Fitokemijska karakterizacija polifenola vrste Centaurea ragusina L., Asteraceae

Domitrović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:718043

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

Iva Domitrović

Fitokemijska karakterizacija polifenola vrste *Centaurea ragusina* L., Asteraceae

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

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

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Botanički podaci ... 2
1.1.1. Porodica glavočike ili zvjezdanovke (Asteraceae) ... 2
1.1.1. Rod zečina (*Centaurea* L.) ... 3
1.1.1. Dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.) ... 4
1.2. Pregled istraživanja dubrovačke zečine (*Centaurea ragusina* L.) ... 5
1.3. Biološki aktivne tvari vrste dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.) ... 6
1.3.1. Polifenoli ... 6
1.3.1.1. Struktura i značajke ... 6
1.3.1.2. Rasprostranjenost ... 9
1.3.1.3. Biološki učinci ... 9
1.3.2. Trjeslovine ili tanini ... 11
1.3.2.1. Struktura i značajke ... 11
1.3.2.2. Rasprostranjenost ... 13
1.3.2.3. Biološki učinci ... 14
1.3.3. Flavonoidi ... 15
1.3.3.1. Struktura i značajke ... 15
1.3.3.2. Rasprostranjenost ... 16
1.3.3.3. Biološki učinci ... 17
1.3.4. Fenolne kiseline ... 18
1.3.4.1. Struktura i značajke ... 18
1.3.4.2. Rasprostranjenost ... 19
1.3.4.3. Biološki učinci ... 20

2. OBRAZLOŽENJE TEME ... 21

3. MATERIJALI I METODE ... 22
3.1. Biljni materijal ... 22
3.2. Aparatura i kemikalije ... 22
3.3. Metode i postupci istraživanja ... 24
3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola ... 24
3.3.1.1. Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga ... 24
3.3.1.2. Tankoslojna kromatografija (TLC) flavonoida ... 24
3.3.2. Kvalitativna analiza trjeslovina ... 25
3.3.2.1. Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga ... 25
3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina ... 26
3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida ... 27
3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina ... 28

4. REZULTATI I RASPRAVA 29
4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola 29
4.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja polifenola 29
4.1.1. Rezultati tankoslojne kromatografije (TLC) flavonoida 30
4.2. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina 31
4.2.1. Rezultati reakcija dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga 31
4.2.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina 31
4.2.1.2. Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina 32
4.2.1.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju 32
4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina 33
4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida 35
4.5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina 37
5. ZAKLJUČCI 39
6. LITERATURA 40
7. SAŽETAK/SUMMARY 46
8**. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

1. UVOD

Ljekovito bilje i pripravci od ljekovitog bilja najstariji su način liječenja različitih bolesti. Fitoterapija je prvi oblik medicine koji je čovjek poznavao. Stoljećima je fitoterapija bila jedini način liječenja, a nova znanja su stjecana empirijski te su se prenosila na sljedeće generacije. Fitoterapija se definira kao metoda liječenja, ublažavanja te sprječavanja bolesti i tegoba upotrebom cijelih ljekovitih biljaka ili njihovih dijelova (cvjetova, listova, korijena, itd.), potom eteričnih ulja, ekstrakata i drugih izolata, kao i gotovih pripravaka (čajeva, tinktura, masti, kapsula). Naziv fitoterapija prvi je upotrijebio francuski liječnik Henri Leclerc 1913. godine.

Suvremena fitoterapija je medicinska disciplina temeljena na dokazima. Stoljeća upotrebe biljnih droga u narodnoj medicini potkrijepljena su današnjim znanstvenim i kliničkim istraživanjima o djelotvornosti i neškodljivosti pa modernu fitoterapiju ne smijemo svrstavati u alternativnu medicinu, već je sagledavati kao dio znanstvene medicine.

Bitan pojam za današnju, modernu fitoterapiju, jest standardizacija. Postavlja se zahtjev da mora biti prisutna minimalna količina jedne ili više aktivnih komponenata ili skupine kemijskih spojeva (npr. flavonoida) u biljnom ekstraktu. U području fitoterapije standardizacija se primjenjuje samo na ekstrakte, i to na samo one ekstrakte kojima su u potpunosti karakterizirani aktivni sastojci. Svrha standardizacije je da se osigura reproducibilan sastav poznatih aktivnih tvari. U suvremenoj se fitoterapiji primjenjuju brojni preparati. Možda su najpoznatiji primjeri preparati dobiveni od listova ginka (*Ginkgo biloba*), koji se koriste u liječenju manjih kognitivnih poremećaja, potom zelen gospine trave (*Hypericum perforatum*), koja se obično koristi kod blagih oblika depresije, te korijen vražje kandže (*Harpagophytum procumbens*), koji se upotrebljava za liječenje bolova u donjem dijelu leđa.

Od oko 5000 poznatih i opisanih biljnih vrsta u Hrvatskoj, njih oko 10% spada u skupinu endemičnih ili subendemičnih vrsta. Jedna od njih je i dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L., Asteraceae). S ciljem fitokemijske karakterizacije i spoznavanja fitoterapijskog potencijala tog hrvatskog endema, u ovom je diplomskom radu provedena kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih tvari dokazanih bioloških učinaka (ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina).

1.1. Botanički podaci

1.1.1. Porodica glavočike ili zvjezdanovke (Asteraceae)

Kozmopolitska porodica Asteraceae ili Compositae jedna je od najvećih porodica u biljnom svijetu. Obuhvaća 1553-1554 roda s 21740 vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu, a najviše u umjerenom i suptropskom pojasu.

Biljne vrste koje pripadaju toj porodici većinom su zeljaste (jednogodišnje i dvogodišnje biljke ili trajnice), rjeđe drvenaste biljke (polugrmovi i grmovi), s jednostavnom ili razgranjenom, polegnutom, pridignutom ili uspravnom stabiljkom. Listovi su im jednostavni (cjeloviti ili razdijeljeni) ili sastavljeni, izmjenično ili nasuprotno raspoređeni, ponekad skupljeni u prizemnu rozetu, bez palistića. Cvjetovi su mali, dvospolni, funkcionalno jednospolni ili neplodni (biljke jednodomne ili dvodomne), s dvostrukim ocvijećem. Čaška je razvijena u obliku pet kožičastih izraslina na vrhu plodnice, odnosno u obliku sitnih ljuskica, zubaca, bodlji, čekinja, jednostavnih ili perastih dlaka, koje nakon cvatnje često izrastu u kunadru (lat. *pappus*) ili druge tvorevine koje pomažu rasprostranjivanju plodova. Ponekad je čaška potpuno zakržljala. Vjenčić je sulatičan, a na temelju njegove građe razlikuju se cjevasti cvijet (lat. *flos tubulatus*) i jezičasti cvijet (lat. *flos ligulatus*). Cjevasti cvjetovi su dvospolni, aktinomorfni, rjeđe slabo zigomorfni, s dvostrukim ocvijećem, sa slabo uočljivom čaškom (većinom u obliku pojačanog ruba iznad plodnice ili u obliku dlaka) i vjenčićem čije su latice u donjem dijelu međusobno srasle u kratku cijev, a u gornjem s (3-) 4-5 režnjeva oboda. Jezičasti cvjetovi su dvospolni, zigomorfni, sa slabo razvijenom čaškom. Vjenčić je sastavljen od pet latica koje su srasle u kratku cijev, dok je obod vjenčića na jednoj strani produžen u većinom linearni ili duguljasti jezičac na čijem se rubu uočava tri ili pet zubaca. U oba tipa cvijeta nalazi se samo jedan tučak i (4-) 5 epipetalnih prašnika. Tučak je sastavljen od dva međusobno srasla plodnička lista, a plodnica je podrasla, jednopretinčana i ima pri dnu samo jedan anatropni sjemeni zametak. Prašnici u oba tipa cvijeta imaju slobodne prašničke niti kojima su prirasli za cijev vjenčića, dok su prašnice pomoću kutikule međusobno slijepljene u cijev u koju se prazni pelud. U neplodnih je cvjetova vrat tučka nerazdijeljen ili zakržljao. Cvjetovi su najčešće mnogobrojni, rjeđe pojedinačni ili ih je po nekoliko zajedno, skupljeni u cvatove u kojih se, s obzirom na oblik cvatišta, razlikuju glavica (ravno, izbočeno ili udubljeno cvatište) i uborak (veliko, udubljeno, košarasto cvatište). Na

proširenoj cvatnoj osi koja potječe od stabiljke zbijeno su raspoređeni cjevasti i jezičasti cvjetovi u različitim kombinacijama. Cvatište može biti ispunjeno, rjeđe šuplje, golo ili prekriveno pricvjetnim listićima pojedinih cvjetova. S donje su strane glavice opkoljene ovojem (lat. *involucrum*), sastavljenim od ljuskastih listića koji su crjepasto raspoređeni u jedan, dva ili više redova. Plod je roška (lat. *achenium*). Entomofilne su, rjeđe anemofilne vrste (Grdinić i Kremer, 2009).

Danas se porodica *Asteraceae* najčešće dijeli u dvije potporodice: cjevastocvjetne glavočike (Asteraceae, Compositae tubuliflorae) i jezičastocvjetne glavočike (Cichoriaceae, Compositae liguliflorae). Cjevastocvjetne glavočike u glavicama imaju skupljene samo cjevaste cvjetove ili se na obodu nalaze i jezičasti cvjetovi. U hrvatskoj flori zastupljene su s oko 80 rodova i s više od 300 vrsta. U tu se porodicu ubraja i rod zečina (*Centaurea* L.), s endemičnom dubrovačkom zečinom (*Centaurea ragusina* L.). Jezičastocvjetnim su glavočikama svi cvjetovi glavice jezičasti. U nas su zastupljene s oko 20 rodova i s više od 200 vrsta. (www.enciklopedija.hr)

1.1.2. Rod zečina (*Centaurea* L.)

Rod zečina (*Centaurea*) jedan je od najvećih i najkompleksnijih rodova porodice *Asteraceae* koji obuhvaća oko 500 vrsta (Erhardt i sur., 2002).

Pripadnice roda zečina jednogodišnje su ili višegodišnje trave, rjeđe patuljasti grmovi. Listovi su im cjeloviti ili perasto razdijeljeni. Na stabiljci je prisutna jedna ili više cvjetnih glavica koje su u skupinama od dvije do tri smještene na vršnim dijelovima ogranaka stabiljke. Ovoj je cvjetnih glavica cilindričan ili okrugao, a pricvjetni listići često imaju resasti ili trnovit privjesak. Unutarnji cvjetovi glavice su dvospolni, a rubni neplodni. Vjenčić je cjevast s 5(-8) režnjeva oboda. Plodovi zečine najčešće imaju kunadru koja u većine vrsta ostane na biljci, dok u manjeg broja vrsta otpadne. Kunadru čine dva ili više redova grubih do perastih dlaka ili ljusaka koje mogu biti ovalne do linearne. Red koji se nalazi u samoj unutrašnjosti najkraći je, te su ljuske ili dlake koje ga tvore često donjim dijelom međusobno srasle i obično se razlikuju oblikom i teksturom od onih koje se nalaze u vanjskim redovima. Vanjski redovi dlaka (ljusaka) preklapaju jedan drugog (Tutin i sur., 1976).

1.1.3. Dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.)

Dubrovačka zečina je endemska vrsta, zaštićena od 1969. godine na svim svojim staništima. Prvi je put znanstveno opisana krajem 17. stoljeća, kada je francuski botaničar Joseph Pitton de Tournefort, na svojoj ekspediciji po Sredozemlju, skupio biljku u okolici Cavtata i nazvao je „*Jacea epidaurica candidissima tomentosa*“, što bi u prijevodu s latinskog bilo „bijela dlakava zečina iz Cavtata“. Epidaurus je antički naziv za Cavtat, koji je tijekom srednjeg vijeka nazvan Ragusa Vecchia, pa je zato nova biljna vrsta dobila naziv *Centaurea ragusina* – dubrovačka zečina, iako ona ne raste u samom Dubrovniku i njegovoj užoj okolici (www.opcinakonavle.hr).

Dubrovačka zečina raste u pukotinama karbonatnih stijena koje se okomito izdižu iznad mora, ali i na eruptivima otočića Brusnika. Hazmofitska je, heliofilna i halofitska vrsta. Raste na brdu Marjan kod Splita, otocima Šolti, Čiovu, Hvaru, Sv. Andriji, Brusniku, Biševu, Visu, Sušcu, Palagruži, Trpnju, Pelješcu, Mljetu te u okolici Cavtata.

Višegodišnja je bijelo pustenasta biljka. Stabiljke su joj uspravne ili pridignute, jednostavne, uglate, 30-60 cm visoke, pri vrhu s 1-3 (-4) cvjetne glavice, pri dnu odrvenjele i bijelo vunaste. Bazalni su listovi na dugoj peteljci brojni, perasto dijeljeni, sa svake strane s (4-) 5-7 (-8) odsječaka. Glavice su okruglaste, promjera 20-25 mm. Ovojne su ljuske blijedozelene do bijelo pustenaste, pri vrhu sa smeđecrnim, trokutastim, češljasto-trepavičastim privjeskom, koji završava apikalnim, oko 4 mm dugim trnom svinutim prema natrag. Roška je 4-5 mm duga i oko 1,5 mm široka. Valjkasta je, pri dnu blago sužena, sivkasta, prekrivena poleglim, blago stršećim, svilenkastim dlačicama. Kunadra je iste dužine kao i roška, sastavljena od bijelih stršećih i ukočenih dlaka (Šilić, 1990).



Slika 1. Dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.) (Foto: D. Kremer).

1.2. Pregled istraživanja dubrovačke zečine (*Centaurea ragusina* L.)

Budući da se radi o endemskoj vrsti, na dubrovačkoj zečini nije provedeno puno istraživanja. Istraženi su citogenetski učinci osmotskog stresa na meristemske stanice korijena. Budući da je stanište dubrovačke zečine suho, te je ona izložena velikim količinama soli, razvila je kseromorfne značajke (Radić i sur., 2005). U studiji objavljenoj 2013. godine ispitivala se tolerancija dubrovačke zečine na visoke koncentracije soli koja je povezana s učinkovitom osmotskom prilagodbom i povećanim antioksidativnim kapacitetom (Radić i sur, 2013). Nadalje je istraživan utjecaj natrijevog klorida i manitola na peroksidaznu aktivnost i lipidnu peroksidaciju dubrovačke zečine (Radić i sur., 2005). Ispitivani su i fitokemijski profili hlapljivih sastavnica listova i cvjetova dubrovačke zečine te njihov antimikrobni učinak. Seskviterpeni su se u tom istraživanju pokazali kao najobilnija skupina spojeva te su hlapljiva ulja pokazala veliki antibakterijski potencijal (Politeo i sur., 2012).

Unutar roda *Centaurea,* na više je vrsta određivan sadržaj ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina. Većina takvih istraživanja provedena je u Turskoj, zemlji u kojoj raste velik broj pripadnica roda *Centaurea,* od kojih su mnoge endemske. Provedeno je određivanje sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida pet pripadnica roda *Centaurea*: *C. kurdica, C. rigida, C. amanicola, C. cheirolopha* i *C. ptosimopappoides*. Količina fenolnih spojeva određivana je Folin-Ciocalteuovom metodom i izražena u ekvivalentima galne kiseline. Dobiveni rezultati su bili u rasponu od 82 mg do 135 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu ekstrakta. Sadržaj flavonoida određivan je kolorimetrijskom metodom s aluminijevim kloridom. Rezultati su izraženi ekvivalentima rutina. Rezultati određivanja flavonoida bili su u rasponu od 76 mg do 245 mg ekvivalenata rutina po gramu ekstrakta. Istraživanje je pokazalo da pripadnici roda *Centaurea* sadrže velike količine polifenolnih spojeva i flavonoida te se stoga mogu koristiti kao izvor antioksidansa (Aktumsek i sur., 2011).

Ukupni polifenoli određivani su i u vrstama *Centaurea patula, C. pulchella* te *C. tchihatcheffii*. Određivanje je također provedeno Folin-Ciocalteuovom metodom. Sadržaj ukupnih polifenola bio je u rasponu od 22 mg do 55 mg ekvivalenata galne kiseline po gramu ekstrakta. Zaključeno je da su pripadnici roda *Centaurea* na kojima je provedeno istraživanje dobar izvor prirodnih antioksidansa (Zengin i sur., 2010).

1.3. Biološki aktivne tvari vrste dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.)

1.3.1. Polifenoli

1.3.1.1. Struktura i značajke

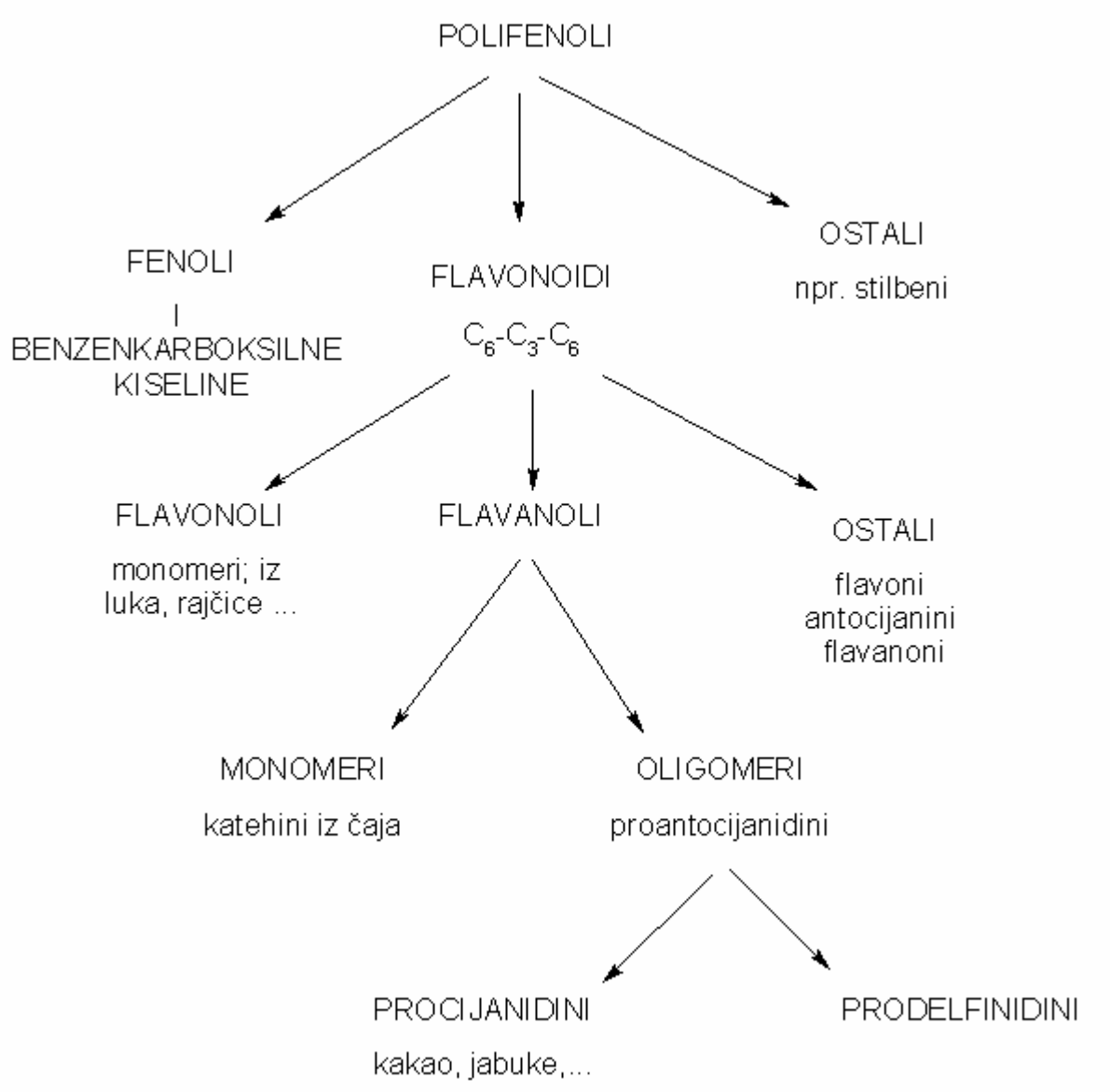
Polifenoli su jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari. U skupinu polifenola ubrajamo više od 8000 spojeva različite kemijske strukture. Osnovno je obilježje polifenola prisutnost jedne ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova (Bravo, 1998). Sekundarni su metaboliti biljnog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

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

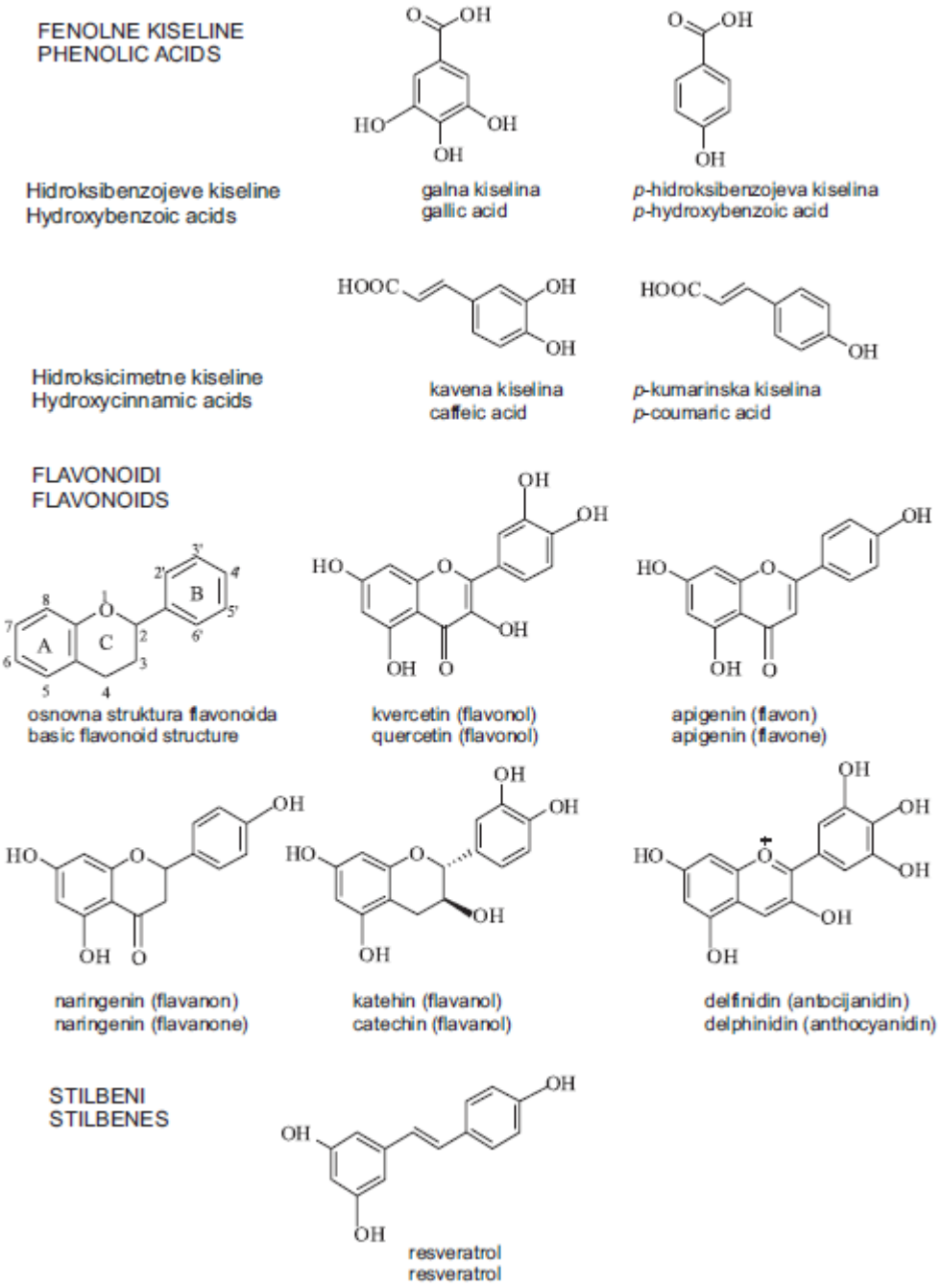
Polifenoli se sintetiziraju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je ključna tvar u nastanku aromatskih prirodnih spojeva. Univerzalni je prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama)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

U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida, a najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukoronsku te galakturonsku kiselinu. Polifenoli se mogu konjugirati i s drugim tvarima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi. Česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998).

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



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



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

1.3.1.2. Rasprostranjenost

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

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

1.3.1.3. Biološki učinci

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

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

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

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

Puno dokaza o prevenciji bolesti primjenom polifenola potječe od *in vitro* istraživanja ili pokusa na životinjama, koji se često provode dozama mnogo većim od onih kojima su izloženi ljudi kroz prehranu. Očito je da polifenoli poboljšavaju status različitih biomarkera oksidativnog stresa. No, mnogo nesigurnosti i dalje postoji vezano uz značaj tih biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Također, postoje i studije s kontradiktornim rezultatima, koje govore o prooksidativnom učinku polifenola zbog kojega mogu posljedično inducirati apoptozu i inhibirati staničnu proliferaciju. Jedan od razloga kontradiktornih rezultata leži u tome što polifenolne tvari čini veliki broj različitih spojeva s različitim biološkim djelovanjem, stoga se učinak jednog polifenolnog spoja ne može generalizirati za ostale spojeve. Kako se istraživanja često provode na puno većim dozama od onih unesenih prehranom, nužno je poznavanje bioraspoloživosti i metabolizma različitih polifenolnih spojeva, kao i poznavanje rasprostranjenosti te sadržaja tih spojeva u hrani. Ta su znanja neophodna za razumijevanje

odnosa između unosa polifenola hranom i rizika za razvoj različitih bolesti. Poznavanje bioraspoloživosti polifenolnih spojeva, koja značajno varira između različitih vrsta tih spojeva, iznimno je važna, budući da polifenoli najzastupljeniji u našoj prehrani ne moraju nužno imati i najbolju bioraspoloživost (Primorac, 2012; Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

1.3.2. Trjeslovine ili tanini

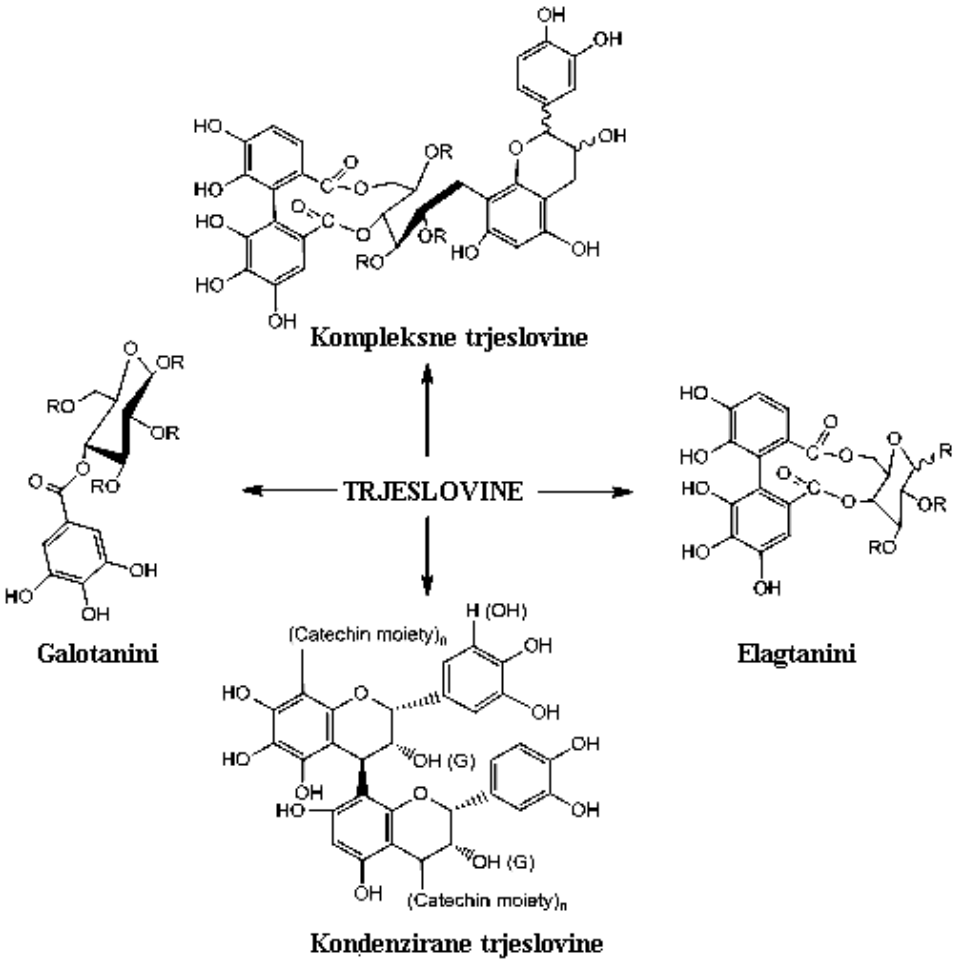
1.3.2.1. Struktura i značajke

Trjeslovine su skupina fenolnih spojeva koji su značajan produkt sekundarnog metabolizma biljaka. Ime im potječe iz 1796. kada je opisana njihova sposobnost da reagiraju sa životinjskom kožom pri njenoj obradi („tanning“). Karakteristike koje razlikuju trjeslovine od ostalih vrsta biljnih polifenola načelno su: vezivanje na proteine, baze, pigmente, velike molekule i metalne ione, antioksidativno djelovanje i drugo. Te se značajke koriste za njihovo kvalitativno i kvantitativno razlikovanje pri analizi polifenola. Postoje različiti pristupi kategorizaciji trjeslovina. Jednu od podjela prikazuje Slika 4. Trjeslovine su prvotno podijeljene u dvije grupe, prema polifenolnim skupinama u svojim molekulama, na trjeslovine tipa pirogalola i trjeslovine tipa katehola (katehina). Razvojem kemije trjeslovina, došlo je do preimenovanja tih dviju grupa (Okuda i Ito, 2011; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007) u sljedeće skupine:

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

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

Zbog čestih nemogućnosti provjera strukture trjeslovina opisanih u istraživanjima, a što je neophodno za karakterizaciju bioloških i farmakoloških svojstava nekog spoja, došlo je do uvođenja dodatne kategorizacije trjeslovina i povezanih polifenola u dvije grupe: tip A (s konstantnom strukturom) i tip B (s promjenjivom strukturom) (Okuda i Ito, 2011).



Slika 4. Podjela trjeslovina (Ascacio-Valdés i sur., 2011).

Trjeslovine koje hidroliziraju

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

Kondenzirane trjeslovine

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

1.3.2.2. Rasprostranjenost

Trjeslovine su široko rasprostranjene u biljnom svijetu. Najpoznatije porodice od kojih sve vrste sadrže trjeslovine jesu: Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Burseraceae, Combretaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae (od dvosupnica) te Najadaceae i Typhaceae od jednosupnica (Mole, 1993). Vrste porodica Brassicaceae (syn. Cruciferae) i Papaveraceae ne sadrže trjeslovine (Rangari, 2007).

Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene u biljci, pri čemu ih najviše sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi, i konačno, plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine, Gallae ili sisarke (šiške). Radi se o patološkim izraslinama na listu azijskog hrasta i na listovima ruja koje su nastale razvojem ličinke ose (azijski hrast) ili jedne vrste biljnih uši (kineski ruj), a mogu sadržavati do 75% trjeslovina. Razvija se larva, a biljka zbog podražaja stvara trjeslovine. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, utvrđeno je da se trjeslovine javljaju u većoj količini u mlađim dijelovima biljke (lisnim pupoljcima, mladim listovima i cvjetovima), što se objašnjava time da biljka gomila trjeslovine u onim dijelovima koji su joj najvrjedniji. Količina tanina u biljci varira ovisno o različitim okolišnim i sezonskim

čimbenicima. Suša, visoka temperatura, velika izloženost svjetlu i slaba kvaliteta zemlje stvaraju uvjete koji pogoduju povećanom sadržaju trjeslovina u biljci. Sezonska varijabilnost sadržaja ovisi o fazi rasta biljke pa je tako sinteza tanina najintenzivnija u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen njezin rast, pa su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalođera, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

1.3.2.3. Biološki učinci

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

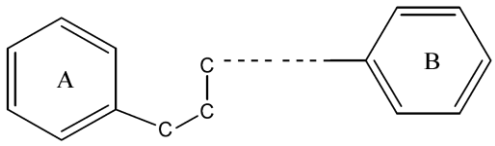
Glavna upotreba trjeslovina je povezana s njihovim adstrigenim učinkom. Djeluju protiv dijareje i antiseptički, štiteći izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Precipitirajući proteine, trjeslovine djeluju antimikrobno i antifungalno. Također imaju hemostatsko djelovanje, i mogu djelovati kao antidoti kod nekih slučajeva trovanja (teškim metalima, crnom kavom i većinom alkaloida). Interno se još mogu koristiti i kod želučanog i crijevnog katara te hiperaciditetnog gastiritisa. U procesu cijeljenja rana, opeklina, ozeblina i upala, trjeslovine pomažu stvaranjem zaštitnog sloja preko ozlijeđenog tkiva, omogućavajući da se ispod njega slobodno odvija cijeljenje. Istraživanja su pokazala da mnoge trjeslovine neutraliziraju slobodne radikale, a poznato je da su mnoge degenerativne bolesti (rak, multipla skleroza, ateroskleroza, proces starenja) povezane s visokim koncentracijama slobodnih radikala između stanica. Također, određeni tipovi trimernih proantocijanidina mogu štititi protiv bolesti urinarnog trakta. No, trjeslovine su raznoliki spojevi s velikom varijacijom strukture i koncentracije u biljnom svijetu. Zbog toga su biomedicinska istraživanja pozitivnih i negativnih

učinaka na zdravlje pri povećanom unosu trjeslovina značajno ograničena nedostatkom metoda za brzu karakterizaciju i standardizaciju (de Jesus i sur., 2012; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

1.3.3. Flavonoidi

1.3.3.1. Struktura i značajke

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

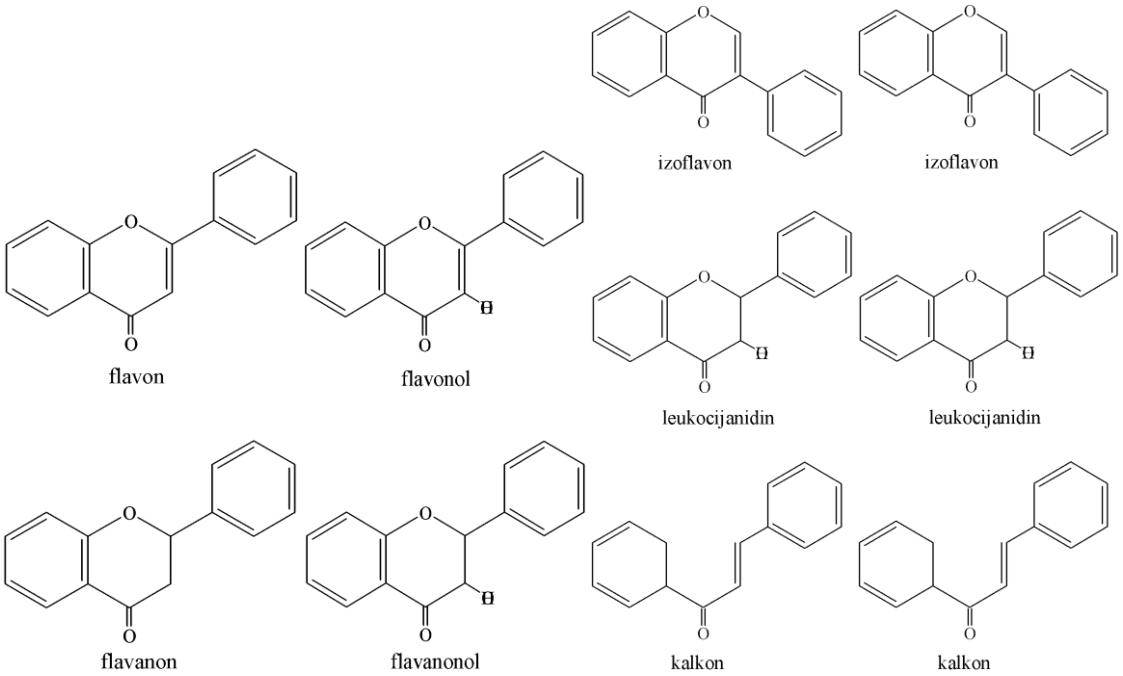


Slika 5. C_6-C_3-C_6 struktura flavonoida.

Raznolikost flavonoidnih spojeva uvjetovana je stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama. Flavonoidnim derivatima pripadaju: flavoni, flavonoli (3-hidroksiflavoni), flavanoni (2,3-dihidroflavoni), flavanonoli (3-hidroksi-2,3-dihidroflavoni), izoflavoni (5-fenilbenzo-γ-pironi), antocijanidini (derivati 2-fenil-3,5,7-trihidrobenzopirilijeva hidroksida), leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli), katehini (flavan-3-oli), kalkoni (derivati benzalacetofenona) i auroni (derivati benzalkularan-3-ona) (Wagner, 1993; Maleš, 1990; Steinegger i Hänsel, 1988).

Flavonoidi se u prirodi pretežno javljaju u glikozidnom obliku, građeni iz dva dijela: aglikonske (nešećerne) i glikonske (šećerne) komponente. Aglikonski dio flavonoida je derivat 2-fenil-dihidrobenzopirana (flavana). Iako šećerni ostatak može biti vezan gotovo u bilo kojem položaju, uglavnom prevladavaju 3- i 7-heterozidi. Od monosaharida su najzastupljeniji D-glukoza,

D-galaktoza, L-ramnoza, D-ksiloza i L-arabinoza, a od disaharida rutinoza (L-ramnozido-6-D-glukoza), soforoza (D-glukozido-2-D-glukoza) i sambubioza (D-ksilozido-2-D-glukoza) (Harborne, 1964).



Slika 6. Osnovne strukture flavonoida.

1.3.3.2. Rasprostranjenost

U prirodi su najrasprostranjeniji flavoni i flavonoli, a zajedno s flavanonima, antocijanidima i izoflavonoidima čine više od 80% poznatih flavonoidnih spojeva. Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, od alga do kritosjemenjača. Sastavni su dio gotovo svih viših biljaka, a najviše ih ima u mladim listovima, cvjetnim pupoljcima i nezrelim plodovima. Hidrofilni flavonoidi nalaze se otopljeni u staničnom soku vakuola, dok se lipofilni flavonoidi (tetra-, penta- i heksametoksilirani) javljaju u idioblastima i ekskretornim stanicama (Vladimir, 1993).

Rutin je najpoznatiji i vrlo raširen flavonolski glikozid. Izoliran je iz rutvice (*Ruta graveolens* L., Rutaceae). Danas se najčešće dobiva (15-20% rutina) izolacijom iz cvjetnih pupoljaka japanske sofore (*Sophpra japonica* L., Fabaceae). Flavanoni su karakteristični za vrste roda *Citrus*, prvenstveno hesperitin i naringenin u obliku glikozida. Izoflavonoidi su zbog

karatkeristične i rijetke pregradnje molekule ograničeni na porodicu Fabaceae (Vladimir-Knežević, 2008).

1.3.3.3. Biološki učinci

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

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

Rutin, najpoznatiji flavonolski glikozid, koristi se kao sredstvo za jačanje kapilara. Listovi i cvjetovi crvenog gloga (*Crataegus oxyacantha* L., Roseaceae) i bijelog gloga (*C. monogyna* Jacq.) sadrže flavonolske glikozide (1-2%). Među flavonolima prevladava hiperozid. Viteksin i njegovi derivati su važni predstavnici flavonskih C-glikozida. Koriste se u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih oboljenja. Oni su tonici za oslabljeno srce, pogotovo kod starijih osoba i u slučajevima kada nije preporučljivo koristiti glikozide digitalisa. Snizuju krvni tlak i poboljšavaju cirkulaciju krvi. Listovi ginka (*Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae) sadrže mono-, di- i tri-glikozide kemferola, kvercetina i izoramnetina, te neglikozidne 3'→→8 biflavonoide (amentoflavon). Primjenjuju se u prevenciji i liječenju cerebralne insuficijencije. Plodovi obične sikavice (*Silybum marianum* L. Gaertn., syn. *Cardus marianus* L., Asteraceae) sadrže 1,5-3% silimarina – smjese flavonolignana silibina, silikristina i silidianina koji imaju hepatoprotektivni i antihepatotoksični učinak. Cvijet brđanke (*Arnica montana* L., Asteraceae) sadrži 0,4-0,6% flavonoida koji,

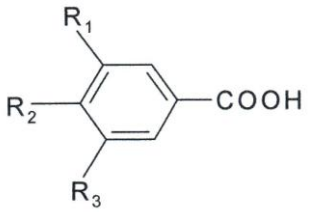
pripremljeni u obliku tinkture ili masti, pri eksternoj primjeni pomažu kod upala i bržeg zacjeljivanja rana. Izoflavonoidi imaju različitu primjenu. Tako medikarpin iz lucerne (*Medicago sativa* L., Fabaceae) i pisatin iz graška (*Pisum sativum* L., Fabaceae) imaju antifungalna svojstva, a neki jednostavni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

1.3.4. Fenolne kiseline

1.3.4.1. Struktura i značajke

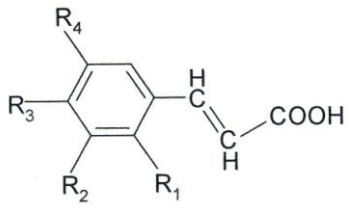
Nakon flavonoida, drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih polifenola čine fenolne kiseline. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Na temelju strukture, razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C_6-C_1) i derivati cimetne kiseline (hidroksicimetne kiseline, C_6-C_3) (Robbins i sur., 2003).

Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline mogu nastati izravno iz međuprodukata puta šikiminske kiseline. No, u biljkama češće nastaju degradacijom derivata cimetne kiseline (Russell i sur., 1999).



Slika 7. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur.,1999).

Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su kavena, kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina. Predstavljaju važne građevne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva te često dolaze u obliku specifičnih estera, kao npr. klorogenska kiselina i ružmarinska kiselina (Ralph i sur., 1994; Russell i sur., 1999). Manji se broj fenolnih kiselina javlja u slobodnom obliku, dok su većinom u biljkama prisutne konjugirane (ponajviše esterifikacijom) sa strukturnim biljnim dijelovima (celulozom, proteinima i ligninom) ili s različitim molekulama, uključujući jednostavne šećere i organske kiseline (Vuković, 2013).



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

1.3.4.2. Rasprostranjenost

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

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

Ferulična kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u žitaricama. Njezin se sadržaj u žitaricama kreće između 0,8 g i 2 g po kilogramu suhe žitarice. U vanjskom dijelu zrna žitarice nalazi se čak 98% ukupne ferulične kiseline u zrnu (Manach i sur., 2004).

1.3.4.3. Biološki učinci

Fenolne kiseline koje unosimo prehranom fiziološki su antioksidansi koji hvataju slobodne kisikove i dušikove radikale. *In vitro* studije koristile su različite sustave kako bi se oksidirao LDL te se mjerila prevencija oksidacije nakon uključivanja u sustav specifične fenolne komponente. Najviše su proučavane hidroksicimetne kiseline koje su, u modelu u kojem su se koristili Cu^{2+} ioni, pokazale snažno antioksidativno djelovanje. U studijama se pokazalo da kavena kiselina djeluje sinergistički s alfa tokoferolom, pojačavajući antioksidativni kapacitet LDL-a, reciklirajući alfa tokoferol od alfa tokoferoksil-radikala (Laranjinha i sur., 1995). U drugoj se studiji pokazalo da kavena i p-kumarinska kiselina djeluju sinergistički s askorbinskom kiselinom (Vieira i sur., 1998).

Kavena kiselina pokazuje veliku antioksidacijsku aktivnost, *in vitro* i *in vivo* hepatoprotektivno, protuvirusno, protuupalno djelovanje, a u kombinaciji s ružmarinskom kiselinom i antimikrobno djelovanje; također, kavena kiselina i njezin derivat, feniletil ester kavene kiseline, inhibiraju karcinogenezu (Ikeda i sur., 2011; Sato i sur., 2011; Chao i sur., 2009; Gülcin, 2006; Widmer i sur., 2006; Janbaz i sur., 2004; van Gadow i sur., 1997).

Objavljena su brojna istraživanja koja opisuju širok raspon bioloških aktivnosti ružmarinske kiseline. Tako, primjerice, ružmarinska kiselina pokazuje snažno antioksidativno, antimutageno, antidepresivno, hepatoprotektivno, protuvirusno, antibakterijsko i antimikotično djelovanje (Furtado i sur., 2008; Tepe, 2008; Swarup i sur., 2007; Vattem i sur., 2006; Widmer i sur., 2006; Qiao i sur., 2005; Bais i sur., 2002; Osakabe i sur., 2002; Takeda i sur., 2002). Nekoliko je istraživanja potvrdilo i protuupalni učinak ružmarinske kiseline, čime je omogućena upotreba te tvari za liječenje različitih upalnih oboljenja. Tako ružmarinska kiselina, zbog svoje antioksidacijske aktivnosti i zbog inhibicije upalnih odgovora, predstavlja vrlo učinkovitu terapiju za alergijski rinokonjuktivitis (Osakabe i sur., 2004). Osim toga, pokazuje i antiangiogeni potencijal koji također može biti povezan s njezinom antioksidacijskom aktivnošću (Huang i sur., 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovoga diplomskog rada je bila fitokemijska karakterizacija polifenolnih tvari hrvatskog endema dubrovačke zečine (*Centaurea ragusina* L., Asteraceae).

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

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

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

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal je prikupljen tijekom lipnja 2012. godine na otoku Brusniku (Slika 9). Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 1994; Šilić, 1990; Tutin i sur., 1972). Analizirani su pulverizirani nadzemni dijelovi (stabljike, listovi i cvjetovi) dubrovačke zečine.



Slika 9. Dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.) s otoka Brusnika (Foto: D. Kremer).

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparati i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka); kiveta 1 cm;
- PC-HP 845x UV-Visible System (Hewlett-Packard, Njemačka);
- pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, epruvete, kapalice, filtar papir;
- odmjerne tikvice; Erlenmeyerove tikvice;
- TLC ploče s tankim slojem Kieselgela 60 F_{254}; kromatografske komore; kapilare
- stalci i lijevci za odjeljivanje;
- povratna hladila.

Kemikalije:

- aceton (Claro-Prom d.o.o., Zagreb, Hrvatska);
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- barijev hidroksid (Fluka, Buchs, Švicarska);
- beta-etilaminoester difenilborne kiseline (Fluka, Buchs, Švicarska);
- etanol (Badel, Zagreb, Hrvatska);
- etil acetat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- Folin-Ciocalteuov fenolni reagens (Merck, Damstadt, Njemačka);
- formaldehid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- heksametilentetramin (Zorka, Šabac, Srbija);
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- kazein (Calbiochem, Darmstadt, Njemačka);
- klorovodična kiselina, konc. (Carlo Erba, Rodano, Italija);
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- mravlja kiselina (TTT, Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- natrijev acetat trihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev citrat (Gradska ljekarna Zagreb, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države);
- natrijev karbonat dekahidrat (Poch, Gliwice, Poljska);
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev nitrit (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- octena kiselina, led. (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- olovov acetat (Kiedel-de Haën ag. Seelze – Hanover, Njemačka);
- pikrinska kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska);
- želatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države);
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- željezov(III) klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države).

3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Kvalitativna analiza polifenola

3.3.1.1. Dokazivanje polifenola kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

0,2 g pulveriziranog biljnog materijala ekstrahira se s 5 mL metanola, 10 minuta na vodenoj kupelji (60 °C).

Opće reakcije

1. Reakcije promjene boje dodatkom natrijeva hidroksida.
2. Reakcije promjene boje dodatkom željezova(III) klorida (5%-tna otopina).
3. Reakcija taloženja dodatkom olovova acetata (10%-tna otopina).
4. Reakcija taloženja dodatkom barijeva hidroksida.
5. Reakcija taloženja dodatkom pikrinske kiseline.

3.3.1.2. Tankoslojna kromatografija (TLC) flavonoida

Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina u pripremljenom ekstraktu provodi se na tankom sloju Kieselgla 60 F_{254}, uz razvijač etil acetat - mravlja kiselina - ledena octena kiselina - voda (100:11:11:27, V/V). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami se promatraju pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner H. i sur., 1983). Naturstoff-reagens se pripremi otapanjem 1g β-etilaminoestera difenilborne kiseline u 100 mL metanola.

3.3.2. Kvalitativna analiza trjeslovina

3.3.2.1. Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

0,2 g pulveriziranog biljnog materijala ekstrahira se 10 minuta s 20 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakt se profiltrira.

Opće reakcije

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

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

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

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

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

3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine određena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (1976).

0,25 g fino usitnjene droge (nadzemni biljni dijelovi) ekstrahirano je s 80 mL 30%-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta. Nakon hlađenja, iscrpina je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjena do oznake 30%-tnim metanolom. 2,0 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100,0 mL). Puferska otopina održava stalnu pH-vrijednost medija (pH = 5), koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10,0 mL *otopine 1* mućkano je s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta. Potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavljao *otopinu 2*.

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

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

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

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

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

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

3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (1960).

Pulverizirana biljna droga (0,2 g) ekstrahirana je 30 minuta s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne klorovodične kiseline i 1 mL 0,5%-tne otopine heksametilentetramina, zagrijavanjem do vrenja na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Hidrolizat je propušten kroz vatu, a ostaci droge na vati ponovo su ekstrahirani s 20 mL acetona, grijanjem do vrenja 10 minuta. Ta je otopina također propuštena kroz vatu, a prethodno opisana ekstrakcija acetonom ponovljena je dva puta. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100,0 mL. Potom je 20,0 mL hidrolizata pomiješano s 20 mL vode te ekstrahirano najprije s 15 mL, a zatim tri puta s po 10 mL etil acetata. Sjedinjene etil acetatne faze isprane su dva puta s po 40 mL vode, propuštene kroz vatu i razrijeđene etil acetatom do 50,0 mL. Po 10,0 mL te otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25 mL. U svaku je tikvicu dodano 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijeva citrata. U jednu tikvicu dodano je još 2 mL otopine aluminijeva klorida (2 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno je u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline). Potom su obje tikvice dopunjene do 25,0 mL 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta, izmjerene su apsorbancije otopina s aluminijevim kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus bila je prethodno pripremljena otopina bez aluminijeva klorida. Maseni udio flavonoida izračunat je kao kvercetin, prema izrazu:

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

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

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina

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

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

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

Kompezacijska otopina. 1,0 mL ektrakta razrijedi se destiliranom vodom u odmjernoj tikvici do 10 mL.

Maseni udio ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline, izražen kao ružmarinska kiselina, izračuna se prema izrazu:

$$\%\ \text{hidroksicimetnih derivata} = \frac{A \times 2{,}5}{m}$$

A = apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm; m = masa droge (g)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati kvalitativne analize polifenola

4.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja polifenola

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

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

2. Reakcija promjene boje dodatkom željezova(III) klorida u metanolni ekstrakt droge

Dodatkom 5%-tne otopine željezova(III) klorida metanolnom ekstraktu droge nastalo je vrlo intenzivno narančastožuto obojenje.

3. Reakcija taloženja dodatkom olovova acetata u metanolni ekstrakt droge

Dodatkom 10%-tne otopine olovova acetata u metanolni ekstrakt droge nastalo je pahuljasto zamućenje narančastosmeđe boje vrlo jakog intenziteta.

4. Reakcija taloženja dodatkom barijeva hidroksida u metanolni ekstrakt droge

U taložnoj reakciji s barijevim hidroksidom nastalo je slabo vidljivo zamućenje narančastosmeđe boje.

5. Reakcija taloženja dodatkom pikrinske kiseline u metanolni ekstrakt droge

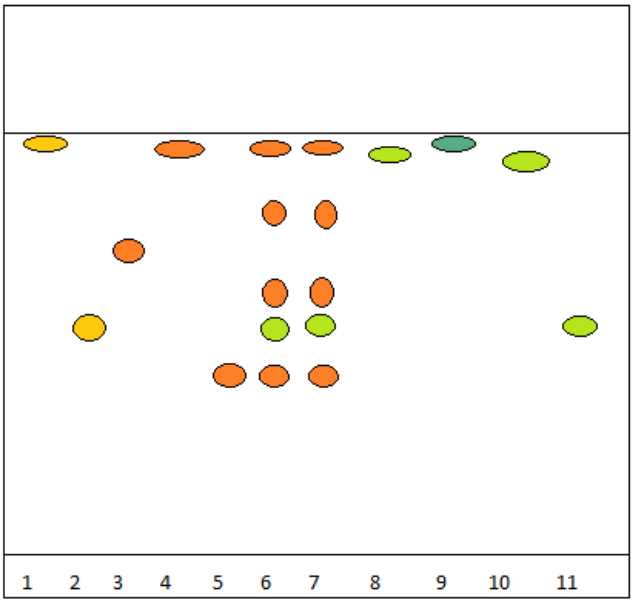
Reakcijom polifenola iz metanolnog ekstrakta droge s pikrinskom kiselinom nastalo je slabo zamućenje.

4.1.2. Rezultati tankoslojne kromatografije (TLC) flavonoida

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

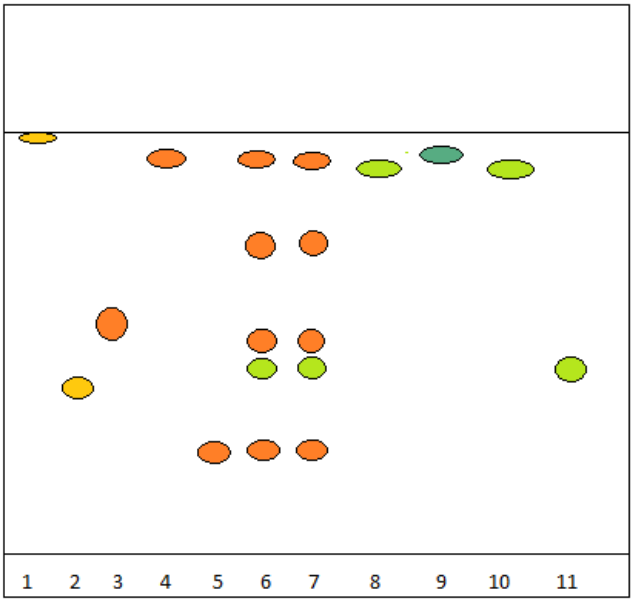
Na kromatogramima su uočene narančaste fluorescirajuće mrlje karakteristične za flavonoide i plavozelene zone fenolnih kiselina. Uzorak, tj. metanolni ekstrakt droge, razdijelio se kromatografijom na 5 različitih zona. Iz dobivenog kromatograma, na temelju R_f vrijednosti i boje razvijene kromatografske zone, može se ustvrditi da metanolni ekstrakt dubrovačke zečine sadrži rutin, klorogensku kiselinu i kvercetin.

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



Slika 10. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i fenolnih kiselina te metanolnog ekstrakta dubrovačke zečine u razvijaču etil acetat - mravlja kiselina - ledena octena kiselina - voda (100:11:11:27, V/V). Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254}; detekcija: NST/PEG i UV-365 nm.

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



Slika 11. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i fenolnih kiselina te metanolnog ekstrakta dubrovačke zečine u razvijaču etil acetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1, V/V). Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254}; detekcija: NST/PEG i UV-365 nm.

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

4.2. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

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

4.2.1.1. Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina

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

Dodatkom 5%-tne otopine željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge nastalo je vrlo intenzivno zelenoplavo obojenje.

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

Reakcijom trjeslovina s željezovim(III) amonijevim sulfatom nastaje plavozeleno obojenje. Nastalo obojenje vrlo je velikog intenziteta.

3. Reakcija taloženja dodatkom olovova acetata u vodeni ekstrakt droge

Trjeslovine stvaraju s olovovim acetatom pahuljasto zamućenje narančastosmeđe boje. Dobiveno zamućenje također je vrlo jakog intenziteta.

4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

U reakciji trjeslovina sa želatinom dobiveno je lagano blijedožuto zamućenje.

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

Dodatkom 1%-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt droge nastalo je crveno obojenje.

4.2.1.2. Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina

Nakon dodatka formaldehida i 10%-tne klorovodične kiseline u vodeni ekstrakt droge, zagrije se do vrenja te se potom sadržaj ohladi i profiltrira. Filtar papir se ispere s 1 ml tople vode, a kondenzirane trjeslovine dokazuju se talogom na filtar papiru koji je netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

Ne može se sa sigurnošću potvrditi prisutnost kondenziranih trjeslovina u ekstraktu dubrovačke zečine jer je uočena neznatna količina taloga na filtar papiru.

4.2.1.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu iz reakcije za dokazivanje kondenziranih trjeslovina doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata bez protresivanja, a zatim jedan mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. Dobiven je jasno vidljiv ljubičasti prsten u području prikladnog pH.

4.3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u uzorku vrste *Centaurea ragusina* provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (poglavlje 3.3.3.). Metoda se temelji na reakciji polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR), kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom. Nakon dodatka FCR, izmjerene su apsorbancije dobivenih plavih otopina na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina određena je pomoću prethodno dobivenog baždarnog pravca, na osnovi izmjerenih apsorbancija analiziranih poredbenih otopina taninske kiseline propisanih koncentracija.

Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* i *otopine 2* očitaju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog dijagrama i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%), pri čemu vrijedi izraz:

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

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Napravljene su dvije ekstrakcije droge te su za svaki od ekstrakata uzeta po dva uzorka za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina. Za svaki od uzoraka tri puta je izvršeno mjerenje apsorbancije.

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

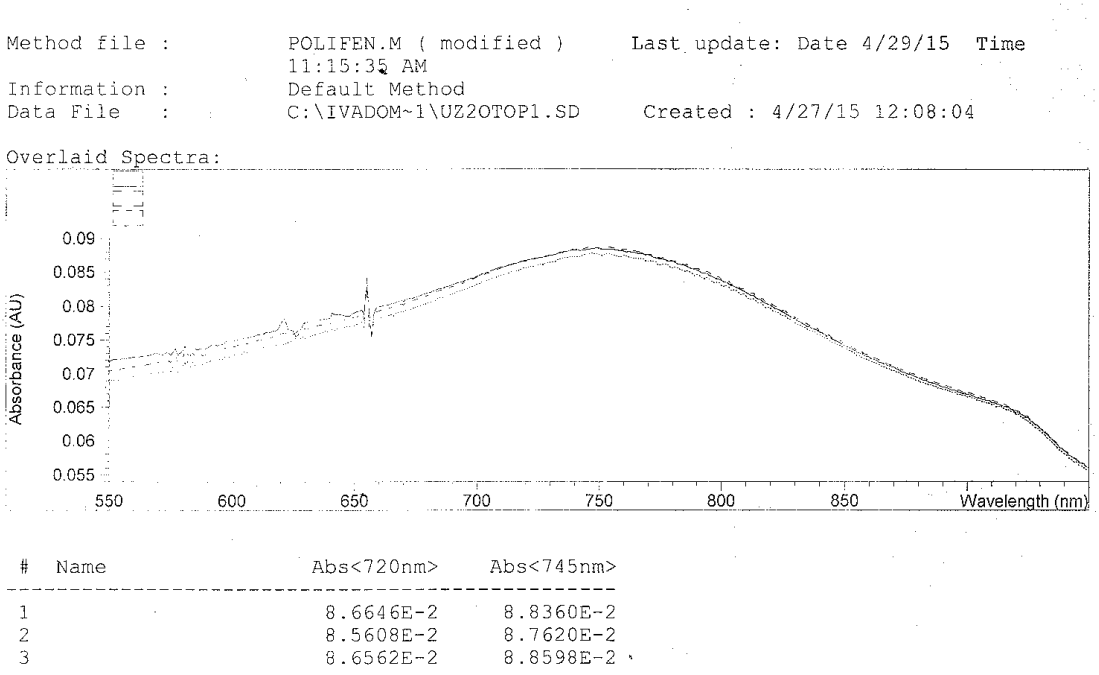
Sadržaj ukupnih polifenola iznosi 3,04±0,04% , a sadržaj trjeslovina 0,36±0,04%.

Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

		Ukupni polifenoli		Sadržaj ukupnih polifenola	
		$A_{720\ nm}$ otopine 1	Srednja vrijednost $A_{720\ nm}$ ot 1 ± SD	%	Srednja vrijednost % ± SD
ekstrakt 1	uzorak 1	0,073		2,92	
		0,070	0,071 ± 0,001	2,80	2,84 ± 0,05
		0,070		2,80	
	uzorak 2	0,075		3,00	
		0,072	0,073 ± 0,002	2,88	2,91 ± 0,06
		0,071		2,84	
ekstrakt 2	uzorak 1	0,074		2,96	
		0,072	0,073 ± 0,001	2,88	2,93 ± 0,04
		0,074		2,96	
	uzorak 2	0,087		3,48	
		0,086	0,087 ± 0,000	3,44	3,47 ± 0,02
		0,087		3,48	

Tablica 2. Sadržaj trjelovina u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		$A_{720\ nm}$ otopine 2	Srednja vrijednost $A_{720\ nm}$ ot.2±SD	A1-A2	Srednja vrijednost (A1-A2)±SD	%	Srednja vrijednost % ± SD
ekstrakt 1	uzorak 1	0,062		0,011		0,44	
		0,064	0,062 ± 0,001	0,006	0,009 ± 0,002	0,24	0,35 ± 0,07
		0,061		0,009		0,36	
	uzorak 2	0,065		0,010		0,40	
		0,065	0,065 ± 0,000	0,007	0,008 ± 0,002	0,28	0,31 ± 0,06
		0,065		0,006		0,24	
ekstrakt 2	uzorak 1	0,066		0,008		0,32	
		0,065	0,066 ± 0,000	0,007	0,008 ± 0,000	0,28	0,31 ± 0,02
		0,066		0,008		0,32	
	uzorak 2	0,075		0,012		0,48	
		0,075	0,075 ± 0,000	0,011	0,012 ± 0,000	0,44	0,47 ± 0,02
		0,075		0,012		0,48	



Slika 12. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

4.4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (poglavlje 3.3.4.). Metoda se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+}. Tvorbi kompleksa prethodi kisela hidroliza flavonoidnih heterozida kako bi se omogućilo oslobađanje aglikona.

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

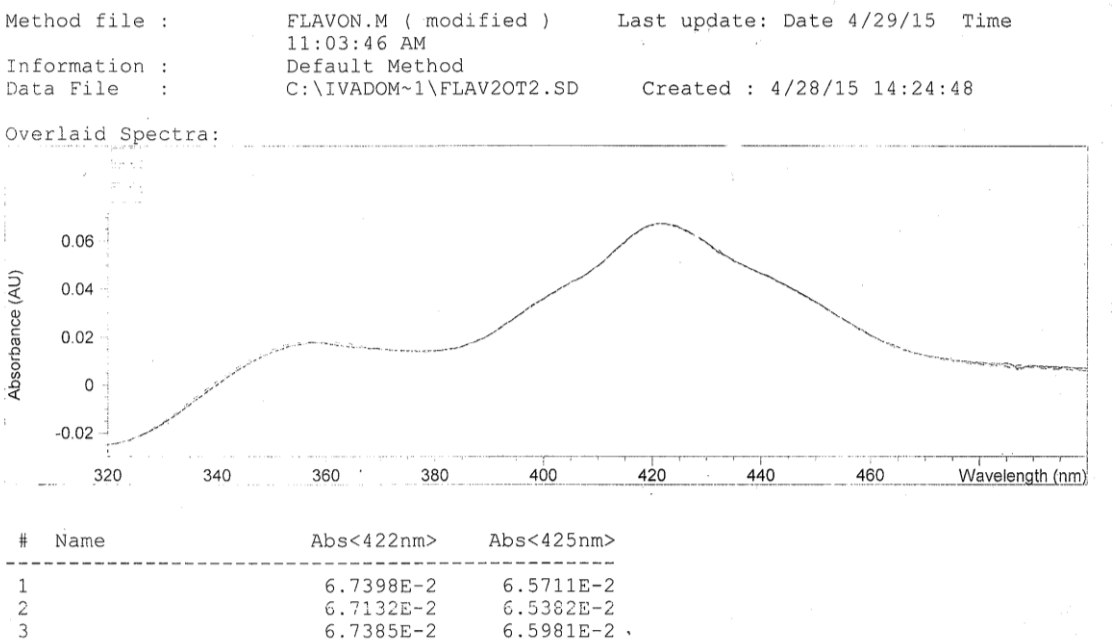
Pripremljena su dva ekstrakta te je za svaki ekstrakt po dva puta uziman uzorak za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Za svaki je uzorak po tri puta mjerena apsorbancija.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u ekstraktima nadzemnih dijelova dubrovačke zečine prikazani su u Tablici 3.

Sadržaj flavonoida vrste *C. ragusina* iznosio je 0,25±0,00%.

Tablica 3. Sadržaj flavonoida u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

	Masa uzorka (g)		$A_{425\ nm}$	Srednja vrijednost $A_{425\ nm}$ ± SD	% flavonoida	Srednja vrijednost % flavonoida ± SD
ekstrakt 1	0,2000	uzorak 1	0,063	0,063 ± 0,000	0,24	0,24 ± 0,00
			0,063		0,24	
			0,062		0,24	
		uzorak 2	0,066	0,066 ± 0,000	0,26	0,26 ± 0,00
			0,065		0,26	
			0,066		0,26	
ekstrakt 2	0,2005	uzorak 1	0,067	0,067 ± 0,000	0,26	0,26 ± 0,00
			0,067		0,26	
			0,067		0,26	
		uzorak 2	0,064	0,064 ± 0,000	0,25	0,25 ± 0,00
			0,064		0,25	
			0,063		0,24	



Slika 13. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

4.5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine provedena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium iz Europske farmakopeje (poglavlje 3.3.5.). Određivanje se temelji na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata koja s nitrit-molibdat reagensom daje žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine, žuta boja prelazi u narančastocrvenu. Apsorbancija se mjeri na 505 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, izražen kao ružmarinska kiselina, izračuna pomoću specifične apsorbancije koja za ružmarinsku kiselinu iznosi 400 (Vladimir-Knežević, 2008).

Dva puta je ponovljena ekstrakcija nadzemnih biljnih dijelova te su od svakog od dobivenih ekstrakata uzeta po dva uzorka za spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina. Tri puta je mjerena apsorbancija za svaki uzorak.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina vrste *C. ragusina* prikazani su u Tablici 4.

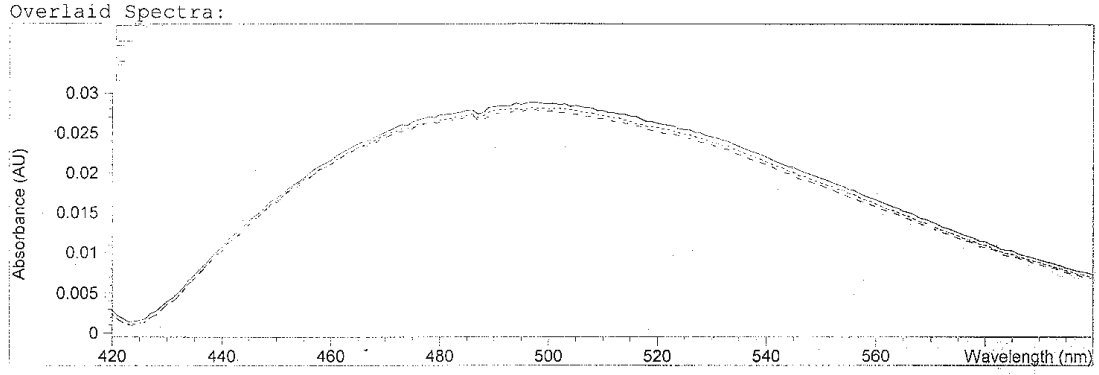
Sadržaj fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrste *C. ragusina* iznosio je 0,38±0,01%.

Tablica 4. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

	Masa uzorka (g)		A_{505nm} otopine	Srednja vrijednost A_{505nm} ± SD	% fenolnih kiselina (FK)	Srednja vrijednost % FK ± SD
ekstrakt 1	0,1999	uzorak 1	0,031	0,031 ± 0,000	0,39	0,39 ± 0,01
			0,031		0,39	
			0,030		0,38	
		uzorak 2	0,029	0,029 ± 0,000	0,36	0,36 ± 0,00
			0,029		0,36	
			0,029		0,36	
ekstrakt 2	0,1996	uzorak 1	0,031	0,029 ± 0,001	0,39	0,37 ± 0,01
			0,028		0,35	
			0,029		0,36	
		uzorak 2	0,033	0,030 ± 0,002	0,41	0,38 ± 0,02
			0,029		0,36	
			0,029		0,36	

Method file : FENKIS.M (modified) Last update: Date 4/29/15 Time 11:11:53 AM
Information : Default Method
Data File : C:\IVADOM~1\PAUZ3OT3.SD Created : 4/27/15 14:35:22

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<505nm>	#	Name	Abs<505nm>
1		2.8425E-2	3		2.7305E-2
2		2.7760E-2			

Slika 14. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija endemske vrste *Centaurea ragusina* L. (dubrovačka zečina), koja je obuhvatila kvalitativnu analizu ukupnih polifenola, flavonoida i trjeslovina, kao i kvantitativnu analizu ukupnih polifenola i trjeslovina te flavonoida i fenolnih kiselina.

Potvrđena je prisutnost polifenola i trjeslovina u ispitanim biljnim ekstraktima primjenom kemijskih reakcija stvaranja obojenih produkata ili taloga. Reakcijom s natrijevim acetatom i željezovim(III) amonijevim sulfatom dokazane su trjeslovine koje hidroliziraju. Također je ispitana prisutnost flavonoida i fenolih kiselina primjenom tankoslojne kromatografije, a na temelju R_f vrijednosti i boje detektiranih kromatografskih zona može se ustvrditi da metanolni ekstrakt dubrovačke zečine sadrži kvercetin, rutin i klorogensku kiselinu.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovinama u ekstraktima dubrovačke zečine određena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima iznosio je 3,04±0,04%, a udio trjeslovina je bio 0,36±0,04%.

Kvantitativna analiza flavonoida dubrovačke zečine provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+}, a sadržaj flavonoida u nadzemnim biljnim dijelovima je iznosio 0,25%±0,00%.

Fenolne su kiseline u uzorcima dubrovačke zečine određene spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji s nitrit-molibdat reagensom, a njihov je sadržaj iznosio 0,38±0,01%.

Provedena fitokemijska karakterizacija u okviru ovoga diplomskog rada predstavlja prilog znanstvenom istraživanju hrvatskih endema i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu dubrovačke zečine, posebice u odnosu na znatan sadržaj fenolnih tvari dokazanih bioloških učinaka (ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina).

6. LITERATURA

1. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49, 2914-2920.
2. Ascacio-Valdés JA, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilera-Carbo A, Prado-Barragán A, Rodriguez-Herrera R, Aguilar CN. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J Med Plant Res*, 2011, 5, 4696-4703.
3. Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum. Plant Physiol Biochem*, 2002, 40, 983-995.
4. Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.
5. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr Rev*, 1998, 56, 317-333.
6. Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baeumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr*, 2011, 30, 490-493.
7. Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)*, 2009, 6, 33.
8. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen des Gehaltes an Flavanol-derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.
9. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 2007, 43, 348-361.
10. de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 3203-3228.
11. Erhardt W, Götz E, Bödeker N, Seybold S. Zander-Handwörterbuch der Pflanzennamen. 17. Aufl. Stuttgart, Eugen Ulmer GmbH und Co., 2002, str. 154.
12. European Pharmacopoeia, Sixth Edition, Vol. 2, Strasbourg: Councile of Europe, 2007.

13. Furtado MA, de Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mut Res*, 2008, 657, 150-154.
14. Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, str. 159-160.
15. Gülcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, 207, 213-220.
16. Hagerman AE. The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.
17. Harborne JB. Biochemistry of Phenolic Compounds. London-New York, Academic Press, 1964, str. 57-62, 83, 136, 149.
18. Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep*, 1994, 11, 41-66.
19. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Natr Cancer*, 2010, 61, 1-20.
20. Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyauma AH, Yamasaki H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int J Mol Med*, 2011, 28, 595-598.
21. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on dumical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine*, 2004, 11, 424-430.
22. Kalođera Z. Farmakognozija II. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.
23. Kim HP, Mani I, Ziboh VA. Effects of naturally-accurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase from guinea pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1998, 58, 17-24.
24. Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*, 2008, 7, 301-311.
25. Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferryl myoglobin: Consumption vs regeneration. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 323, 373-381.

26. Maleš Ž. Izolacija i identifikacija flavonoida drače *Paliurus spina-christi* Mill., Magistarski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1990, str. 49.
27. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.
28. Miller AL. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1996, 1, 103-111.
29. Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. *Biochem Syst Ecol*, 1993, 21, 833-846.
30. Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structurein Medicinal and Food Plants – Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 2011, 16, 2191-2217.
31. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopoly saccharide (LPS) – induced liver injury in d-galactosamine (dGalN) – sensitized mice. *Free Radical Med*, 2002, 33, 798-806.
32. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflamatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 2004, 25, 549-557.
33. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.
34. Petrik J. Polifenoli-antioksidansi, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.
35. Politeo O, Skocibusic M, Carev I, Burcul F, Jerkovic I, Sarolic M, Milos M. Phytochemical profiles of volatile constituents from *Centaurea ragusina* leaves and flowers and their antimicrobial effects. *Nat Prod Commun*, 2012, 7, 1087-1090.
36. Primorac I. Kvantitativna analiza polifenola hrvatskih populacija vrste *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2012.

37. Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Nisimoto Y, Yoshino M. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Res*, 2005, 39, 995-1003.
38. Radić S, Peharec Štefanić P, Lepeduš H, Roje V, Pevalek-Kozlina B. Salt tolerance of *Centaurea ragusina* L. is associated with efficient osmotic adjustment and increased antioxidative capacity. *Environ Expe Bot*, 2013, 87, 39-48.
39. Radić S, Prolić M, Pavlica M, Pevalek-Kozlina B. Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L. *Environ Expe Bot*, 2005, 54, 213-218.
40. Radić S, Radić-Stojković M, Pevalek-Kozlina B. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. *J Plant Physiol*, 2005, 163, 1284-1292.
41. Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1994, 1, 3485-3498.
42. Rangari VD. Pharmacognosy Tannin Containing Drugs, J. L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.
43. Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 2009, 58, 121-128.
44. Robards K, Prenzler PD, Tucke G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*, 1999, 66, 401-436.
45. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agr Food Chem*, 2003, 51, 2866-2887.
46. Russell WR, Burkitt MJ, Provan GJ, Chesson A. Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. *J Sci Food Agric*, 1999, 79, 408-410.
47. Saija A, Scalese M, Lanza M et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19, 481-486.
48. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. In vitro and in vivi antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*, 2011, 403, 136-138.

49. Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.
50. Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Arch Pharm*, 1976, 309, 38-44.
51. Steinegger E, Hänsel R. Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie, 4. Auflage, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris, Springer Verlag, 1998, str. 389.
52. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The „French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med*, 2001, 32, 314-318.
53. Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2007, 51, 3367-3370.
54. Šilić Č. Endemične biljke. Sarajevo, Svjetlost, 1990, str. 154.
55. Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol*, 2002, 449, 261-267.
56. Tepe B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Bentham) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresour Technol*, 2008, 99, 1584-1588.
57. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europaea, Vol. 4, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae). Cambridge-London- New York-Melbourne, Cambridge University Press, 1976, str. 254.
58. Vladimir S. Izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva timijanolisnog vrisića – *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. Magistarski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1993, str. 8, 20-30.
59. Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.
60. Vieira O, Laranjinha J, Madeira V, Almeida L. Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation: Concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55, 333-340.
61. Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem*, 1997, 60, 73-77.

62. Vuković R. Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (*Coleus blumei* Beuth.). Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2013.
63. Wagner H. Pharmazentische Biologie, Drogen un ihre Inhaltsstoffe, 5. neubearbeittete Auflage. Stuttgart-New York, Gustav Fischer Verlag, 1993, str. 39, 147, 244-249, 267.
64. Widmer TL, Laurent N. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of Phytophthora spp. Pathogenic to *Theobroma cacao*. *Eur J Plant Pathol*, 2006, 115, 377-388.
65. Zengin G, Cakmak YS, Guler GO, Aktumsek A. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three Centaurea species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48, 2638-2641.
66. Zhang LL, Lin YM, Tannins from Canarium album with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9, 407-415.
67. Botaničke zanimljivosti u Konavlima, 2012., http://www.opcinakonavle.hr/index.php/arhiva/306-botanike-zanimljivosti-u-konavlima, pristupljeno 20.04.2015.
68. Glavočike (Compositae), 2012., http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=22240, pristupljeno 20.04.2015.

7. SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija endemske vrste *Centaurea ragusina* L., Asteraceae. Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Provedbom tankoslojne kromatografije potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina i klorogenske kiseline u metanolnom ekstraktu dubrovačke zečine. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari iznosio je: 3,04±0,04% (UP), 0,36±0,04% (T), 0,25±0,00% (F) i 0,38±0,01% (FK). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju hrvatskih endema i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu dubrovačke zečine, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

SUMMARY

In this work, phytochemical characterization of an endemic species, *Centaurea ragusina* L., Asteraceae was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. The thin layer chromatography revealed the presence of quercetin, rutin, and chlorogenic acid in the methanolic extract. Quantitative analysis of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) was carried out using the spectrophotometric methods. The contents of analysed polyphenolic compound were as follows: 3.04±0.04% (TP), 0.36±0.04% (T), 0.25±0.00% (F), and 0.38±0.01% (PA). Performed phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of Croatian endemic species and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of *C. ragusina*, especially in relation to the content of bioactive polyphenolic substances.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

FITOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLIFENOLA VRSTE *CENTAUREA RAGUSINA* L., ASTERACEAE

Iva Domitrović

SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je fitokemijska karakterizacija endemske vrste *Centaurea ragusina* L., Asteraceae. Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Provedbom tankoslojne kromatografije potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina i klorogenske kiseline u metanolnom ekstraktu dubrovačke zečine. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovina (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari iznosio je: 3,04±0,04% (UP), 0,36±0,04% (T), 0,25±0,00% (F) i 0,38±0,01% (FK). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju hrvatskih endema i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu dubrovačke zečine, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 14 grafičkih prikaza, 4 tablice i 68 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Centaurea ragusina*, L., dubrovačka zečina, polifenoli, trjeslovine, flavonoidi, fenolne kiseline, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Dario Kremer, znanstveni savjetnik i voditelj Farmaceutskog botaničkog vrta „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Živka Juričić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: lipanj, 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF POLYPHENOLS FROM *CENTAUREA RAGUSINA* L., ASTERACEAE

Iva Domitrović

SUMMARY

In this work, phytochemical characterization of an endemic species, *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae) was carried out. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. The thin layer chromatography revealed the presence of quercetin, rutin, and chlorogenic acid in the methanolic extract. Quantitative analysis of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) was carried out using the spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds were as follows: 3.04±0.04% (TP), 0.36±0.04% (T), 0.25±0.00% (F), and 0.38±0.01% (PA). Performed phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of Croatian endemic species and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of *C. ragusina*, especially in relation to the content of bioactive polyphenolic substances.

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

Thesis includes: 47 pages, 14 figures, 4 tables, and 68 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Centaurea ragusina*, L., total polyphenols, tannins, flavonoids, phenolic acids, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry

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

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dario Kremer, **Ph.D.** Senior Scientist, Pharmaceutical botanical garden „Fran Kušan“, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2015