljnja istraživanja (Cherrak i sur., 2016).



Slika 5. Opća struktura različitih flavonoida (Pekal i Pyrzynska, 2014)

1.4.1. Najčešće primjenjivane metode u određivanju flavonoida

Jedna od najčešće korištenih metoda u određivanju ukupnih flavonoida je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na stvaranju aluminijevog kompleksa pri dodatku otopine aluminijevog klorida u uzorak. Ovu metodu prvi su za analizu biljnog materijala predložili Christ i Müller 1960. godine te je kasnije bila nekoliko puta modificirana. Budući da danas ne postoji jedinstvena metoda za određivanje sadržaja svih flavonoida preporučuje se nekoliko metoda.

Prva često korištena metoda temelji se na dodatku otopine aluminijevog klorida u koncentraciji od 2-10% u ispitivani uzorak. Nakon toga, dodaje se kiselina ili otopina acetata, a u nekim slučajevima samo voda ili metanol. Mjerenje apsorbancije provodi se nakon 2 do 60 minuta od inkubacije na valnoj duljini između 404-430 nm. Kao standard u ovoj metodi koriste se različiti flavonoli (kvercetin, rutin, galangin) te flavan-3-ol katehin. Ova metoda se pokazala kao selektivna samo u određivanju različitih flavonola te flavona luteolina. Temelji se na tome da $AlCl_3$ formira stabilne komplekse s C3 i C5 hidroksilnim skupinama te dihidroksilnom grupom u B prstenu pri čemu nastaje žuta boja.

Druga često korištena metoda temelji se na stvaranju kompleksa u prisutnosti natrijevog nitrita ($NaNO_2$) u alkalnom mediju dodatkom (NaOH). Dodatkom $NaNO_2$ u uzorak dolazi do nitriranja aromatskih prstenova koji u svojoj strukturi imaju kateholnu skupinu koja na tri ili četiri mjesta nije supstituirana ili sterički ometena. Nakon dodatka Al(III) formira se žuto obojeni kompleks koji dodatkom NaOH poprima crvenu boju. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini 510 nm. U ovoj metodi preferira se korištenje katehina kao standarda. Ova metoda pokazala se kao selektivna u određivanju rutina, luteolina i katehina (Pekal i Pyrzynska, 2014).

1.5. Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima. Može se provesti korištenjem otapala iz krutine ili neke druge tekućine koja sadrži željenu tvar.

Metode koje su se donedavno koristile za ekstrakciju, poput ekstrakcije organskim otapalima, vrućom vodom, lužinama i slično mogu uzrokovati degradaciju željenih komponenti zbog visokih temperatura, dugog vremena ekstrakcije ili loše određenih sigurnosnih kriterija tijekom zračenja. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenu, jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala.

Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini namirnice izložene otapalu, viskoznosti otapala i volumnom protoku otapala. Iz tih razloga pogodno je provođenje pri visokim temperaturama, ali ipak temperatura rijetko prelazi 100°C jer tada uglavnom dolazi do oštećenja željene supstancije ili ekstrakcije nepoželjnih tvari. Potrebno je usitnjavanje namirnica do određenog stupnja i homogenizacija za poboljšanje ekstrakcije. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može lako proći kroz sloj krutih čestica. Odabir otapala ovisi o vrsti komponente koja se želi ekstrahirati te ono ne smije reagirati s ekstraktom, treba imati dovoljno nisku viskoznost i stabilnost na visokoj temperaturi.

Kod ultrazvučne ekstrakcije prilikom prolaska zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi što dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije. Kao rezultat oscilacije tlaka u mediju dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića (kavitacija). koji uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije. U određenom trenutku kada mjehurić dosegne određenu kritičnu veličinu ne može više učinkovito apsorbirati energiju, a bez ulazne energije šupljina se ne može sama održavati pa mjehurići propadaju. Kod primjene ultrazvuka visoke snage, uslijed djelovanja kavitacija na stanični materijal, dolazi do bubrenja stanica te probijanja staničnih stijenki, što omogućuje brzu difuziju kroz staničnu stijenku i prodiranje otapala u materijal te jednostavnije ispiranje sastojaka stanice.

Uslijed pucanja staničnih stijenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice. Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena učinkovitost (Drmić i Režek Jambrak, 2010).



Slika 6. Ultrazvučna ekstrakcija biljnog materijala

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vrsta *Globularia alypum* pripada porodici Plantaginaceae. Rasprostranjena je u mediteranskom području, u Europi i sjeveroistočnoj Africi te se često koristi u narodnoj medicini država Sjeverne Afrike kao hipoglikemik, laksativ, diuretik i drugo. Bogata je različitim fenolnim i iridoidnim sastojcima što ju čini zanimljivom za daljnja istraživanja.

G. alypum u Hrvatskoj je nađena samo na jednom području u blizini Dubrovnika. U našim krajevima rastu još tri vrste iz istog roda: *G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata*.

Cilj ovoga diplomskog rada bila je usporedba sadržaja fenola i flavonoida ovih triju vrsta u odnosu na vrstu *G. alypum*, koja je do sad bila najbolje istražena. Kako bi se u obzir uzela moguća varijabilnost sekundarnih metabolita unutar svake od vrsta, uzorci srodnih vrsta sakupljeni su s više različitih lokacija u tri različite godine (2014., 2015. i 2016).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu istražene su sljedeće biljne vrste: *Globularia alypum* L., *Globularia cordifolia* L., *Globularia meridionalis* (Podp.) O.Schwarz i *Globularia punctata* Lapeyr. Biljni materijal je sakupljen s različitih prirodnih staništa u vrijeme cvatnje u tri uzastopne godine, a činili su ga nadzemni dijelovi osušeni na sobnoj temperaturi.

Tablica 1. Mjesto i vrijeme sabiranja uzoraka biljnih vrsta roda *Globularia*

Vrsta	Lokacija	2014.	2015.	2016.
G. alypum	Konavoske stijene	7. ožujka	29. ožujka	-
G. cordifolia	Velebit-Alan	-	2. lipnja	-
	Biokovo	-	10. svibnja	-
	Šestanovac	-	10. svibnja	7. svibnja
	Mostar, BIH	-	9. svibnja	7. svibnja
	Velebit-Baške Oštarije	-	2. lipnja	29. svibnja
G. meridionalis	Velebit-Baške Oštarije	-	2. lipnja	29. svibnja
	Istra-Mala Učka	-	7. lipnja	26. svibnja
	Dinara	-	31. svibnja	8. svibnja
	Grobničko polje	13. travnja	24. travnja	30. travnja
G. punctata	Grobničko polje	13. travnja	24. travnja	30. travnja
	Istra-Vižintini	-	25. travnja	30. travnja
	Medvednica-Vugrovec	-	25. travnja	16. travnja
	Žumberak-Slapnica	-	26. travnja	25. travnja
	Žumberak-Rude	-	26. travnja	25. travnja
	Dinara	-	30. svibnja	8. svibnja
	Velebit-Metla	-	-	22. svibnja

3.1.2. Kemikalije

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije:

1- Metanol (T.T.T., Hrvatska)
2- Folin-Ciocalteuov reagens (Kemika, Hrvatska)
3- Galna kiselina (Merck, Njemačka)
4- Natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Hrvatska)
5- Aluminijev klorid (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
6- Kvercetin (Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji:

1- Električni mlinac za kavu (Gorenje, Slovenija)
2- Analitička vaga PB303 DeltaRange (Mettler Toledo, SAD)
3- Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex Super (Bandelin electronic, Njemačka)
4- Magnetska mješalica s grijanjem Witeg (witeg Labortechnik GmbH & CO., Njemačka)
5- UV-VIS spektrofotometar T70 (PG Instruments,UK)

3.2. Metode ispitivanja

3.2.1. Priprema biljnog materijala

Osušeni listovi (približno 1-2 g) odvojeni su od ostalih biljnih dijelova i očišćeni od onečišćenja. Smeđi i crni listovi su bačeni, dok je ostatak biljnog materijala (cvijet+stabiljka) spremljen. Odvojeni listovi mljeveni su do praškaste konzistencije.



Slika 7. Primjer očišćenih listova četiri različite vrsta roda *Globularia* prije mljevenja (*G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*)

3.2.2. Priprema ekstrakata

0,5 g uzorka svake biljke stavljeno je u Erlenmeyerove tikvice te je dodano 5 mL metanola. Tikvice su zatim zatvorene parafilmom. Ekstrakcija je trajala 30 minuta (2*15 min) na UZV kupelji (na sobnoj temperaturi). Nakon ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani kroz filter papir i tanki sloj vate u čiste epruvete. Zatim je provedena druga ekstrakcija prije koje je bilo potrebno promijeniti vodu u UZV kupelji jer se tijekom prve ekstrakcije zagrijala. Vata i droga zaostala na filter papiru vraćene su u tikvice, ponovno je u svaku dodano 5 mL metanola i zatvorene su parafilmom. Druga ekstrakcija također je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz isti filter papir i tanki sloj vate. Zatim su prebačeni u odmjerne tikvice od 10,0 mL koje su potom nadopunjene metanolom do oznake. Ovako pripremljeni ekstrakti prebačeni su u prethodno označene Falconice od 15 mL koje su zatim zatvorene parafilmom i spremljene u hladnjak do daljnje upotrebe.



Slika 8. Ekstrakti spremljeni u označene Falconice nakon provedene ultrazvučne ekstrakcije

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola korištena je modificirana metoda temeljena na primjeni Folin-Ciocalteuovog reagensa (Singleton i Rossi, 1965).

Pripremljeno je desetorostruko razrijeđenje Folin-Ciocalteuovog (F-C) reagensa u odmjernoj tikvici od 250,0 mL (u dH_2O dodali smo 25 mL F-C reagensa i nadopunili vodom do oznake). Pripremljena je vodena otopina natrijevog karbonata dekahidrata, c = 18,75 g/250 mL uz lagano zagrijavanje (za brže i bolje otapanje). Nakon hlađenja otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 250,0 mL koja je potom nadopunjena vodom do oznake.
Pripremljena je metanolna otopina standarda galne kiseline, c = 1 mg/mL, V = 10 mL. Iz ove otopine pripremljeno je osam razrjeđenja s metanolom:
30 μg/mL (30 μL otopine standarda + 970 μL metanola)
40 μg/mL (40 μL otopine standarda + 960 μL metanola)
50 μg/mL (50 μL otopine standarda + 950 μL metanola)
60 μg/mL (60 μL otopine standarda + 940 μL metanola)
70 μg/mL (70 μL otopine standarda + 930 μL metanola)
80 μg/mL (80 μL otopine standarda + 920 μL metanola)
90 μg/mL (90 μL otopine standarda + 910 μL metanola)
100 μg/mL (100 μL otopine standarda + 900 μL metanola)

Ranije pripremljeni ekstrakti ispitivanih biljaka razrijeđeni su metanolom u omjeru 1:20. U 0,25 mL uzorka/standarda dodavano je 1,25 mL F-C reagensa i to u razmacima od 1 minute. Epruvete su promućkane te se nakon 5 minuta započelo s dodavanjem 1 mL otopine natrijevog karbonata dekahidrata u svaku od njih. Potom su epruvete ponovno promućkane te je provedena jednosatna inkubacija na sobnoj temperaturi (epruvete su tijekom inkubacije bile pokrivene aluminijskom folijom da bi se spriječilo isparavanje otapala). Svi uzorci pripremljeni su u triplikatu.

Nakon inkubacije boja uzoraka je bila sivo-plava. Apsorbancija na 765 nm najprije je izmjerena za destiliranu vodu koja je poslužila kao slijepa proba. Zatim je mjerena apsorbancija uzoraka istim redoslijedom kojim su bili priređivani (razmak od 1 min). Očekivana vrijednost apsorbancije iznosila je između 0,2 i 0,8.

3.2.4. Određivanje flavonoida

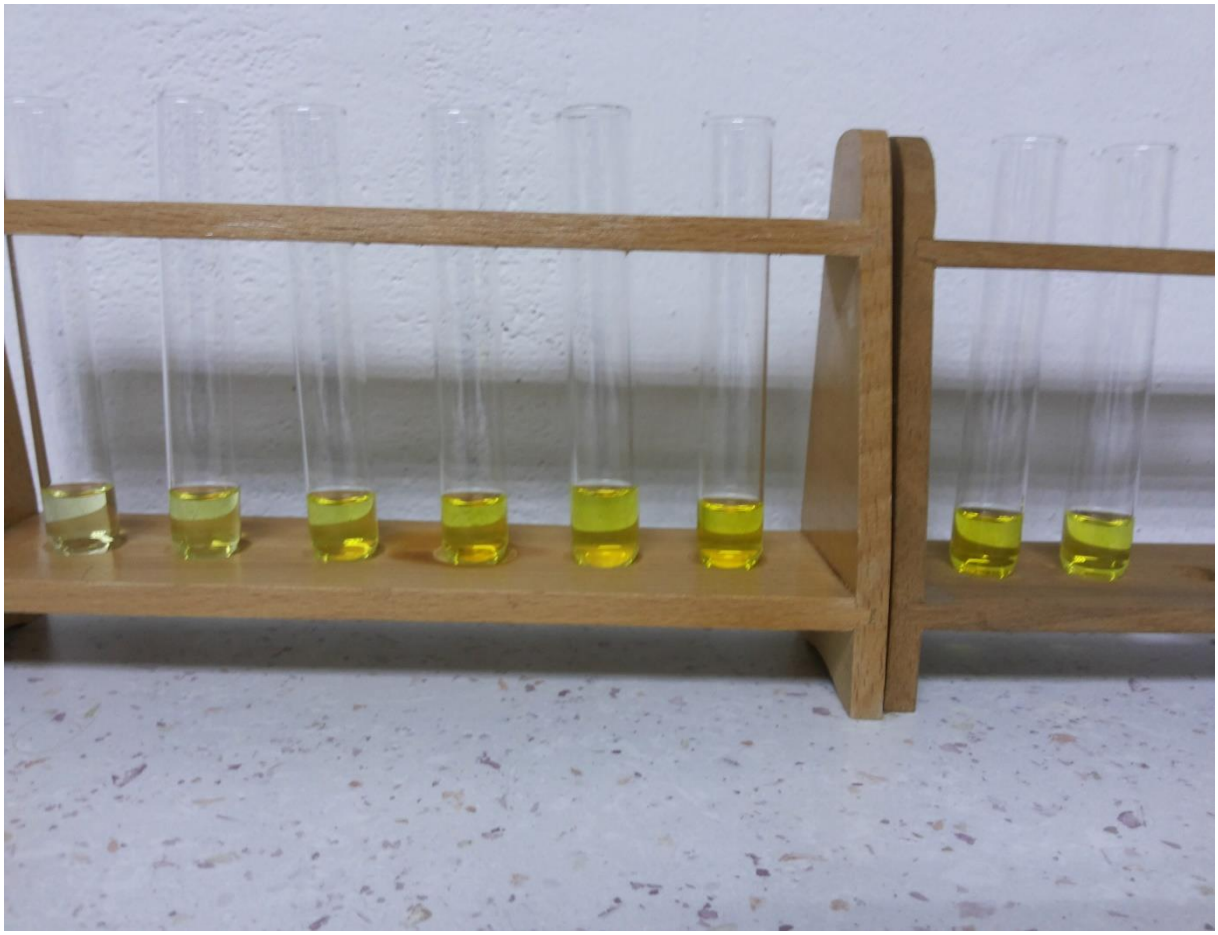
Za određivanje flavonoida korištena je metoda s aluminijevim kloridom (Arvouet-Grand i sur., 1994).

Pripremljena je metanolna otopina aluminijevog klorida, c = 5 g/250 mL uz lagano zagrijavanje. Nakon hlađenja otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 250,0 mL koja je potom nadopunjena metanolom do oznake.
Pripremljena je metanolna otopina standarda kvercetina, c = 0,1 mg/mL. Najprije je 0,02 g kvercetina otopljeno u metanolu i nadopunjeno do oznake u odmjernoj tikvici od 20,0 mL čime je dobivena otopina koncentracije 1 mg/mL. Zatim je 1 mL pripremljene otopine kvercetina razrijeđen s metanolom u odmjernoj tikvici od 10,0 mL. Iz ove otopine pripremljeno je osam razrjeđenja s metanolom u duplikatu (jedna slijepa proba za svaku koncentraciju uzorka):
5 μg/mL (50 μL otopine standarda + 950 μL metanola)
10 μg/mL (100 μL otopine standarda + 900 μL metanola)
15 μg/mL (150 μL otopine standarda + 850 μL metanola)
20 μg/mL (200 μL otopine standarda + 800 μL metanola)
25 μg/mL (250 μL otopine standarda + 750 μL metanola)
30 μg/mL (300 μL otopine standarda + 700 μL metanola)
35 μg/mL (350 μL otopine standarda + 650 μL metanola)
40 μg/mL (400 μL otopine standarda + 600 μL metanola)

Ranije pripremljeni ekstrakti ispitivanih biljaka razrijeđeni su metanolom u omjeru 1:20, odnosno 500 μL uzorka pomiješano je s 9500 μL metanola da bi dobili željeno razrjeđenje.
Pripremljena je slijepa proba uzorka/standarda:
1 ml uzorka/standarda + 1 mL metanola.
Pripremljen je uzorak (u triplikatu):
1 ml uzorka/standarda + 1 mL otopine aluminijevog klorida.
Reagens ($AlCl_3$) je dodavan u razmacima od 30 s između istih uzoraka i 1 min između različitih uzoraka. Inkubacija je provedena u trajanju od 15 minuta (epruvete su tijekom inkubacije bile pokrivene aluminijskom folijom da bi se spriječilo isparavanje otapala).

Nakon inkubacije boja uzoraka je bila žuta. Apsorbancija na 415 nm je najprije izmjerena za slijepu probu. 15 min nakon dodatka reagensa u prvi uzorak mjerena je apsorbancija uzoraka istim redosljedom kojim su bili priređivani u razmaku od 30 s.

Apsorbancija slijepe probe mjerena je prije svakog novog triplikata tj. za svako razrjeđenje kvercetina. Očekivana vrijednost apsorbancije iznosila je između 0,2 i 0,8.



Slika 9. Pripremljena razrjeđenja kvercetina tijekom inkubacije s $AlCl_3$

3.2.5. Statistička obrada podataka

Sva su mjerenja provedena u triplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Statistički značajne razlike između pojedinih skupina procijenjene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Tukeyev *post-hoc* test. Povezanost između sadržaja ukupnih fenola i sadržaja flavonoida ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije, r, uz razinu značajnosti $\alpha < 0,05$. Obrada podataka provedena je pomoću računalnih programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft) i GraphPad Prism 6.01 for Windows (GraphPad Software).

4. REZULTATI

4.1. Određivanje fenola

4.1.1. Baždarni pravac galne kiseline

Kao standard za određivanje fenola korištena je galna kiselina. Da bi se dobio baždarni pravac (Slika 10), izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija galne kiseline (Tablica 2).

Prema Beer-Lambertovom zakonu apsorbancija je proporcionalna koncentraciji:

$$A = \varepsilon * c * l$$

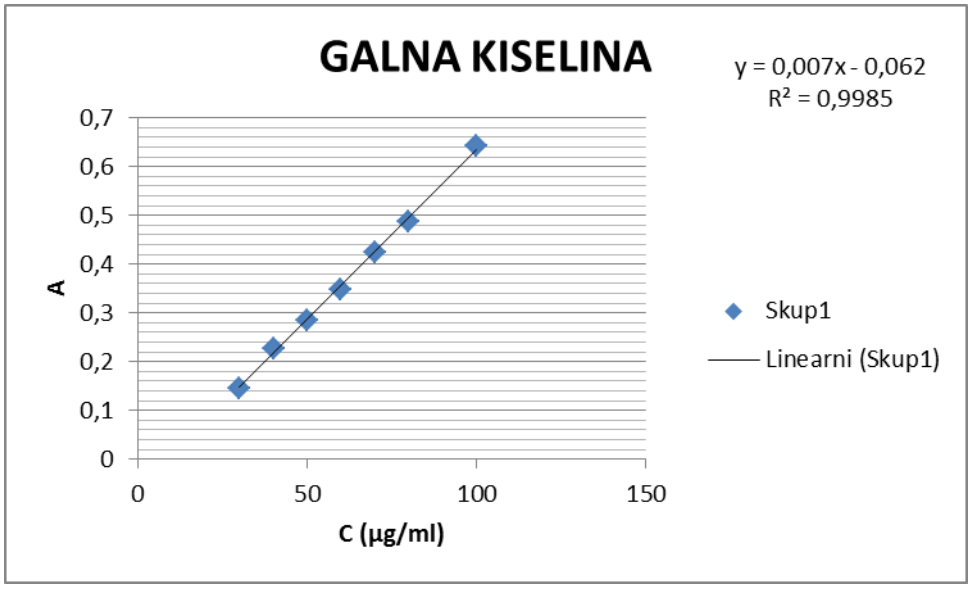
ε – ekstinkcijski koeficijent

c – koncentracija tvari u uzorku

l – duljina kivete kojom prolazi svjetlost

Tablica 2. Koncentracije i izmjerene apsorbancije galne kiseline

Koncentracija galne kiseline (μg/mL)	Apsorbancija
30	0,1456
40	0,2264
50	0,2856
60	0,3488
70	0,4242
80	0,4885
100	0,6420



Slika 10. Baždarni pravac galne kiseline

4.1.2. Sadržaj ukupnih fenola

U ovom radu sva mjerenja provedena su u triplikatu. Uzorcima je mjerena apsorbancija (Tablica 3) te se iz baždarnog pravca galne kiseline očitavala odgovarajuća koncentracija (Tablica 4).

Tablica 3. Apsorbancija ispitivanih uzoraka dobivenih metodom ultrazvučne ekstrakcije u reakciji s Folin-Ciocalteuovim reagensom

G. alypum	A1	A2	A3
Konavoske stijene (7.3.2014)	0,4269	0,4855	0,5039
Konavoske stijene (29.3.2015)	0,6453	0,6567	0,6620
G. cordifolia			
Velebit-Alan (2.6.2015)	0,3814	0,4181	0,4472
Biokovo (10.5.2015)	0,3129	0,3754	0,3536
Šestanovac (10.5.2015)	0,4040	0,4406	0,4642
Šestanovac (7.5.2016)	0,2745	0,3276	0,3289
Mostar, BIH (9.5.2015)	0,2448	0,2576	0,2555
Mostar, BIH (7.5.2016)	0,2347	0,2590	0,2699
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	0,2676	0,2508	0,2500
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	0,2725	0,3077	0,3245
G. meridionalis			
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	0,3187	0,3490	0,3764
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	0,2694	0,3000	0,3027
Istra-Mala Učka (7.6.2015)	0,1749	0,2103	0,2239
Istra-Mala Učka (26.5.2016)	0,2089	0,2113	0,2098
Dinara (31.5.2015)	0,2706	0,3100	0,3164
Dinara (8.5.2016)	0,2582	0,3020	0,3166
Grobničko polje (13.4.2014)	0,2088	0,2434	0,2532
Grobničko polje (24.4.2015)	0,3282	0,3809	0,3786
Grobničko polje (30.4.2016)	0,4243	0,4940	0,5051
G. punctata			
Grobničko polje (13.4.2014)	0,2797	0,2990	0,2944
Grobničko polje (24.4.2015)	0,2398	0,3022	0,2869
Grobničko polje (30.4.2016)	0,3250	0,3299	0,3349
Istra-Vižintini (25.4.2015)	0,2775	0,3290	0,3321
Istra-Vižintini (30.4.2016)	0,3777	0,3395	0,3821
Medvednica-Vugrovec (25.4.2015)	0,2867	0,3342	0,2670
Medvednica-Vugrovec (16.4.2016)	0,3212	0,3820	0,3565
Žumberak-Slapnica (26.4.2015)	0,4131	0,5079	0,4899
Žumberak-Slapnica (25.4.2016)	0,4486	0,4777	0,4700
Žumberak-Rude (26.4.2015)	0,3339	0,3571	0,3748
Žumberak-Rude (25.4.2016)	0,2238	0,2632	0,2349
Dinara (30.5.2015)	0,4084	0,4021	0,3977
Dinara (8.5.2016)	0,2069	0,2450	0,2530
Velebit-Metla (22.5.2016)	0,2298	0,2778	0,2763

Tablica 4. Koncentracije ispitivanih uzoraka dobivene ekstrapolacijom iz baždarnog pravca galne kiseline

G. alypum	c1 (μg/mL)	c2 (μg/mL)	c3 (μg/mL)
Konavoske stijene (7.3.2014)	69,84	78,21	80,84
Konavoske stijene (29.3.2015)	101,04	102,67	103,43
G. cordifolia			
Velebit-Alan (2.6.2015)	63,34	68,59	72,74
Biokovo (10.5.2015)	53,56	62,49	59,37
Šestanovac (10.5.2015)	66,57	71,80	75,17
Šestanovac (7.5.2016)	48,07	55,66	55,84
Mostar, BIH (9.5.2015)	43,83	45,66	45,36
Mostar, BIH (7.5.2016)	42,39	45,86	47,41
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	47,09	44,69	44,57
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	47,79	52,81	55,21
G. meridionalis			
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	54,39	58,71	62,63
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	47,34	51,71	52,10
Istra-Mala Učka (7.6.2015)	33,84	38,90	40,84
Istra-Mala Učka (26.5.2016)	38,70	39,04	38,83
Dinara (31.5.2015)	47,51	53,14	54,06
Dinara (8.5.2016)	45,74	52,00	54,09
Grobničko polje (13.4.2014)	38,69	43,63	45,03
Grobničko polje (24.4.2015)	55,74	63,27	62,94
Grobničko polje (30.4.2016)	69,47	79,43	81,01
G. punctata			
Grobničko polje (13.4.2014)	48,81	51,57	50,91
Grobničko polje (24.4.2015)	43,11	52,03	49,84
Grobničko polje (30.4.2016)	55,29	55,99	56,70
Istra-Vižintini (25.4.2015)	48,50	55,86	56,30
Istra-Vižintini (30.4.2016)	62,81	57,36	63,44
Medvednica-Vugrovec (25.4.2015)	49,81	56,60	47,00
Medvednica-Vugrovec (16.4.2016)	54,74	63,43	59,79
Žumberak-Slapnica (26.4.2015)	67,87	81,41	78,84
Žumberak-Slapnica (25.4.2016)	72,94	77,10	76,00
Žumberak-Rude (26.4.2015)	56,56	59,87	62,40
Žumberak-Rude (25.4.2016)	40,83	46,46	42,41
Dinara (30.5.2015)	67,20	66,30	65,67
Dinara (8.5.2016)	38,41	43,86	45,00
Velebit-Metla (22.5.2016)	41,69	48,54	48,33

Budući da su ispitivani uzorci bili razrijeđeni metanolom u omjeru 1:20, dobivene vrijednosti koncentracija iz Tablice 4 moraju se pomnožiti s 20.

$$c' = c*20$$

Miligram ekvivalenti standarda galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM) dobiveni su preko sljedeće formule:

$$w = c'*V *0,001/m$$

c' – koncentracija ispitivanog uzorka prije razrjeđenja (μg/mL)

V – volumen otopine u kojoj je pripremljen uzorak (10 mL)

0,001 – faktor pretvorbe μg u mg

m – masa ispitivanog biljnog materijala (0,5 g)

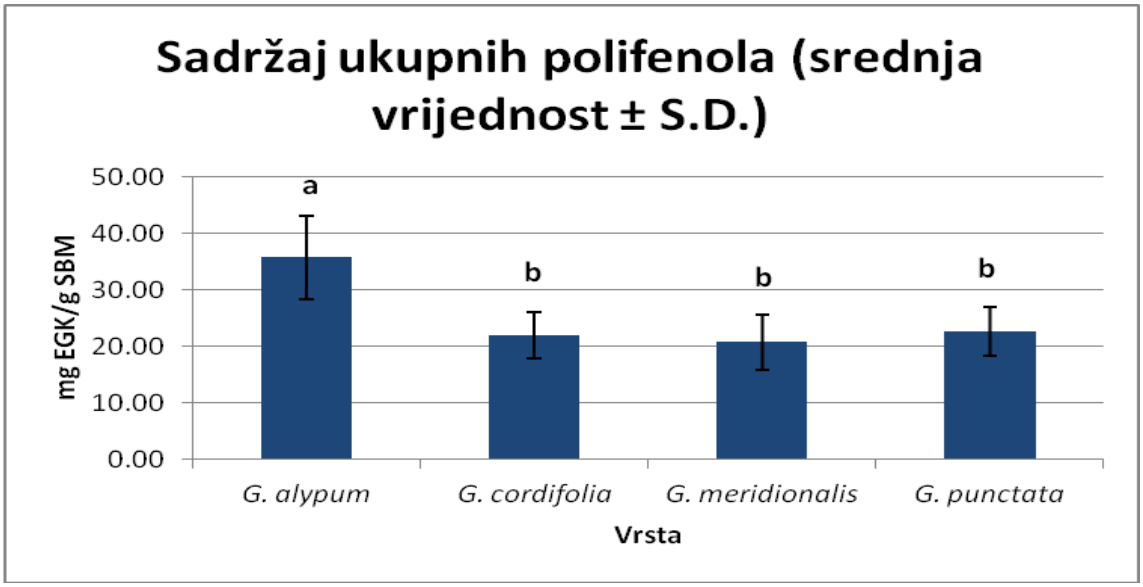
Ova formula primjenjuje se za sva 3 mjerenja te se potom izračuna srednja vrijednost za svaki uzorak:

$$w = (w1 + w2 + w3)/3$$

Tablica 5. Sadržaj ukupnih fenola u listovima vrsta roda *Globularia* koje su sakupljene s različitih lokacija u tri uzastopne sezone (srednja vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Vrsta	Lokacija	Sadržaj ukupnih fenola (mg EGK/g SBM)		
		2014.	2015.	2016.
G. alypum	Konavoske stijene	30,52 ± 2,30	40,95 ± 0,49	-
G. cordifolia	Velebit-Alan	-	27,29 ± 1,88	-
	Biokovo	-	23,39 ± 1,81	-
	Šestanovac	-	28,47 ± 1,73	21,28 ± 1,77
	Mostar, BIH	-	17,98 ± 0,39	18,09 ± 1,03
	Velebit-Baške Oštarije	-	18,18 ± 0,57	20,78 ± 1,52
G. meridionalis	Velebit-Baške Oštarije	-	23,43 ± 1,65	20,15 ± 1,06
	Istra-Mala Učka	-	15,14 ± 1,45	15,54 ± 0,07
	Dinara	-	20,63 ± 1,42	20,24 ± 1,74
	Grobničko polje	16,98 ± 1,33	24,26 ± 1,70	30,66 ± 2,50
G. punctata	Grobničko polje	20,17 ± 0,58	19,33 ± 1,86	22,40 ± 0,28
	Istra-Vižintini	-	21,42 ± 1,75	24,48 ± 1,34
	Medvednica-Vugrovec	-	20,46 ± 1,97	23,73 ± 1,74
	Žumberak-Slapnica	-	30,42 ± 2,88	30,14 ± 0,86
	Žumberak-Rude	-	23,84 ± 1,17	17,29 ± 1,16
	Dinara	-	26,56 ± 0,31	16,97 ± 1,41
	Velebit-Metla	-	-	18,47 ± 1,56

Prosječna vrijednost sadržaja ukupnih fenola (srednja vrijednost ± standardna devijacija) za svaku od istraživanih vrsta prikazana je na Slici 11.



Slika 11. Usporedba prosječnih vrijednosti sadržaja ukupnih fenola u različitim vrstama roda *Globularia* (vrijednosti naznačene različitim slovima se statistički značajno razlikuju)

Najveća prosječna količina fenola određena je u listovima vrste *G. alypum,* a iznosila je 35,74 ± 7,38 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala. Sadržaj fenola između ostalih istraživanih vrsta nije se značajno razlikovao, a iznosio je 21,93 ± 4,14 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala kod vrste *G. cordifolia,* 20,78 ± 4,89 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala kod vrste *G. meridionalis* i 22,55 ± 4,29 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala kod vrste *G. punctata*.

Za vrstu *G. cordifolia* maksimalni sadržaj ukupnih fenola u 2015. godini iznosio je 28,47 ± 1,73 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala (područje Šestanovca), dok je minimalni sadržaj iznosio 17,98 ± 0,39 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala (područje Mostara). U 2016. godini maksimalni sadržaj ukupnih fenola (21,28 ± 1,77 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala) uočen je također u biljnom materijalu s područja Šestanovca, dok je minimalni sadržaj (18,09 ± 1,03 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala) ponovno zabilježen za područje Mostara (BIH).

Kod vrste *G. meridionalis* maksimalni sadržaj fenola za 2015. godinu iznosio je 24,26 ± 1,70 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala, a određen je u uzorku s područja

Grobničkog polja, dok je za istu godinu najmanji sadržaj iznosio 15,14 ± 1,45 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala (područje Male Učke). Za 2016. godinu maksimalni sadržaj fenola, u iznosu od 30,66 ± 2,50 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala, nađen je ponovno u uzorku sabranom na području Grobničkog polja. Najmanji sadržaj fenola u 2016. godini ponovno je imao uzorak iz područja Male Učke, a iznosio je 15,54 ± 1,45 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala.

Kod vrste *G. punctata* za 2015. godinu najveći sadržaj fenola iznosio je 30,42 ± 2,88 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala, a određen je u uzorku iz područja Žumberačke Slapnice. Najmanji sadržaj nađen je u uzorku iz područja Grobničkog polja u iznosu od 19,33 ± 1,86 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala. Za 2016. godinu najveći sadržaj je nađen u uzorku iz područja Žumberačke Slapnice u iznosu od 30,14 ± 0,86 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala, dok je najmanji sadržaj fenola nađen u uzorku iz područja Dinare, a iznosio je 16,97 ± 1,41 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala.

4.2. Određivanje flavonoida

4.2.1. Baždarni pravac kvercetina

Kao standard za određivanje flavonoida korišten je kvercetin. Da bi se dobio baždarni pravac (Slika 12), izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija kvercetina (Tablica 6).

Prema Beer-Lambertovom zakonu apsorbancija je proporcionalna koncentraciji:

$$A = \varepsilon * c * l$$

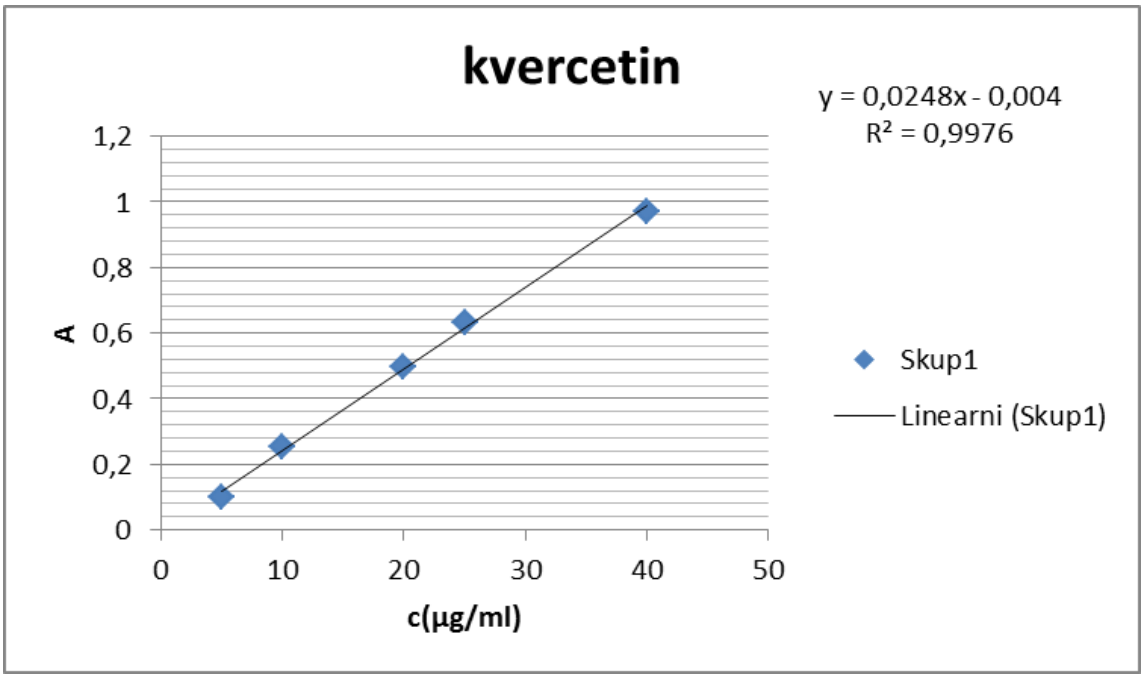
ε – ekstinkcijski koeficijent

c – koncentracija tvari u uzorku

l – duljina kivete kojom prolazi svjetlost

Tablica 6. Koncentracije i izmjerene apsorbancije kvercetina

Koncentracija kvercetina (μg/mL)	Apsorbancija
5	0,1004
10	0,2527
20	0,4986
25	0,6345
40	0,9725



Slika 12. Baždarni pravac kvercetina

4.2.2. Sadržaj flavonoida

U ovom radu sva mjerenja provedena su u triplikatu. Uzorcima je mjerena apsorbancija (Tablica 7) te se iz baždarnog pravca kvercetina očitavala odgovarajuća koncentracija (Tablica 8).

Tablica 7. Apsorbancije ispitivanih uzoraka dobivenih metodom ultrazvučne ekstrakcije u reakciji s AlC_3

G. alypum	A1	A2	A3
Konavoske stijene (7.3.2014)	0,3372	0,3388	0,3354
Konavoske stijene (29.3.2015)	0,4563	0,4613	0,4645
G. cordifolia			
Velebit-Alan (2.6.2015)	0,3156	0,3137	0,3183
Biokovo (10.5.2015)	0,2624	0,2605	0,2640
Šestanovac (10.5.2015)	0,3988	0,4005	0,4043
Šestanovac (7.5.2016)	0,2840	0,2863	0,2875
Mostar, BIH (9.5.2015)	0,2559	0,2582	0,2637
Mostar, BIH (7.5.2016)	0,2672	0,2719	0,2743
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	0,4277	0,4098	0,4092
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	0,2992	0,3005	0,3007
G. meridionalis			
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	0,3040	0,3220	0,3139
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	0,3019	0,3133	0,3047
Istra-Mala Učka (7.6.2015)	0,1559	0,1575	0,1586
Istra-Mala Učka (26.5.2016)	0,2303	0,2331	0,2346
Dinara (31.5.2015)	0,2207	0,2243	0,2282
Dinara (8.5.2016)	0,3141	0,3202	0,3275
Grobničko polje (13.4.2014)	0,2271	0,2305	0,2331
Grobničko polje (24.4.2015)	0,2851	0,2888	0,2880
Grobničko polje (30.4.2016)	0,3882	0,4012	0,4084
G. punctata			
Grobničko polje (13.4.2014)	0,3799	0,3865	0,3923
Grobničko polje (24.4.2015)	0,3240	0,3242	0,3271
Grobničko polje (30.4.2016)	0,4366	0,4401	0,4486
Istra-Vižintini (25.4.2015)	0,3679	0,3683	0,3689
Istra-Vižintini (30.4.2016)	0,4796	0,4861	0,4805
Medvednica-Vugrovec (25.4.2015)	0,3589	0,3641	0,3656
Medvednica-Vugrovec (16.4.2016)	0,4357	0,4389	0,4345
Žumberak-Slapnica (26.4.2015)	0,6729	0,6792	0,6830
Žumberak-Slapnica (25.4.2016)	0,7160	0,7242	0,7334
Žumberak-Rude (26.4.2015)	0,4691	0,4829	0,4817
Žumberak-Rude (25.4.2016)	0,3453	0,3510	0,3543
Dinara (30.5.2015)	0,3743	0,3921	0,3977
Dinara (8.5.2016)	0,2891	0,2970	0,2947
Velebit-Metla (22.5.2016)	0,3606	0,3659	0,3704

Tablica 8. Koncentracije ispitivanih uzoraka dobivene ekstrapolacijom iz baždarnog pravca kvercetina

G. alypum	c1 (μg/mL)	c2 (μg/mL)	c3 (μg/mL)
Konavoske stijene (7.3.2014)	13,76	13,82	13,69
Konavoske stijene (29.3.2015)	18,56	18,76	18,89
G. cordifolia			
Velebit-Alan (2.6.2015)	12,89	12,81	13,00
Biokovo (10.5.2015)	10,74	10,67	10,81
Šestanovac (10.5.2015)	16,24	16,31	16,46
Šestanovac (7.5.2016)	11,61	11,71	11,75
Mostar, BIH (9.5.2015)	10,48	10,57	10,79
Mostar, BIH (7.5.2016)	10,94	11,13	11,22
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	17,41	16,69	16,66
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	12,23	12,28	12,29
G. meridionalis			
Velebit-Baške Oštarije (2.6.2015)	12,42	13,15	12,82
Velebit-Baške Oštarije (29.5.2016)	12,33	12,79	12,45
Istra-Mala Učka (7.6.2015)	6,45	6,51	6,56
Istra-Mala Učka (26.5.2016)	9,45	9,56	9,62
Dinara (31.5.2015)	9,06	9,21	9,36
Dinara (8.5.2016)	12,83	13,07	13,37
Grobničko polje (13.4.2014)	9,32	9,46	9,56
Grobničko polje (24.4.2015)	11,66	11,81	11,77
Grobničko polje (30.4.2016)	15,81	16,34	16,63
G. punctata			
Grobničko polje (13.4.2014)	15,48	15,75	15,98
Grobničko polje (24.4.2015)	13,23	13,23	13,35
Grobničko polje (30.4.2016)	17,77	17,91	18,25
Istra-Vižintini (25.4.2015)	15,00	15,01	15,04
Istra-Vižintini (30.4.2016)	19,50	19,76	19,54
Medvednica-Vugrovec (25.4.2015)	14,63	14,84	14,90
Medvednica-Vugrovec (16.4.2016)	17,73	17,86	17,68
Žumberak-Slapnica (26.4.2015)	27,29	27,55	27,70
Žumberak-Slapnica (25.4.2016)	29,03	29,36	29,73
Žumberak-Rude (26.4.2015)	19,08	19,63	19,58
Žumberak-Rude (25.4.2016)	14,08	14,31	14,45
Dinara (30.5.2015)	15,25	15,97	16,20
Dinara (8.5.2016)	11,82	12,14	12,04
Velebit-Metla (22.5.2016)	14,70	14,92	15,10

Ispitivani uzorci bili su razrijeđeni metanolom u omjeru 1:20, pa se vrijednosti koncentracija iz Tablice 8 moraju pomnožiti s 20.

$$c' = c*20$$

Miligram ekvivalenti standarda kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM) dobiveni su preko sljedeće formule:

$$w = c'*V *0,001/m$$

c' – koncentracija ispitivanog uzorka prije razrijeđenja (μg/mL)

V – volumen otopine u kojoj je pripremljen uzorak (10 mL)

0,001 – faktor pretvorbe μg u mg

m – masa ispitivanog biljnog materijala (0,5 g)

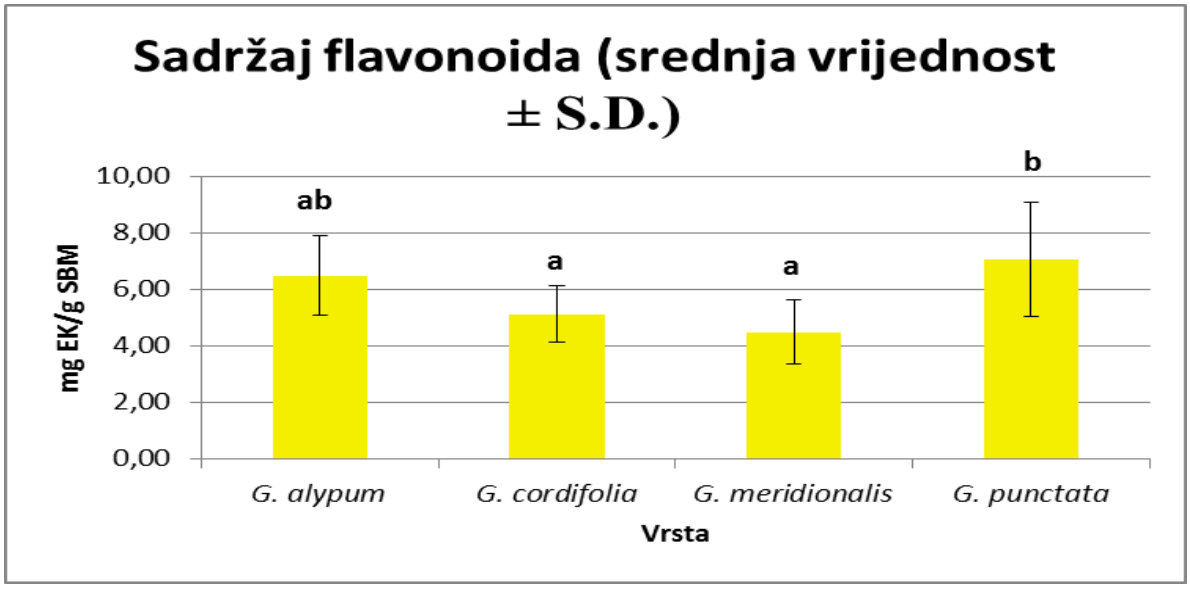
Ova formula primjenjuje se za sva 3 mjerenja te se potom izračuna aritmetička vrijednost za svaki uzorak:

$$w = (w1 + w2 + w3)/3$$

Tablica 9. Sadržaj flavonoida u listovima vrsta roda *Globularia* koje su sakupljene s različitih lokacija u tri uzastopne sezone (srednja vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

Vrsta	Lokacija	Sadržaj flavonoida (mg EK/g SBM)		
		2014.	2015.	2016.
G. alypum	Konavoske stijene	5,50 ± 0,03	7,50 ± 0,07	-
G. cordifolia	Velebit-Alan	-	5,16 ± 0,04	-
	Biokovo	-	4,30 ± 0,03	-
	Šestanovac	-	6,54 ± 0,05	4,68 ± 0,03
	Mostar, BIH	-	4,25 ± 0,06	4,44 ± 0,06
	Velebit-Baške Oštarije	-	6,77 ± 0,17	4,91 ± 0,01
G. meridionalis	Velebit-Baške Oštarije	-	5,12 ± 0,15	5,01 ± 0,10
	Istra-Mala Učka	-	2,60 ± 0,02	3,82 ± 0,04
	Dinara	-	3,68 ± 0,06	5,24 ± 0,11
	Grobničko polje	3,78 ± 0,05	4,70 ± 0,03	6,50 ± 0,17
G. punctata	Grobničko polje	6,29 ± 0,10	5,31 ± 0,03	7,19 ± 0,10
	Istra-Vižintini	-	6,01 ± 0,01	7,84 ± 0,06
	Medvednica-Vugrovec	-	5,92 ± 0,06	7,10 ± 0,04
	Žumberak-Slapnica	-	11,01 ± 0,08	11,75 ± 0,14
	Žumberak-Rude	-	7,77 ± 0,12	5,71 ± 0,07
	Dinara	-	6,32 ± 0,20	4,80 ± 0,07
	Velebit-Metla	-	-	5,96 ± 0,08

Prosječna vrijednost sadržaja flavonoida (srednja vrijednost ± standardna devijacija) za svaku od istraživanih vrsta prikazana je na Slici 13.



Slika 13. Usporedba prosječnih vrijednosti sadržaja flavonoida u različitim vrstama roda *Globularia* (vrijednosti naznačene različitim slovima se statistički značajno razlikuju)

Najveća prosječna količina flavonoida određena je u vrsti *G. punctata*, a iznosila je 7,07 ± 2,03 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala. Vrste *G. cordifolia* (5,13 ± 0,99 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala) i *G. meridionalis* (4,49 ± 1,15 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala) sadržavale su značajno manju količinu flavonoida, dok se sadržaj flavonoida vrste *G. alypum* (6,50 ± 1,41 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala) nije značajno razlikovao od sadržaja ostalih istraživanih vrsta.

Kod vrste *G. cordifolia* najveći sadržaj flavonoida u 2015. godini iznosio je 6,77 ± 0,17 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku iz područja Baške Oštarije, dok je najmanji sadržaj u istoj godini iznosio 4,25 ± 0,06 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku s područja Mostara (BIH). U 2016. godini najveći sadržaj flavonoida iznosio je 4,91 ± 0,01 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala (područje Baških Oštarija), a najmanji sadržaj flavonoida bio je 4,44 ± 0,06 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala te je ponovno utvrđen u uzorku s područja Mostara (BIH).

Kod vrste *G. meridionalis* u 2015. godini najveći iznos flavonoida zabilježen je u uzorku iz područja Baških Oštarija, a iznosio je 5,12 ± 0,15 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala, dok je najmanje flavonoida zabilježeno za uzorak iz područja Male Učke (2,60 ± 0,02 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala). U 2016. godini najveći sadržaj flavonoida je nađen u uzorku iz područja Grobničkog polja u iznosu od 6,50 ± 0,17 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala, dok je najmanji iznos (3,82 ± 0,04 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala) ponovno zabilježen za uzorak s područja Male Učke.

Kod vrste *G. punctata* u 2015. godini najveći sadržaj flavonoida određen je u uzorku iz područja Žumberačke Slapnice, a iznosio je 11,01 ± 0,08 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala. Iste godine, najmanji sadržaj flavonoida nađen je u uzorku iz područja Grobničkog polja u iznosu od 5,31 ± 0,03 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala. U 2016. godini najveći sadržaj flavonoida iznosio je 11,75 ± 0,14 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala, ponovno u uzorku iz područja Žumberačke Slapnice. Najmanji sadržaj flavonoida iznosio je 4,80 ± 0,07 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku iz područja Dinare.

5. RASPRAVA

Od istraživanih vrsta roda *Globularia*, *G. alypum* najbolje je istražena. U istraživanju Djeridane-a i suradnika ekstrahirana količina fenola dobivena analizom 70%-tnog etanolnog ekstrakta vrste *G. alypum* pripremljenog 24-satnom maceracijom iznosila je 21,54 ± 0,81 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala (Djeridane i sur., 2006). U istraživanju Khlifi-ja i suradnika ekstrahirana količina fenola iznosila je od 8,5 ± 0,1 do 139,95 ± 3,4 g ekvivalenta galne kiseline/kg suhog ekstrakta (Khlifi i sur., 2011). Usporedba fitokemijskog profila metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova sve četiri istraživane vrste pokazala je da vrsta *G. alypum* sadrži brojne polifenole koji su karakteristični samo za ovu vrstu kao što su feniletanoidi kalceolariozid A i B, deoksirozikazid A, galipumozid B kao i specifične iridoide (6-*O*-estere katalpola s fenolnim kiselinama, primjerice verminozid) (Friščić i sur., 2016), kojima bi se mogao objasniti njezin povišeni sadržaj fenolnih spojeva zabilježen u okviru ovog rada.

Kvalitativna analiza koju su proveli Friščić i sur. (2016), ukazuje na to da između vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* postoje određene razlike u kemijskom sastavu. Iako sve četiri vrste sadrže iste flavonoide kao što su 6-hidroksiluteolin 7-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukozid i apigenin, pokazalo se da vrsta *G. alypum* sadrži specifične glikozide apigenina. Kod vrste *G. punctata* nađeni su specifični flavonoidi (acilirani derivati 6-*O*-hidroksiluteolin 7-diglukozida, izokvercitrin i luteolin), što ide u prilog uočenim povišenim vrijednostima sadržaja flavonoida kod ove vrste. S druge strane, kod vrsta *G. meridionalis* i *G. cordifolia* nađeni su metoksilirani flavoni (Friščić i sur., 2016).

Između sadržaja ukupnih fenola i sadržaja flavonoida uočena je dobra pozitivna povezanost (r = 0,60), koja je bila statistički značajna ($P < 0,05$). Usporedbom različitih populacija vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* čiji uzorci su bili sabrani u 2015. i 2016. godini istaknule su se pojedine populacije s najvećim, odnosno najmanjim sadržajem ukupnih fenola i flavonoida. Populacija vrste *G. cordifolia* s područja Mostara (BIH) bila je najsiromašnija fenolima i flavonoidima, kao i populacija vrste *G. meridionalis* s područja Male Učke. Fenolima najbogatiji bili su uzorci vrste *G. cordifolia* sakupljeni na području Šestanovca i uzorci vrste *G. meridionalis* sakupljeni na području Grobničkog polja. Uzorci obje vrste sakupljeni 2015. godine na području Baških Oštarija bili su najbogatiji flavonoidima, kao i uzorci vrste *G. cordifolia* sakupljeni 2016. godine. Populacija vrste *G. punctata* s područja Žumberačke Slapnice u obje je sezone bila najbogatija fenolima i flavonoidima.

Iz rezultata je također uočljivo da je sadržaj fenola i flavonoida u različitim populacijama vrsta roda *Globularia* u 2015. i 2016. godini značajno varirao. Na sadržaj polifenola i flavonoida u biljkama mogu utjecati brojni čimbenici: razlika u genetici i vrsti, sastavu tla, uvjetima rasta, zrelosti i uvjetima nakon sakupljanja biljnog materijala (Yao i sur., 2004; Ozcan i sur., 2014). Prema nekim autorima, postoji jaka veza između temperature i razine fenola u tkivima biljaka U jednom istraživanju utvrđeno je kako niže temperature uzrokuju visoke koncentracije fenolnih spojeva. Povišene razine fenola u listovima mogu biti povezane s povišenom aktivnošću fenilalanin amonij liaze (PAL) pri nižim temperaturama, s obzirom da je amonij liaza važan enzim u biogenezi različitih fenolnih spojeva (Padda i Picha, 2008).

Prema istraživanjima utjecaja vanjskih čimbenika na sadržaj fenola i flavonoida u listovima biljke *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. u Brazilu, utvrđeno je također da temperatura ima utjecaj na sadržaj polifenola u biljci (Sampaio i sur., 2011). Prema ovom istraživanju, visoke temperature inhibiraju proces fotosinteze u listovima. Budući da je sinteza sekundarnih metabolita ovisna o produktima fotosinteze (metabolizam glukoze), to u konačnici dovodi do smanjene razine polifenola u mjesecima s visokim temperaturama. Uzorci svih istraživanih vrsta sakupljeni su u doba cvatnje. U skladu s rezultatima prethodnih istraživanja, povišeni sadržaj ukupnih fenola kod vrste *G. alypum* mogao bi biti povezan s njezinom ranijom cvatnjom u usporedbi s ostalim istraživanim vrstama.

Prema istraživanju Sampaio i sur. (2011) otkriveno je kako hranjivost i plodnost tla imaju mali utjecaj na proizvodnju fenolnih komponenti u listovima *L. pacari*. Folijarni mikroelementi, kao što su fosfor, magnezij i sumpor, mogu utjecati na sintezu fenola. Ovi elementi uključeni su u proces fotosinteze, stanične respiracije i sinteze fosfolipida. Za sintezu fenolnih komponenti važni su i mangan i cink, koji su u proces sinteze i pretvorbe fenola uključeni kao kofaktori enzima (Sampaio i sur., 2011). Ovime bi se moglo objasniti smanjeni sadržaj sekundarnih metabolita kod pojedinih uzoraka, primjerice onih s područja Mostara i Male Učke. Oba su područja bila izrazito kamenita te je moguće pretpostaviti da su podložnija ispiranju tla uslijed pojačanih oborina, a s obzirom na smještaj u koritu rijeke Neretve (Mostar), odnosno s obzirom na općenito smanjenju vegetaciju na području Mala Učka.

U istraživanju ukupnih fenolnih tvari u sortnim istarskim maslinovim uljima koje su proveli Šindrak i sur., utvrđen je veći udio fenolnih tvari u uljima u uvjetima oskudice vode, odnosno što je dugotrajnije sušno razdoblje tijekom rasta i dozrijevanja plodova, dok je u kišnoj godini

sadržaj fenolnih komponenti bio manji (Šindrak i sur., 2007). U skladu s ovim rezultatima, smanjeni sadržaj fenolnih spojeva i flavonoida uočen je kod populacije vrste *G. cordifolia* s područja Mostara, koja je rasla u području relativno veće vlažnosti.

Starost materijala, vrijeme i temperatura skladištenja imaju utjecaj na totalni sadržaj fenola u materijalu. Istraživanje koje su proveli Klimczak i sur. (2007) pokazalo je izrazito smanjenje u sadržaju ukupnih polifenola određenih Folin-Ciocalteuovim reagensom u soku od naranče tijekom šestomjesečnog skladištenja na temperaturama od 18, 28 i 38 °C (Klimczak i sur., 2007). Rezultati dobiveni u okviru ovog istraživanja također ukazuju na moguće smanjenje sadržaja fenola i flavonoida tijekom duljeg skladištenja, imajući na umu da su uzorci sabrani 2014. godine imali manji sadržaj sekundarnih metabolita od uzoraka sabranih 2015. i/ili 2016. godine na istim lokacijama.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu istražen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida metanolnih ekstrakata listova vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* čiji materijal je sakupljen u tri različite sezone (2014., 2015. i 2016.) s različitih lokacija na kojima su ove vrste prirodno prisutne. Metoda koja je korištena za pripremu ekstrakata bila je ultrazvučna ekstrakcija.

Iznos ukupnih fenola kretao se između 15,14 ± 1,45 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. meridionalis* iz područja Male Učke i 40,95 ± 0,49 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. alypum* iz područja Konavoske stijene.

Iznos flavonoida kretao se između 2,60 ± 0,02 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. meridionalis* iz područja Male Učke i 11,75 ± 0,14 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. punctata* iz područja Žumberačke Slapnice.

Fenolnim spojevima bili su najbogatiji listovi vrste *G. alypum*, dok je vrsta *G. punctata* sadržavala nešto veću količinu flavonoida. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da okolišni i genetski faktori značajno utječu na koncentraciju fenola i flavonoida u vrstama roda *Globularia*. S obzirom na povišeni sadržaj sekundarnih metabolita, populacija vrste *G. cordifolia* s područja Šestanovca, vrste *G. meridionalis* s područja Grobničkog polja i vrste *G. punctata* s područja Slapnice, istaknule su se kao najbolji kandidati za buduća istraživanja.

7. LITERATURA

Amessis-Ouchemoukh N, Abu-Reidah IM, Quirantes-Pine R, Rodriguez-Perez C, Madani K, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivates from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochem Anal*, 2014, 25, 389-398.

Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J Pharm Belg*, 1994, 49, 462–468.

Cherrak SA, Mokhtari-Soulimane N, Berroukeche F, Bensenane B, Cherbonnel A, Merzouk H, Elhabiri M. *In vitro* antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: a structure-activity investigation. *PLoS One*, 2016, 11, 1-21.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 2006, 97, 654-660.

Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol*, 2010, 2, 22-33.

Feriani A, del Mar Contreras M, Talhaoui N, Gómez-Caravaca AM, Taamalli A, Segura-Carretero A, Ghazouani L, El Feki A, Allagui MS. Protective effect of *Globularia alypum* leaves against deltamethrin induced nephrotoxicity in rats and determination of its bioactive compounds using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J Funct Foods*, 2017, 32, 139-148.

Friščić M, Bucar F, Hazler Pilepić K. LC-PDA-ESI-MS^n analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. *J Mass Spectrom*, 2016, 51, 1211-1236.

Globularia L., http://hirc.botanic.hr/fcd, pristupljeno 26.12.2016.

Globularia alypum L., www.florealpes.com, pristupljeno 28.3.2017.

Globularia cordifolia L./*Globularia meridionalis* (Podp.) O.Schwarz, luirig.altervista.org, pristupljeno 26.12.2016.

Globularia punctata Lapyer, https://commons.wikimedia.org, pristupljeno 26.12.2016.

Kadereit JW. Flowering Plants. Dicotyledons: Lamiales (Except Acanthaceae Including Avicenniaceae). Heidelberg, Springer Science & Business Media, 2004, str. 159-161.

Khlifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard JP, Couderc F, Bouajila J. Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves. *Molecules*, 2011, 16, 10592-10603.

Khlifi D, Rabiaa Manel S, Dhafer L, Al Akrem H, Moktar H, Jalloul B. Anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibition activities of *Globularia alypum*. *J Med Bioeng*, 2013, 2, 232-237.

Klimczak I, Malecka M, Szlachta M, Gliszczyńska-Świgło A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Comp Anal*, 2007, 20, 313-322.

Kušan F. Folia Alypi i vrste roda *Globularia* u Hrvatskoj. *Vjesnik Ljekarnika*, 1943, str. 29-32.

Kuštrak D. Farmakognozija-Fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str. 408-409.

Ozcan T, Akpinar-Bayizit A, Yilmaz-Ersan L, Delikanli B. Phenolics in human health. *Int J Chem Eng Appl*, 2014, 5, 393-396.

Padda MS, Picha DH. Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweet potato genotypes. *Sci Hort*, 2008, 119, 17-20.

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

Pekal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal Methods*, 2014, 7, 1776-1782.

Sampaio BL, Bara MTF, Ferri PH, Santos SC, Paula JR. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Rev Bras Farmacogn*, 2011, 21, 1127-1137.

Sanchez-Rangel JC, Benavides J, Basilio Heredia J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velazques DA. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods*, 2013, 5, 5990-5999.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16, 144-158.

Šugar I. Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske. Zagreb, Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša, 1994, str. 231-232.

Šindrak Z, Benčić Đ, Voća S, Barberić A. Total phenols in varietal olive oils from Istria. *Pomologia Croatica*, 2007, 13, 17-29.

Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Loizza MR, Conforti F, Statti G, Pirisi FM, Menichini F. Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. *Nat Prod Commun*, 2012, 7, 1015-1020.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentina DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europa Vol. 3. Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 282-283.

Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr*, 2004, 59, 113-122.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. Sažetak

Vrste roda *Globularia* pripadaju porodici Plantaginaceae. Rasprostranjene su u mediteranskom području, od kuda se šire prema sjevernoj Europi i sjeveroistočnoj Africi. *Globularia alypum* jedna je od najčešće primjenjivanih biljaka u narodnoj medicini država Sjeverne Afrike. Listovi te biljke često se koriste kao hipoglikemik, laksativ, diuretik, purgativ, za smirenje želučanih tegoba te u liječenju hemoroida i kardiovaskularnih bolesti. Danas se najviše istražuje njihovo protuupalno i antioksidativno djelovanje. Najvažnije tvari koje su odgovorne za djelovanje su polifenoli, flavonoidi i iridoidi. U ovom radu istražen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida metanolnih ekstrakata listova vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* čiji materijal je sakupljen u tri različite sezone (2014., 2015. i 2016.) s različitih lokacija na kojima su ove vrste prirodno prisutne. Metoda koja je korištena za pripremu ekstrakata bila je ultrazvučna ekstrakcija.

Iznos ukupnih fenola kretao se između 15,14 ± 1,45 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. meridionalis* iz područja Male Učke i 40,95 ± 0,49 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. alypum* iz područja Konavoske stijene. Iznos flavonoida kretao se između 2,60 ± 0,02 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. meridionalis* iz područja Male Učke i 11,75 ± 0,14 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. punctata* iz područja Žumberačke Slapnice. Fenolnim spojevima bili su najbogatiji listovi vrste *G. alypum*, dok je vrsta *G. punctata* sadržavala nešto veću količinu flavonoida. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da okolišni i genetski faktori značajno utječu na koncentraciju fenola i flavonoida u vrstama roda *Globularia*. S obzirom na povišeni sadržaj sekundarnih metabolita, populacija vrste *G. cordifolia* s područja Šestanovca, vrste *G. meridionalis* s područja Grobničkog polja i vrste *G. punctata* s područja Slapnice, istaknule su se kao najbolji kandidati za buduća istraživanja.

8.2. Summary

Species of the genus *Globularia* belong to the family Plantaginaceae. They are widespread in the Mediterranean area from where they expand to northern Europe and northeastern Africa. *Globularia alypum* is one of the most widely applied plants in folk medicine of North African countries. Leaves of this plant are often used as a hypoglycemic, laxative, diuretic, purgative, for calming stomach problems and in the treatment of hemorrhoids and cardiovascular diseases. Today, their most investigated effects are anti-inflammatory and antioxidant. The most important substances responsible for the action are polyphenols, flavonoids and iridoids. In this thesis, total phenolic and flavonoid content of methanolic extracts from leaves of the species *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*, whose material was collected in three different seasons (2014, 2015 and 2016) from different locations in which these species are normally present, were compared. The method used for the preparation of extracts was ultrasonic extraction.

The amount of total phenols ranged between 15.14 ± 1.45 mg gallic acid equivalent/g dry plant material in *G. meridionalis* from the area Mala Učka and 40.95 ± 0.49 mg gallic acid equivalent/g dry plant material in *G. alypum* collected from the area of Konavoske stijene. The amount of flavonoids ranged between 2.60 ± 0.02 mg quercetin equivalent/g dry plant material in *G. meridionalis* from the area of Mala Učka and 11.75 ± 0.14 mg quercetin equivalent/g dry plant material in *G. punctata* from the area of Žumberačka Slapnica. Leaves of the species *G. alypum* were richest in phenolic compounds, while the species *G. punctata* contained a somewhat higher amount of flavonoids. From the obtained results it can be concluded that environmental and genetic factors greatly affect the concentration of phenols and flavonoids in species of the genus *Globularia*. Due to the high content of secondary metabolites, population of the species *G. cordifolia* from the area of Šestanovac, *G. meridionalis* from the area of Grobničko polje and *G. punctata* from the area of Slapnica, distinguished themselves as the best candidates for future research.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

SADRŽAJ FENOLA I FLAVONOIDA METANOLNIH EKSTRAKATA LISTOVA VRSTA RODA *GLOBULARIA*

Suzana Hariri

SAŽETAK

Vrste roda *Globularia* pripadaju porodici Plantaginaceae. Rasprostranjene su u mediteranskom području, od kuda se šire prema sjevernoj Europi i sjeveroistočnoj Africi. *Globularia alypum* jedna je od najčešće primjenjivanih biljaka u narodnoj medicini država Sjeverne Afrike. Listovi te biljke često se koriste kao hipoglikemik, laksativ, diuretik, purgativ, za smirenje želučanih tegoba te u liječenju hemoroida i kardiovaskularnih bolesti. Danas se najviše istražuje njihovo protuupalno i antioksidativno djelovanje. Najvažnije tvari koje su odgovorne za djelovanje su polifenoli, flavonoidi i iridoidi. U ovom radu istražen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida metanolnih ekstrakata listova vrsta *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis* i *G. punctata* čiji materijal je sakupljen u tri različite sezone (2014., 2015. i 2016.) s različitih lokacija na kojima su ove vrste prirodno prisutne. Metoda koja je korištena za pripremu ekstrakata bila je ultrazvučna ekstrakcija. Iznos ukupnih fenola kretao se između 15,14 ± 1,45 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. meridionalis* iz područja Male Učke i 40,95 ± 0,49 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. alypum* iz područja Konavoske stijene. Iznos flavonoida kretao se između 2,60 ± 0,02 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. meridionalis* iz područja Male Učke i 11,75 ± 0,14 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala u uzorku *G. punctata* iz područja Žumberačke Slapnice. Fenolnim spojevima bili su najbogatiji listovi vrste *G. alypum*, dok je vrsta *G. punctata* sadržavala nešto veću količinu flavonoida. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da okolišni i genetski faktori značajno utječu na koncentraciju fenola i flavonoida u vrstama roda *Globularia*. S obzirom na povišeni sadržaj sekundarnih metabolita, populacija vrste *G. cordifolia* s područja Šestanovca, vrste *G. meridionalis* s područja Grobničkog polja i vrste *G. punctata* s područja Slapnice, istaknule su se kao najbolji kandidati za buduća istraživanja.

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

Rad sadrži: 54 stranice, 13 grafičkih prikaza, 9 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Globularia*, sadržaj fenola, sadržaj flavonoida, ultrazvučna ekstrakcija.

Mentor: **Dr. sc. Kroata Hazler Pilepić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Kroata Hazler Pilepić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana-Marija Domijan, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE CONTENT OF PHENOLICS AND FLAVONOIDS IN METHANOLIC EXTRACTS OF LEAVES FROM SPECIES OF THE GENUS *GLOBULARIA*

Suzana Hariri

SUMMARY

Species of the genus *Globularia* belong to the family Plantaginaceae. They are widespread in the Mediterranean area from where they expand to northern Europe and northeastern Africa. *Globularia alypum* is one of the most widely applied plants in folk medicine of North African countries. Leaves of this plant are often used as a hypoglycemic, laxative, diuretic, purgative, for calming stomach problems and in the treatment of hemorrhoids and cardiovascular diseases. Today, their most investigated effects are anti-inflammatory and antioxidant. The most important substances responsible for the action are polyphenols, flavonoids and iridoids. In this thesis, total phenolic and flavonoid content of methanolic extracts from leaves of the species *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* and *G. punctata*, whose material was collected in three different seasons (2014, 2015 and 2016) from different locations in which these species are normally present, were compared. The method used for the preparation of extracts was ultrasonic extraction.The amount of total phenols ranged between 15.14 ± 1.45 mg gallic acid equivalent/g dry plant material in *G. meridionalis* from the area Mala Učka and 40.95 ± 0.49 mg gallic acid equivalent/g dry plant material in *G. alypum* collected from the area of Konavoske stijene. The amount of flavonoids ranged between 2.60 ± 0.02 mg quercetin equivalent/g dry plant material in *G. meridionalis* from the area of Mala Učka and 11.75 ± 0.14 mg quercetin equivalent/g dry plant material in *G. punctata* from the area of Žumberačka Slapnica. Leaves of the species *G. alypum* were richest in phenolic compounds, while the species *G. punctata* contained a somewhat higher amount of flavonoids. From the obtained results it can be concluded that environmental and genetic factors greatly affect the concentration of phenols and flavonoids in species of the genus *Globularia*. Due to the high content of secondary metabolites, population of the species *G. cordifolia* from the area of Šestanovac, *G. meridionalis* from the area of Grobničko polje and *G. punctata* from the area of Slapnica, distinguished themselves as the best candidates for future research.

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

Thesis includes: 54 pages, 13 figures, 9 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Globularia*, phenolic content, flavonoid content, ultrasound extraction.

Mentor: **Kroata Hazler Pilepić, Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Kroata Hazler Pilepić, Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Ana-Marija Domijan, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2017