Određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antioksidacijskog učinka u vrstama Salvia brachyodon Vand. i Salvia officinalis L.

Pažur, Ante

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:163:948904

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ante Pažur

Određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antioksidacijskog učinka u vrstama *Salvia brachyodon* Vand. i *Salvia officinalis* L.

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Željanu Malešu na ukazanoj prilici, strpljenju i stručnoj pomoći tijekom svih etapa izrade ovog diplomskog rada.
Također zahvaljujem Ivici Trojanoviću, mag. pharm. za skupljanje uzoraka kratkozupčaste kadulje, te doc. dr. sc. Mirzi Bojiću i ostalim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na pruženoj pomoći i strpljenju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Posebno hvala mojoj majci i sestrama na stalnoj potpori i razumijevanju.

SADRŽAJ

1. UVOD.....5
1.1. BOTANIČKI PODACI.....6
1.1.1. Morfološka obilježja, svojstva i rasprostranjenost porodice Lamiaceae.....6
1.1.2. Morfološka obilježja i rasprostranjenost kratkozupčaste kadulje - *S. brachyodon* Vand. 6
1.1.3. Morfološka obilježja i rasprostranjenost kadulje - *S. officinalis* L. 9
1.2. FENOLNI SPOJEVI.....11
1.2.1. Put šikiminske kiseline.....12
1.2.2. Flavonoidi 13
1.2.2.1. Antocijani.....16
1.2.2.2. Mehanizam oksidacije flavonola i antocijanidina.....17
1.2.3. Fenolne kiseline.....18
1.3. DPPH ANTIOKSIDACIJSKI TEST.....19
1.4. KEMIJSKI SASTAV VRSTA RODA *SALVIA* L. 20
1.4.1. Fenolne kiseline.....20
1.4.2. Trjeslovine.....20
1.4.3. Flavonoidi.....20
1.4.4. Eterično ulje.....20
1.5. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST I UPORABA, NUSPOJAVE I TOKSIČNOST, KONTRAINDIKACIJE.....22
1.5.1. Farmakološka aktivnost i uporaba.....22
1.5.2. Nuspojave i toksičnost.....22
1.5.3. Kontraindikacije.....23
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....24
3. MATERIJALI I METODE.....25
3.1. BILJNI MATERIJAL.....25
3.2. APARATI I PRIBOR.....28
3.3. METODE ISTRAŽIVANJA.....29
3.3.1. Određivanje količine flavonoida 29
3.3.2. Određivanje količine fenolnih kiselina.....31
3.3.3. Određivanje antioksidacijskog učinka.....32

3.3.3.1. Priprema ekstrakta.....32
3.3.3.2. Priprema otopine reagensa (DPPH radikala).....32
3.3.3.3. Priprema standardne otopine (galna kiselina).....32
3.3.3.4. Spektrofotometrijska mjerenja (DPPH test).....32
4. REZULTATI I RASPRAVA.....33
4.1. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FLAVONOIDA.....33
4.2. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FENOLNIH KISELINA.....35
4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA.....38
5. ZAKLJUČCI.....43
6. LITERATURA.....45
7. SAŽETAK/SUMMARY.....47
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. Uvod

Upotreba biljnih vrsta u ljekovite svrhe potječe od prvih početaka civilizacije. Biljke roda *Salvia* L. su jedne od takvih biljnih vrsta. Kadulju su cijenile mnoge rane civilizacije. U starom Rimu nazivana je svetom travom, a koristila se kao lijek protiv mnogih bolesti o čemu svjedoči izreka „Cur moriatur homo cui salvia in horto crescit“ („Ne umire čovjek kojemu kadulja raste u vrtu“). Smatra se da je uzgoj kadulje započeo u Grčkoj, a nastavio se sve do današnjih dana. Latinski naziv kadulje - *Salvia* smatra se da dolazi od latinskog *salvare* - spasiti ili od riječi *salvus* - zdrav. U hrvatskom ona ima više naziva, između ostalog to su žalfija, kuš i slavulja.

Kadulja pripada porodici usnatica - Lamiaceae, kojoj je svojstven visoki sadržaj eteričnog ulja koje im daje karakterističan aromatičan miris i odgovorno je za mnoga blagodatna djelovanja ovih biljaka. Kadulja je kao ljekovita biljka cijenjena i na našim prostorima o čemu govori pučka izreka „Kadulja i trava iva od mrtva čovjeka čini živa“. U pučkoj medicini osim listova upotrebljavaju se u ljekovite svrhe cvjetovi i sjemenke kadulje. Vino od kadulje upotrebljavalo se u terapiji raznoraznih oboljenja kao što su giht, bolesti jetre i maternice, kod osipa na koži i bolnih stanja. Kadulji se pripisuje širok spektar djelovanja od antibakterijskog, fungicidnog, antivirusnog do adstringentnog djelovanja, a poznata je i po svom učinku na pospješenje sekrecije i na sprječavanje znojenja. U pučkoj medicini rabila se još i za sniženje šećera u krvi te kod tegoba menstruacijskog ciklusa.

U ovom radu analizirana je količina flavonoida i fenolnih kiselina, te je određen antioksidacijski učinak dviju vrsta roda *Salvia* L. - *S. brachyodon* Vand. i *S. officinalis* L. Fenolne kiseline i flavonoidi su predmet današnjeg sve većeg istraživanja zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja.

1.1. BOTANIČKI PODACI

1.1.1. Morfološka obilježja, svojstva i rasprostranjenost porodice Lamiaceae

Porodica Lamiaceae obuhvaća oko 3500 vrsta, koje su rasprostranjene po cijelom svijetu, a najviše u području Sredozemnog mora i prednje Azije. To su zeljaste biljke, trajnice ili grmovi s križasto nasuprotnim listovima, bez palistića. Cvjetovi su dvospolni, malokad poligamni, jednosimetrični. Čaška je cjevasta ili zvonolika, s 4 do 5 zubaca, za vjenčić je karakteristična valjkasta ili ljevkasta cijev, s 4-5 krpastim (više ili manje) dvousnatim rubom. Gornja usna sastoji se od 2, donja od 3 režnja, prašnika ima 4 (dvomoćni), ponekad 2. Plodnica je nadrasla, 4-gradna, s 1 sjemenim zametkom u svakom pretincu. Plod je dvoplodnički kalavac koji se raspada na 4 suha, ponekad mesnata plodića. Najveći dio ovih biljaka bogat je eteričnim uljima koja im daju svojstven, aromatičan miris i antimikrobno djelovanje. Eterično ulje izlučuje se u brojnim žljezdastim dlakama, koje prekrivaju stabljiku, listove i cvjetove te u žlijezdama. Najviše aromatičnih usnatica raste na našem kršu i u primorskim krajevima (Domac, 2002; Grlić, 1990).

1.1.2. Morfološka obilježja i rasprostranjenost kratkozupčaste kadulje - *S. brachyodon* Vand.

Kratkozupčasta kadulja - *S. brachyodon* je endemska Dinarska vrsta s veoma uskom geografskom rasprostranjenošću, ograničenoj na samo dva nalazišta, jedno u Hrvatskoj, na Zmijinom brdu (Vrh Sv. Ilija) - poluotok Pelješac, a drugo na granici Hercegovine i Crne Gore, na planini Orjen (Maksimović i sur., 2007). Botaničar Karl Vandas 1889. godine prvi je otkrio i opisao ovu vrstu na planini Orjen, a 1898. godine otkrio je populaciju na području polutoka Pelješca (www.hirc.botanic.hr).

Kratkozupčasta kadulja je višegodišnja biljka. Stabljike su joj uspravne, visoke 70-80 cm, u donjem dijelu bijelo vunasto dlakave, dok su u gornjem dijelu bez dlaka. Stabljika je presvučena sivobjelkastom tankom prevlakom (Slika 1.). Listovi su na dugoj peteljci, 6-14 cm dugi i 1,5-4 cm široki. Plojka im je cjelovita ili perasto razdijeljena, vršni odsječak je najveći, dok postranih odsječaka ima 1-3, a oni su 2-4 cm dugi i 5-7 mm široki i većinom srasli s vršnim odsječkom (Slika 2.). Dobro razvijeni listovi s gornje strane su slabo dlakavi, a s donje strane su gusto bijelo pustenasti, dok stari listovi postaju kožasti, žutozeleni s jače istaknutim

žilama i oskudnije dlakavi. Plojka je na rubu blago narovašena (naborana). Cvat ove biljke je rahlocvjetna metlica, građena od malog broja cvjetova, s dugačkim bočnim ograncima (Slika 3.), a brakteje brzo otpadaju. Čaška je cjevasto-zvonasta, s jasno izraženim uzdužnim žilama, a dugačka je oko 8-10 mm. Zupci čaške su široko trokutasti i gotovo svi podjednaki, na vrhu ušiljeni. Vjenčić je dvousnat, blijedoružičaste boje, žljezdast, rijetko dlakav, dugačak 24-40 mm. Biljka cvate za vrijeme ljeta, od srpnja do rujna.

Na osnovu danas poznatih nalazišta može se sa sigurnošću reći da je kratkozupčasta kadulja jedna od najrjeđih endemičnih biljnih vrsta dinarskog krša. Morfološki i filogenetski gledano vrsta *S. brachyodon* pripada srodstvenom krugu kadulje (*Salvia officinalis*), te je morfološki najsrodnija balkanskoj endemičnoj vrsti *S. ringens* Sibth. & Sm. koja raste na području Albanije, Srbije, Makedonije, Bugarske, Rumunjske i Grčke. Vrlo detaljan prilog poznavanju kratkozupčaste kadulje dao je Barbalić 1956. godine, gdje autor navodi da je ona najsrodnija grčkoj kadulji - *Salvia fruticosa* Mill., odnosno da je srodnija orijentalnim vrstama roda *Salvia* nego europskim (www.hirc.botanic.hr).



Slika 1. *Salvia brachyodon* Vand. (www.hirc.botanic.hr)



Slika 2. Listovi vrste *Salvia brachyodon* Vand.



Slika 3. Cvat vrste *Salvia brachyodon* Vand. (www.hirc.botanic.hr)

1.1.3. Morfološka obilježja i rasprostranjenost kadulje - *S. officinalis* L.

Kadulja - *S. officinalis* je višegodišnji polugrm, visine 30-70 cm, s drvenastom stabljikom i jakim korijenom. Četverobridna stabljika je slabo razgranata ili uopće nije razgranata. Donji su dijelovi stabljike drvenasti, a gornji zeljasti (Slika 4.). Listovi su uski, eliptični i na dugoj peteljci. Na stabljici se razvijaju nasuprotno. Listovi pri dnu stabljike su bez uškastih lisaka (Slika 5.). Ljubičasti se cvjetovi razvijaju na vrhu ogranaka u obliku prividnih klasova. Čaška je izrazito dvousnata, a njezini zupci produljeni. Cijela je biljka prekrivena gustim dlakama, pa je sivozelene do srebrnaste boje. Plod je dvoplodnički kalavac koji se raspada na 4 oraščića (Kuštrak, 2005; Domac, 2002).



Slika 4. *Salvia officinalis* L.



Slika 5. Listovi vrste *Salvia officinalis* L.

1.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji nastaju iz produkata puta šikiminske kiseline i pentoze fosfata, a uključuju veliku skupinu spojeva od jednostavnih do visoko polimeriziranih (Tablica 1.). Definiraju se kao spojevi koji imaju bar jednu aromatsku jezgru s jednom ili više hidroksilnih skupina. Fenolni spojevi se mogu svrstati u nekoliko skupina kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, kumarini, lignani i trjeslovine. Imaju važnu ulogu u regulaciji rasta biljaka kao unutarnji fiziološki regulatori ili kemijski glasnici. Osim toga štite biljke od sunčeva zračenja apsorbirajući štetna visoko energetska zračenja kratke valne duljine što dovodi do smanjenja oksidativnog stresa, a također sudjeluju i u obrani biljaka od vanjskih predatora.

Fenolni spojevi se mogu podijeliti u slobodni, esterificirani i netopljivi-vezani oblik ovisno o tome da li se pojavljuju u slobodnom obliku ili su kovalentno vezani za druge molekule kao što su masne kiseline (topljivi esteri) ili za netopljive makromolekule (netopljivi-vezani fenoli). Sinteza fenolnih spojeva odvija se većinom na citoplazmatskoj površini endoplazmatskog retikuluma.

Prisutnost biljnih fenola (iz voća, povrća, čaja, crnog vina) u ljudskoj prehrani ima brojne zdravstvene dobrobiti. Fenolni spojevi pokazuju širok spektar učinaka kao što su antialergijski, antiaterogeni, antimikrobni i kardioprotektivni. Prehrana bogata fenolima povezuje se s manjim rizikom oboljenja/smrtnosti od tumora, koronarnih bolesti i dijabetesa tipa 2. Flavonoidi, fenolne kiseline i trjeslovine imaju svojstvo moduliranja metabolizma ugljikohidrata i lipida, inhibiraju α-glukozidaze i α-amilaze koji su ključni enzimi odgovorni za razgradnju prehrambenih ugljikohidrata u glukozu, dovodeći do smanjenja hiperglikemije, dislipidemije i inzulinske rezistencije.

Fenolni spojevi privlače veliku pozornost znanstvenika zbog njihovog antioksidacijskog učinka u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima što ih čini i potencijalnim kandidatima za protutumorske lijekove (Cherrak i sur., 2016; Lin i sur., 2016; Shahidi i Yeo, 2016; Zhou i sur., 2016).

Tablica 1. Podjela, predstavnici i izvori u prehrani prirodnih polifenola

Podjela		Predstavnici	Izvor u prehrani
Flavonoidi	Antocijanidini	Delfinidin, pelargonidin, cijanidin, malvidin	Grejp, šljive, nar, višnje
	Flavonoli	Kvercetin, kempferol, miricetin, izoramnetin, galangin, epikatehin, epigalokatehin, epigalokatehin galat, procijanidini	Jabuke, brokula, grašak, čaj, kakao, vino, kruške
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin	Agrumi
	Flavoni	Apigenin, krizin, luteolin	Celer, naranča, luk, čaj, med, začini
	Izoflavonoidi	Genistein, daidzein	Soja
Fenolne kiseline	Hidroksibenzojeva kiselina	Elagna kiselina, galna kiselina	Nar, grejp, čokolada, vino, zeleni čaj
	Hidroksicimetna kiselina	Ferulična kiselina, klorogenska kiselina	Kava, žitarice
	Lignani	Sezamin, sekoizolaricirezinol diglukozid	Sezam
	Stilbeni	Resveratrol pterostilben piceatanol	Grejp, crno vino

1.2.1. Put šikiminske kiseline

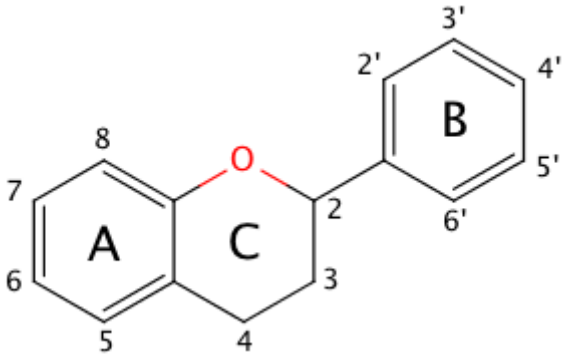
Put šikiminske kiseline je biosintetski put aromatskih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana u mikroorganizama i biljaka.

Prvi korak je kondenzacija fosfoenolpiruvata i eritroza-4-fosfata kojom nastaje 3-dehidrošikiminska kiselina, koja redukcijom daje šikiminsku kiselinu. Daljnji korak uključuje fosforilaciju šikiminske kiseline uz enzim šikimat-kinazu i nastajanje 3-fosfošikiminske kiseline, koja se ponovno kondenzira s molekulom fosfoenolpiruvata uz nastajanje 3-fosfoenolpiruvilšikiminske kiseline (EPSP). Enzim korizmat-sintaza katalizira pretvorbu EPSP u korizmat koji se prevodi u fenilpiruvat preko intermedijera prefenske kiseline. Fenilpiruvat transaminacijom daje fenilalanin (Herrmann, 1995).

1.2.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi su dio ljudske prehrane (prosječni unos u U.S. je 1g/dan), iako je glavni predmet današnjih istraživanja na njihovom antioksidacijskom učinku gdje djeluju kao reducensi - uklanjaju slobodne radikale i sprječavaju oksidaciju biološki aktivnih molekula. Njihovo biološko djelovanje nije ograničeno samo na antioksidativna svojstva. Određeni flavonoidi posjeduju protutumorski učinak, imaju protektivni učinak na kardiovaskularni i gastrointestinalni sustav i pokazuju pozitivne učinke u terapiji bolesti živčanog sustava, kao što su: depresija, epilepsija, Alzheimerova bolest i neurodegenerativne bolesti.

Flavonoidi su sastavljeni od tri prstenaste strukture s C6-C3-C6 oblikom (Slika 6.), koje stvaraju različite podskupine flavonoida kao što su flavoni (apigenin, krizin i luteolin), flavanoni (hesperidin i naringenin), flavonoli (kvercetin, kempferol, miricetin, izoramnetin, galangin, epikatehin, epigalokatehin, epigalokatehin galat, procijanidini), flavanonoli, izoflavonoidi (genistein, daidzein) i antocijanidini (delfinidin, pelargonidin, cijanidin i malvidin). Biosinteza flavonoida u biljaka počinje s putem šikiminske kiseline, a nastavlja se fenilpropanoidnim putem. Sinteza započinje spajanjem *p*-kumaroil-CoA s tri molekule malonil-CoA, stvarajući naringenin kalkon djelovanjem kalkon sintaze (CHS). Nakon toga, djelovanjem izomeraze nastaju flavanoni koji se mogu prevesti u različite skupine flavonoida preko individualnih enzimatskih reakcija. Enzimi CHS i fenilalanin amonij liaza su pod utjecajem mnogih čimbenika okoline kao što su svjetlo, temperatura, koncentracija CO_2, hranjive tvari iz zemlje i voda.



Slika 6. Molekularna struktura jezgre flavonoida

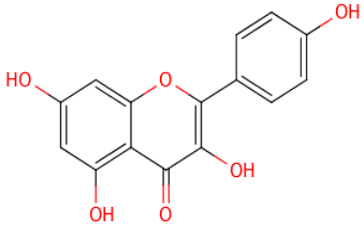
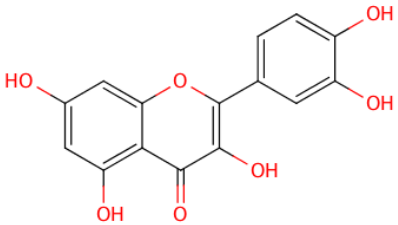
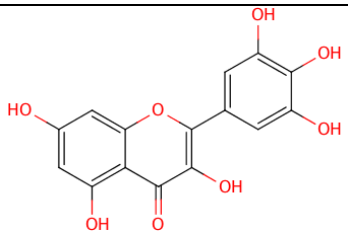
Flavonoidi imaju važnu ulogu u obrani biljaka. Mogu se izlučiti u tlo gdje sprječavaju rast drugih biljaka. Štite od UV zračenja i reguliraju antioksidativnu ravnotežu u biljaka, čuvajući biljke od mutageneze. Mnogi imaju antifungalna i insekticidna svojstva. Glavni biološki učinak flavonoida prema dosadašnjim istraživanjima je njihov antioksidativni učinak. Tijekom normalnog metabolizma, reaktivne kisikove (ROS, kao što su hidroksilni radikal, superoksid anion i vodikov peroksid) i dušikove vrste (RNS, kao što su dušikov oksid i dušikov dioksid) se konstitutivno stvaraju i doprinose staničnom starenju, mutagenezi ili karcinogenezi. Flavonoidi djeluju primarno kao čistači slobodnih radikala zbog njihove sposobosti da stabiliziraju slobodne radikale i druge aktivne spojeve. Ta antiradikalna/antioksidativna aktivnost usko je povezana s redoks svojstvima fenolnih hidroksilnih skupina koje se jednostavno oksidiraju. Njihovi konjugirani aromatski prsteni i hidroksilne skupine omogućuju im da djeluju kao čistači radikala, smanjujući djelovanje ROS-ova u tijelu. Istraživanja ovisnosti djelovanja o strukturi su pokazala da je antioksidativna aktivnost povezana s određenim strukturnim čimbenicima kao što su:

- prisutnost jedne ili više slobodnih hidroksilnih skupina na prstenu C
- prisutnost C2-C3 dvostruke veze unutar prstena C
- prisutnost 3-hidroksilne skupine

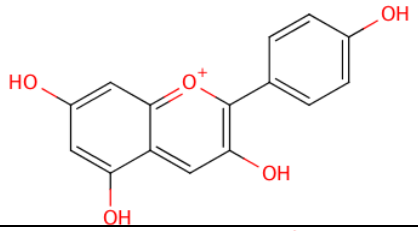
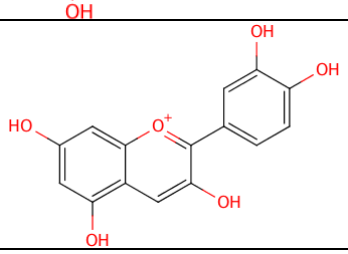
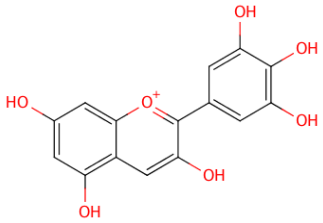
Drugi mogući antioksidativni mehanizam flavonoida je njihova interakcija s redoks enzimima. Flavonoidi aktiviraju detoksificirajuće enzime kao što su NAD(P)H kinon oksidoreduktaza, glutation S-transferaza i UDP-glukuronil-transferaza, koji svi pripadaju enzimima koji sudjeluju u borbi protiv oksidativnog stresa (Arroyo-Currás i sur., 2016; Cherrak i sur., 2016; Ghasemzadeh i sur., 2016; Perez-Cano i Castell, 2016; Shahidi i Yeo, 2016). Flavonoidi posjeduju i protuupalno djelovanje koje je posljedica inhibicije mnogih enzima koji sintetiziraju proupalne čimbenike (leukotriene i citokine) i čimbenike koji pojačavaju aktivnost upalnih stanica (poput 5-lipoksigenaze koja sintetizira upalne medijatore leukotriene i tirozin-kinaza koje aktiviraju upalne stanice). Flavonoidi također smanjuju propusnost kapilara i povećavaju njihovu otpornost na lomljenje, a neki djeluju spazmolitički i diuretski. S obzirom na velik broj i različitost struktura flavonoida ne čudi njihova raznolikost djelovanja (Marković, 2010).

Među flavonoidima, flavonoli i antocijanidini su dvije najčešće skupine flavonoida u ljudskoj prehrani (Tablice 2. i 3.) (Arroyo-Currás i sur., 2016).

Tablica 2. Nazivlje i struktura odabranih flavonola kao jedne od najčešćih skupina flavonoida u ljudskoj prehrani

Spoj	Struktura
Kempferol	
Kvercetin	
Miricetin	

Tablica 3. Nazivlje i struktura odabranih antocijanidina kao jedne od najčešćih skupina flavonoida u ljudskoj prehrani

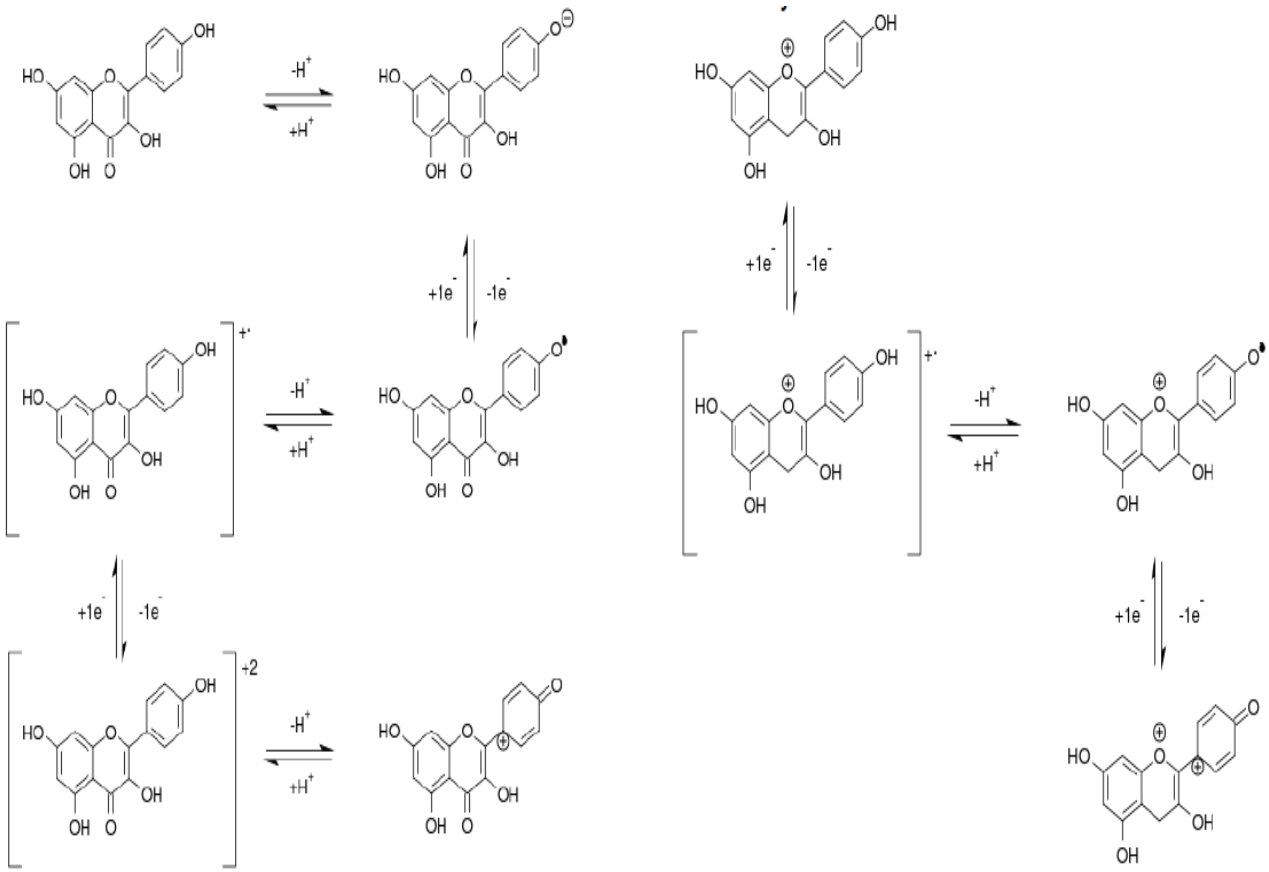
Spoj	Struktura
Pelargonidin	
Cijanidin	
Delfinidin	

1.2.2.1. Antocijani

Antocijani i njihovi aglikoni antocijanidini se u biljkama pojavljuju kao pigmenti. Antocijani su ioni jer posjeduju naboj koji je delokaliziran u aromatskom sustavu i mijenja svojstva molekule uključujući i njenu boju. Boja antocijana ovisi o pH vrijednosti otopine u kojoj se nalaze. Farmakološki, antocijani i antocijanidini djeluju dobro na funkciju kapilara smanjujući njihovu propusnost i krhkost. Mehanizam djelovanja leži u inhibiciji enzima koji razgrađuju kolagen i time povećavaju krhkost kapilara. Dokazano je da djeluju protiv nastajanja edema, a u očima regeneriraju vidni pigment u mrežnici (rodopsin). U sinergiji s drugim spojevima djeluju protuupalno. Osim ovog terapijskog djelovanja, antocijani su prirodne, neotrovne boje koje se koriste u prehrambenoj industriji (Marković, 2010).

1.2.2.2. Mehanizam oksidacije flavonola i antocijanidina

Prvi korak u oksidaciji flavonola je odlazak protona iz hidroksilne skupine na prstenu B čime nastaje anion. Anion se oksidira do neutralnog radikala i nakon toga se protonira do radikal kationa. Radikal kation se dalje oksidira do +2 kationa koji se deprotonira do +1 kationa. Antocijanidini se oksidiraju odlaskom elektrona, stvarajući +2 radikal kation, koji gubi proton i stvara +1 kation radikal koji se dalje oksidira gubljenjem jednog elektrona do krajnjeg oksidiranog spoja. Dva oksidacijska mehanizma se razlikuju u postojanju brze ravnoteže između protonacije-deprotonacije, uključene u proces oksidacije flavonola, koja služi za olakšanje gubitka jednog elektrona i stvaranja radikal kationa, dok se antocijanidini direktno oksidiraju u radikal kation (Slika 7.). U oba slučaja jednom kad je radikal kation stvoren, drugi elektron i proton se gube kako bi se stvorio konačni oksidirani spoj (Arroyo-Currás i sur., 2016).



Slika 7. Pretpostavljeni mehanizam oksidacije za flavonole i antocijanidine (Arroyo-Currás i sur., 2016)

1.2.3. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline su sekundarni biljni metaboliti. Stvaraju se u odgovoru na okolišne čimbenike (svjetlo, temperatura) te su jedne od ključnih molekula za njihov rast i širenje. Fenolne kiseline uključuju hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. U hidroksibenzojeve kiseline spadaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska i elagna kiselina. One nastaju iz fenilpropana skraćivanjem postranog lanca u procesu ß-oksidacije. Postoje u slobodnom i vezanom-esterskom obliku.

Hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska kiselina, kavena, ferulična i klorogenska kiselina, koje se u biljkama pojavljuju u obliku estera.

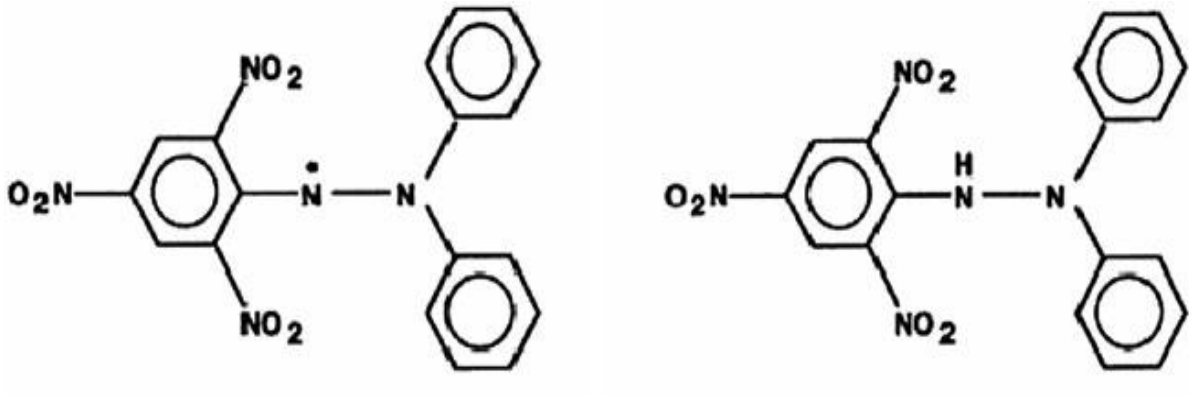
Fenilalanin, kao i tirozin ali u manjoj mjeri, sintetiziran putem šikiminske kiseline iz eritroze 4-fosfata i fosfoenolpiruvata, su prethodnici za sintezu fenolnih kiselina. Fenilalanin prolazi deaminaciju djelovanjem PAL - fenilalanin amonij liaze, stvarajući *trans*-cimetnu kiselinu sa stvaranjem dvostruke veze. *Trans*-cimetna kiselina, djelovanjem CYP 450, prelazi u *p*-kumarinsku kiselinu koja je prethodnica za kavenu, feruličnu i sinapnu kiselinu (Shahidi i Yeo, 2016).

Fenolne kiseline imaju više farmakoloških djelovanja kao što su:

- dobri su antiseptici
- modulatori su imunološkog sustava, djeluju protuupalno i antipiretički
- imaju hepatoprotektivan i koleretični učinak

1.3. DPPH ANTIOKSIDACIJSKI TEST

DPPH je slobodni radikal, stabiliziran delokalizacijom elektrona zbog čega DPPH molekule ne stvaraju dimere kao većina drugih radikala (Slika 8.). Delokalizacija elektrona je također zaslužna za tamnoljubičastu boju u etanolnoj otopini koja ima maksimum apsorpcije na 520 nm. Miješanjem DPPH otopine s drugim spojem koji može donirati vodikov atom nastaje reducirani oblik s gubitkom ljubičaste boje. DPPH test se smatra točnom, jednostavnom i ekonomičnom metodom za procjenjivanje aktivnosti antioksidansa. Rezultati su visoko reproducibilni i mogu se uspoređivati s rezultatima drugih metoda za procjenjivanje aktivnosti antioksidansa. Antioksidativna aktivnost se procjenjuje na sobnoj temperaturi kako bi se poništio rizik od termalne razgradnje testirane molekule (Garcia i sur., 2012; Kedare i Singh, 2011).



Slika 8. Struktura DPPH radikala i njegovog stabilnog oblika (Kedare i Singh, 2011)

Formula Z• + AH = ZH + A• predstavlja osnovnu reakciju DPPH radikala s antioksidansom, gdje Z• predstavlja DPPH radikal, AH antioksidans, ZH reducirani oblik i A• nastali slobodni radikal antioksidansa (Kedare i Singh, 2011).

1.4. KEMIJSKI SASTAV VRSTA RODA *SALVIA* L.

1.4.1. Fenolne kiseline

Vrsta *Salvia officinalis* L. sadrži fenolne kiseline kao što su kavena, klorogenska, elagna, ferulična, galna i ružmarinska kiselina (Barnes i sur., 2002).

1.4.2. Trjeslovine

Trjeslovine (tanini) su kemijski vrlo složena skupina polimernih fenolnih spojeva. Kemijski, na temelju gradivnih jednica mogu se podijeliti u dvije skupine:

- Hidrolizirajući derivati koji se sastoje od galne kiseline ili heksahidrodifenske kiseline, kao što su elagtanini.
- Kondenzirane trjeslovine nazvane i proantocijanidini, koji su polimeri katehina i epikatehina.

U farmaciji su poznate ljekovite trjeslovine dobivene iz vrste *Quercus infectoria* Olivier, Fagaceace. Upotreba im je ograničena kao adstringensi kod kožnih tegoba kao što su manje opekotine.
Vrsta *Salvia officinalis* L. sadrži 3-8% hidrolizirajućih i kondenziranih trjeslovina (Shahidi i Yeo, 2016; Marković, 2010; Barnes i sur., 2002).

1.4.3. Flavonoidi

Vrsta *Salvia officinalis* L. sadrži flavonoid 5-metoksisalvigenin (Barnes i sur., 2002).

1.4.4. Eterično ulje

Analiza uzoraka vrsta *Salvia brachyodon* Vand. i *Salvia officinalis* L. skupljenih s istog nalazišta pokazala je značajnu razliku u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu eteričnog ulja ovih dviju vrsta. Vrsta *S. brachyodon* je karakterizirana visokim sadržajem seskviterpena (67,8%), dok glavna sastavnica eteričnog ulja vrste *S. officinalis* - tujon nije pronađen u

eteričnom ulju vrste *S. brachyodon.* U eteričnom ulju vrste *S. brachyodon* dokazane su 34 sastavnice s humulen epoksidom II kao glavnom sastavnicom (22,9% eteričnog ulja dobivenog iz nadzemnih dijelova biljke).

Glavne sastavnice eteričnog ulja vrste *S. officinalis* jesu α-tujon i ß-tujon. Ostale sastavnice su 1,8 cineol, (+)-kamfor, borneol i bornilacetat. Analize uzoraka s otoka Hvara pokazale su da kadulja iz unutrašnjosti otoka ima veći udio tujona u eteričnom ulju od kadulje koja raste u blizini obale. Kaduljino eterično ulje ima antiseptičko, fungicidno i antiflogističko djelovanje (Maksimović i sur., 2007; Kuštrak, 2005).

1.5. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST I UPORABA, NUSPOJAVE I TOKSIČNOST, KONTRAINDIKACIJE

1.5.1. Farmakološka aktivnost i uporaba

Listovi kadulje posjeduju antibakterijsko, fungicidno, antivirusno i adstringentno djelovanje. Istraživanja su pokazala pozitivan učinak kadulje na kognitivne funkcije i raspoloženje, što je dovelo do daljnih istraživanja antikolinesteraznog učinka eteričnog ulja kadulje. Rezultati su pokazali selektivan antikolinesterazni učinak eteričnog ulja na pojedina područja mozga. Vodeni ekstrakti svježih listova pokazali su inhibicijski učinak na ekscesivno znojenje. Antihidrotski učinak nastupa brzo, a traje još nekoliko dana nakon uporabe. Posljedica je smirivanja perifernog živčanog sustava, a pripisuje se djelovanju tujona i kamfora. Kadulja ima i estrogeno djelovanje; u pučkoj medicini se rabi za prestanak laktacije te pri tegobama mjesečnog ciklusa.

Kaduljini ljekoviti oblici za vanjsku primjenu su najčešće oparci (infuzi), koji se rabe za ispiranje i grgljanje u terapiji upala usne šupljine, ždrijela, protiv gingivitisa i angine. Za unutarnju primjenu kadulja se rabi kao amarum-aromaticum pri dispeptičkim tegobama, tegobama želuca i crijeva te u obliku infuza za smanjenje znojenja (Kuštrak, 2005; Barnes i sur., 2002; Schaffner i sur., 1999).

1.5.2. Nuspojave i toksičnost

Zabilježeni su slučajevi otrovanja ljudi oralnim unosom ulja kadulje namijenjenog za liječenje akni. Akutna LD_{50} vrijednost za ulje kadulje je 2,6 g/kg u štakora za oralnu primjenu i 5g/kg za intradermalnu primjenu u zečeva. Nije pokazan mutageni ili DNA oštećujući učinak vrste *S. officinalis* Amesovim ili *Bacillus rec* testom. Eterično ulje kadulje uzrokuje umjerenu iritaciju kože zbog čega se ne preporučuje u aromaterapiji. Kod predoziranja i dugotrajnijeg uzimanja alkoholnih ekstrakata i čistih eteričnih ulja mogu se javiti grčevi, tahikardija, osjećaj vrućine i vrtloglavice što je posljedica djelovanje tujona (Barnes i sur., 2002; Schaffner i sur., 1999).

1.5.3. Kontraindikacije

Ulje kadulje je toksično (zbog sadržaja tujona) i ne bi ga trebalo oralno primjenjivati. Kadulja može ulaziti u interakcije s postojećom antihiperglikemijskom i antikonvulzivnom terapijom te može potencirati sedativni učinak drugih lijekova. Kontraindicirana je tijekom trudnoće. Tradicionalno se koristila kao abortiv i sredstvo za poboljšanje menstrualnog ciklusa. Eterično ulje sadrži visok udio α- i ß-tujona koji su poznati kao abortivi i emanogozi (Barnes i sur., 2002).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tema ovog rada je određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antioksidacijskog učinka u uzorcima vrsta *S. brachyodon* i *S. officinalis* koje su poznate po svojoj ljekovitosti u pučkoj medicini. Flavonoidi i fenolne kiseline pripadaju skupini polifenola koji djeluju antioksidativno, protuupalno i antialergijski.

Flavonoidi, fenolne kiseline kao i antioksidacijski učinak određeni su spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijski učinak je određen upotrebom stabilnog DPPH radikala, a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu droge.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su osušeni i usitnjeni nadzemni dijelovi vrsta *S. brachyodon* Vand. i *S. officinalis* L. Uzorci vrste *S. brachyodon* skupljeni su na području Pelješca (Slika 9.) na 2 nalazišta. Nalazište na kojemu su skupljeni uzorci vrste *S. brachyodon* iz 2015. godine nalazi se u neposrednoj blizini, približno 50 m zapadno od Planinarske kućice - „Stara kućica“ (Slike 9. i 10.), dok su uzorci iste vrste iz 2016. godine skupljeni na nalazištu smještenom sjeveroistočno od Planinarske kućice, otprilike 5 minuta hoda, u smjeru Vrha Sv. Ilija (Slike 9. i 11.). Uzorci vrste *S. officinalis* skupljeni su u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Zavoda za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, s područja Trogira i drugih područja Republike Hrvatske (Tablica 4.).

Tablica 4. Porijeklo biljnog materijala upotrebljenog u istraživanju

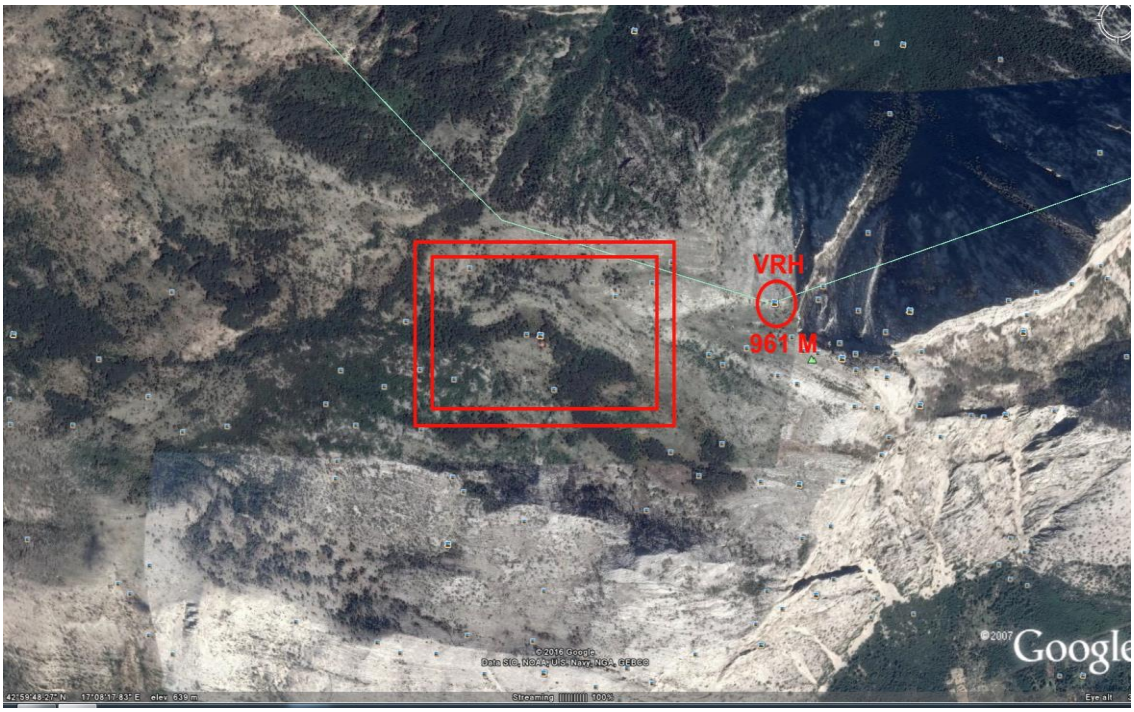
Uzorak	Porijeklo biljnog materijala
Salvia brachyodon - list, 2015.	Pelješac, Republika Hrvatska
Salvia brachyodon - list, 2016.	Pelješac, Republika Hrvatska
Salvia brachyodon - cvijet, 2015.	Pelješac, Republika Hrvatska
Salvia brachyodon - cvijet, 2016.	Pelješac, Republika Hrvatska
Salvia brachyodon - stabljika, 2015.	Pelješac, Republika Hrvatska
Salvia officinalis - „Fran Kušan“ - list, 2016.	Farmaceutski botanički vrt „Fran Kušan“, Zagreb, Republika Hrvatska
Salvia officinalis - Suban - list, 2016.	Trogir, Republika Hrvatska
Salvia officinalis - Biokovo - list, 2016.	Republika Hrvatska
Salvia officinalis - Naturavita - list, 2016.	Republika Hrvatska



Slika 9. Satelitski prikaz šireg geografskog područja s kojega su skupljeni uzorci vrste *S. brachyodon* Vand.



Slika 10. Satelitski prikaz, s naznačenim koordinatama, užeg geografskog područja s kojega su 2015. godine skupljeni uzorci vrste *S. brachyodon* Vand.



Slika 11. Satelitski prikaz užeg geografskog područja, s naznačenim vrhom Sv. Ilija s kojega su 2016. godine skupljeni uzorci vrste *S. brachyodon* Vand.

3.2. APARATI I PRIBOR

Za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja flavonoida i fenolnih kiselina, te za određivanje antioksidacijskog učinka upotrebljen je UV-VIS spektrofotometar Varian Cary 50 Bio (proizvod tvrtke Varian Inc., SAD) Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Za određivanje količine flavonoida upotrebljeni su

- aceton
- 25%-tna kloridna kiselina
- 0,5%-tna vodena otopina heksametilentetraamina
- etilacetat
- 0,5%-tna vodena otopina natrijevog citrata
- otopina aluminijevog klorida (2g $AlCl_3$ x $6H_2O$ otopi se u 100 ml 5%-tne metanolne otopine octene kiseline)
- 5%-tna metanolna otopina octene kiseline
- destilirana voda

Za kvantitativnu analizu fenolnih kiselina upotrijebljeni su

- 50%-tni etanol
- 0,5 mol/dm^3 kloridna kiselina
- otopina natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom (10 g $NaNO_2$ i 10 g $NaMoO_4$ x $2H_2O$ otopi se u 100 mL vode)
- otopina natrijevog hidroksida (8,5 g NaOH otopi se i dopuni vodom do 100 mL)
- destilirana voda

Za određivanje antioksidacijskog učinka upotrijebljeni su

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- galna kiselina (Fluka, Švicarska)
- metanol p.a. (Kemika, Hrvatska)

3.3. METODE ISTRAŽIVANJA

3.3.1. Određivanje količine flavonoida

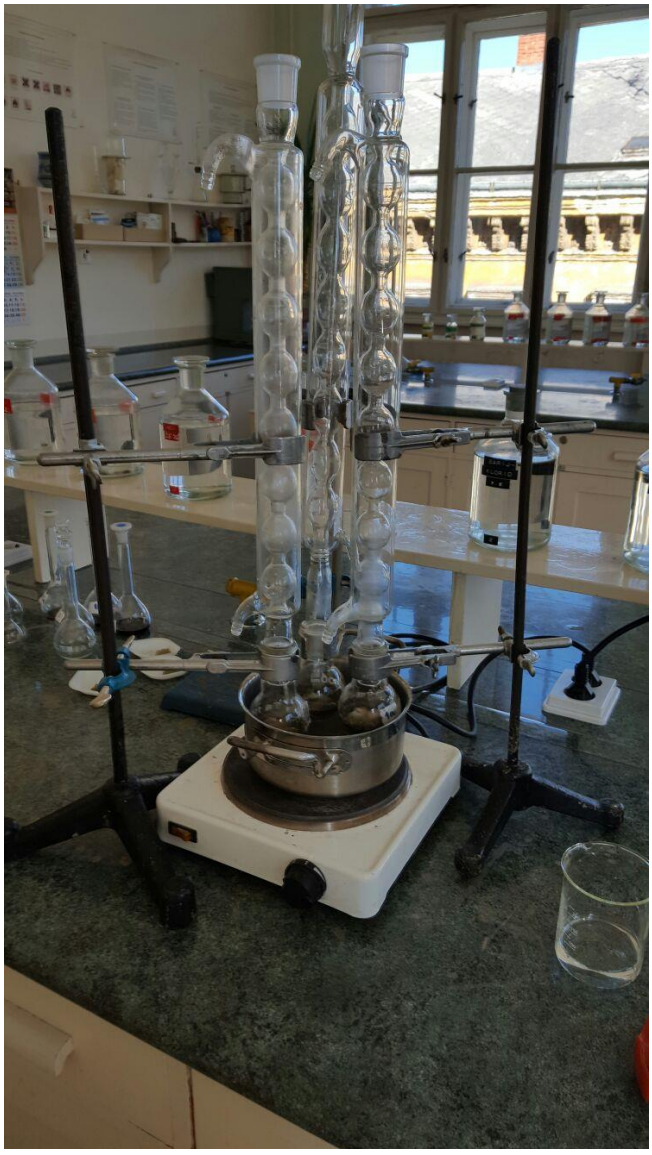
0,3 g biljnog materijala ekstrahira se s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5%-tne vodene otopine heksametilenatetraamina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (Slika 12.). Hidrolizat je propušten kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala na pamuku ponovno su ekstrahirani s 20 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Otopina je propuštena kroz pamuk te je ekstrakcija acetonom ponovljena još jedanput. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100,0 mL. 20 mL hidrolizata pomiješano je s 20 mL vode i ekstrahirano jednom s 15 mL te još tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjene etilacetatne faze isprane su dva puta s 40 mL vode i propuštene kroz pamuk. Razrijeđene su etilacetatom do 50,0 mL. Po 10 mL ove otopine preneseno je u četiri odmjerne tikvice od 25,0 mL. U sve četiri tikvice dodano je 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijevog citrata. U tri tikvice dodano je 2 mL otopine $AlCl_3$, a zatim su tikvice nadopunjene do oznake 5%-tnom metanolnom otopine octene kiseline.
Nakon 45 minuta izmjerena je apsorbancija otopina s aluminijevim kloridom u sloju debljine 1 cm kod 425 nm u odnosu na otopinu bez aluminijevog klorida (Christ i Müller, 1960).

Ukupna količina flavonoida izračunata je kao kvercetin prema izrazu

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 0{,}772}{b}$$

A = apsorbancija

b = 0,3 (odvaga biljnog materijala u gramima)



Slika 12. Ekstrakcija flavonoida

3.3.2. Određivanje količine fenolnih kiselina

Sadržaj fenolnih kiselina određen je prema postupku iz Europske farmakopeje (Ph. Eur. 1990).

0,2 g usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano je sa 190 mL 50%-tnog etanola na vodenoj kupelji uz povratno hladilo tijekom 30 minuta. Hladni se ekstrakt filtrira u odmjernu tikvicu od 200,0 mL, filtar papir se ispere s 10 mL etanola, a tikvica dopuni etanolom do oznake. U tri odmjerne tikvice od 10,0 mL stavi se po 1 mL etanolnog ekstrakta, 2 mL kloridne kiseline (0,5 mol/L), 2 mL otopine natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom i 2 mL otopine natrijevog hidroksida. Tikvice se nadopune vodom do oznake pa izmjeri apsorbancija na 505 nm u odnosu na slijepu probu. Ona se pripremi tako da se u odmjernu tikvicu od 10,0 mL stavi 1 mL etanolnog ekstrakta, 2 mL kloridne kiseline (0,5 mol/L) i 2 mL otopine natrijevog hidroksida te nadopuni vodom do oznake.

Sadržaj fenolnih kiselina izračuna se prema formuli

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 5}{m}$$

A = apsorbancija

m = masa biljnog materijala (g)

3.3.3. Određivanje antioksidacijskog učinka

3.3.3.1. Priprema ekstrakta

Za određivanje antioksidacijskog učinka korišteni su acetonski i etanolni ekstrakti uzoraka dobivenih postupkom ranije navedenim pod **3.3.1. i 3.3.2**.

3.3.3.2. Priprema otopine reagensa (DPPH radikala)

Otopina DPPH radikala priređena je otapanjem odgovarajuće količine DPPH u metanolu, konačne koncentracije 0,3 mM. Radna otopina pripremljena je razrjeđivanjem metanolom tako da konačna apsorbancija bude 0,8 (Maleš i sur., 2013).

3.3.3.3. Priprema standardne otopine (galna kiselina)

Osnovna otopina priređena je otapanjem 0,5 g galne kiseline u 100,0 mL destilirane vode. Iz tako pripremljene osnovne otopine priređene su otopine od 0,01; 0,02; 0,039; 0,078; 0,156; 0,313; 0,5; 0,625; 1,0; 1,25; 2,0; 2,5 i 5,0 mg/mL za spektrofotometrijsku analizu antioksidativnog učinka s DPPH radikalom (Maleš i sur., 2013).

3.3.3.4. Spektrofotometrijska mjerenja (DPPH test)

Nakon miješanja 2 mL otopine standarda ili ekstrakta biljke s 10 μL otopine DPPH reagensa, mjeren je pad apsorbancije na 518 nm nakon 15 minuta. Sva mjerenja su provedena dva puta, te je za daljnju obradu podataka uzeta srednja vrijednost (Maleš i sur., 2013).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FLAVONOIDA

Količina flavonoida u svim uzorcima je određena tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije (Tablica 5.).
Za uspoređivanje količine flavonoida između uzoraka korišten je Studentov *t*-test.

Tablica 5. Udio flavonoida u uzorcima

R.b.	Uzorak	w (%)
1.	*S. brachyodon* - list, 2015.	0,19 ± 0,01
2.	*S.brachyodon* - list, 2016.	**0,21 ± 0,00**
3.	*S. brachyodon* - cvijet, 2015.	**0,08 ± 0,00**
4.	*S. brachyodon* - cvijet, 2016.	0,09 ± 0,00
5.	*S. brachyodon* - stabljika, 2015.	0,12 ± 0,00
6.	*S. officinalis* - „Fran Kušan“ - list, 2016.	**0,23 ± 0,01**
7.	*S. officinalis* - Suban - list, 2016.	0,15 ± 0,00
8.	*S. officinalis* - Biokovo - list, 2016.	0,21 ± 0,01
9.	*S. officinalis* - Naturavita - list, 2016.	**0,14 ± 0,00**

w(%) = $\bar{x}$ ± SD (n = 3)

U vrsti *S. brachyodon* sadržaj flavonoida se kretao od 0,08% do 0,21%. Najveća količina flavonoida nađena je u uzorku listova iz 2016. godine, a najmanja u uzorku cvjetova iz 2015. godine (Slika 13.).

U vrsti *S. officinalis* sadržaj flavonoida se kretao od 0,14% do 0,23%. Najveća količina flavonoida utvrđena je u uzorcima listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, a najmanja u uzorcima listova - Naturavita (Slika 13.).

Provedeni Studentov *t*-test dva uzorka jednake varijance pokazao je da ne postoji statistički značajna razlika u količini flavonoida među uzorcima listova, vrste *S. brachyodon*, iz 2015. i 2016. godina.

Uzorci cvjetova iz 2015. godine i 2016. godine, vrste *S. brachyodon*, ne pokazuju statistički bitnu razliku u količini flavonoida.

Sa signifikantnošću od $p < 0,002$ uzorci cvjetova i listova iz 2015. godine, vrste *S. brachyodon*, statistički se razlikuju u količini flavonoida.

Uzorci cvjetova i listova vrste *S. brachyodon* iz 2016. godine se statistički razlikuju u količini flavonoida, sa signifikantnošću od $p < 0,0001$.

Uzorci vrste *Salvia officinalis* - Naturavita - list i Biokovo - list pokazuju statistički značajnu razliku u količini flavonoida, uz signifikantnost od $p < 0,005$.

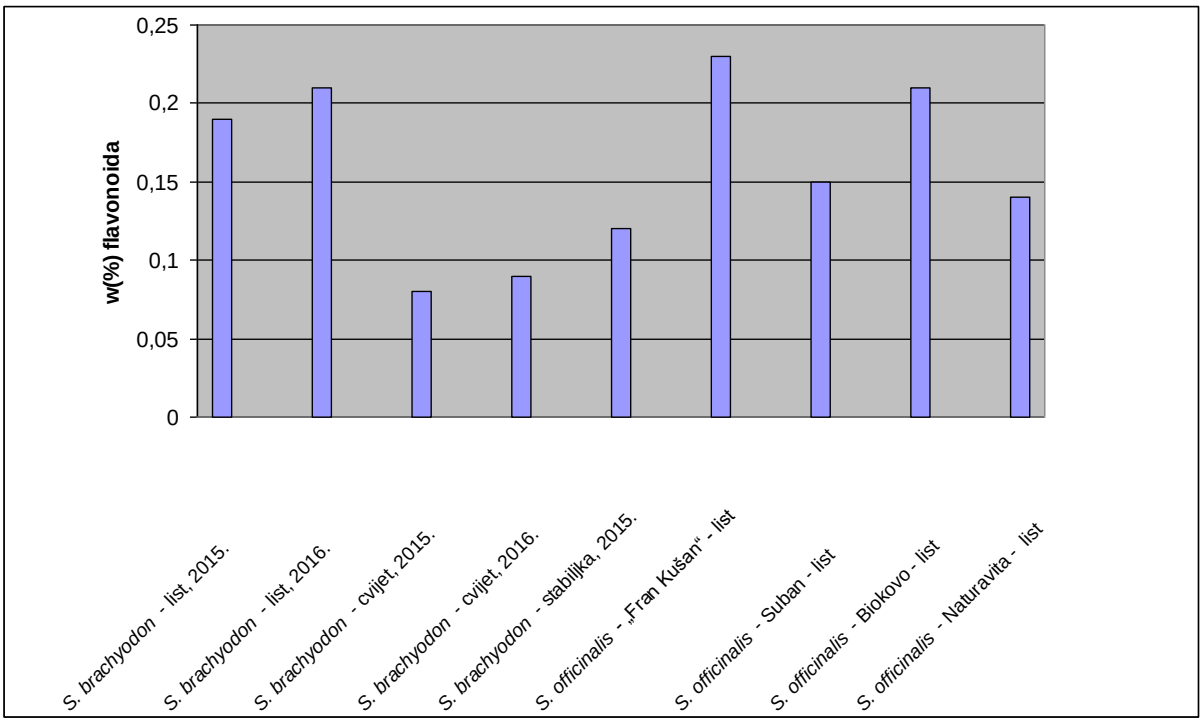
Uzorci Naturavita - list i Suban - list, vrste *S. officinalis*, ne pokazuju razliku u količini flavonoida, koja bi bila statistički važna.

Uzorci listova - Naturavita i „Fran Kušan“, vrste *S. officinalis*, se statistički razlikuju u količini flavonoida, sa signifikantnošću od $p < 0,003$.

Uzorci vrste *S. officinalis* - Biokovo - list i Suban - list pokazuju razliku u količini flavonoida sa statističkom signifikantnošću od $p < 0,009$.

Uzorak Biokovo - list, vrste *S. officinalis*, i uzorak listova - „Fran Kušan“ iste vrste, ne pokazaju statistički značajnu razliku u količini flavonoida.

Količina flavonoida u uzorcima listova - Suban i „Fran Kušan“, vrste *S. officinalis*, se statistički značajno razlikuje, uz signifikantnost od $p < 0,004$.



Slika 13. Grafički prikaz rezultata kvantitativne analize flavonoida

4.2. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FENOLNIH KISELINA

Količina fenolnih kiselina u svim uzorcima je određena tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije (Tablica 6.).

Za uspoređivanje količine fenolnih kiselina između uzoraka korišten je Studentov *t*-test.

Tablica 6. Udio fenolnih kiselina u uzorcima

R.b.	Uzorak	w(%)
1.	*S. brachyodon* - list, 2015.	2,26 ± 0,08
2.	*S.brachyodon* - list, 2016.	**3,04 ± 0,15**
3.	*S. brachyodon* - cvijet, 2015.	0,74 ± 0,03
4.	*S. brachyodon* - cvijet, 2016.	0,70 ± 0,03
5.	*S. brachyodon* - stabljika, 2015.	**0,47 ± 0,02**
6.	*S. officinalis* - „Fran Kušan“ - list, 2016.	**2,22 ± 0,08**
7.	*S. officinalis* - Suban - list, 2016.	2,18 ± 0,03
8.	*S. officinalis* - Biokovo - list, 2016.	**1,21 ± 0,01**
9.	*S. officinalis* - Naturavita - list, 2016.	1,24 ± 0,03

w(%) = $\bar{x}$ ± SD (n = 3)

U vrsti *S. brachyodon* sadržaj fenolnih kiselina se kretao od 0,47% do 3,04%. Najveća količina fenolnih kiselina je utvrđena u uzorku listova iz 2016. godine, a najmanja u uzorku stabljika iz 2015. godine (Slika 14.).

U vrsti *S. officinalis* sadržaj fenolnih kiselina se kretao od 1,21% do 2,22%. Najveća količina fenolnih kiselina nađena je u uzorku listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, a najmanja u uzorcima listova - Biokovo (Slika 14.).

Provedeni Studentov *t*-test dva uzorka jednake varijance pokazao je da se uzorci listova iz 2015. i 2016. godine, vrste *S. brachyodon*, statistički značajno ne razlikuju u količini fenolnih kiselina.

Uzorci cvjetova vrste *S. brachyodon*, iz 2015. i 2016. godine, ne pokazuju statistički bitnu razliku u količini fenolnih kiselina.

U uzorcima listova iz 2015. godine i cvjetova iz iste godine, vrste *S. brachyodon*, utvrđena je statistički značajna razlika u količini fenolnih kiselina, sa signifikantnošću od $p < 0,001$.

Utvrđena je statistički značajna razlika u količini fenolnih kiselina, uz signifikantnost od $p < 0,002$, između uzoraka listova i cvjetova iz 2016. godine, vrste *S. brachyodon*.

Između uzoraka listova - Naturavita i Biokovo, vrste *S. officinalis*, nije dokazana statistički značajna razlika u količini fenolnih kiselina.

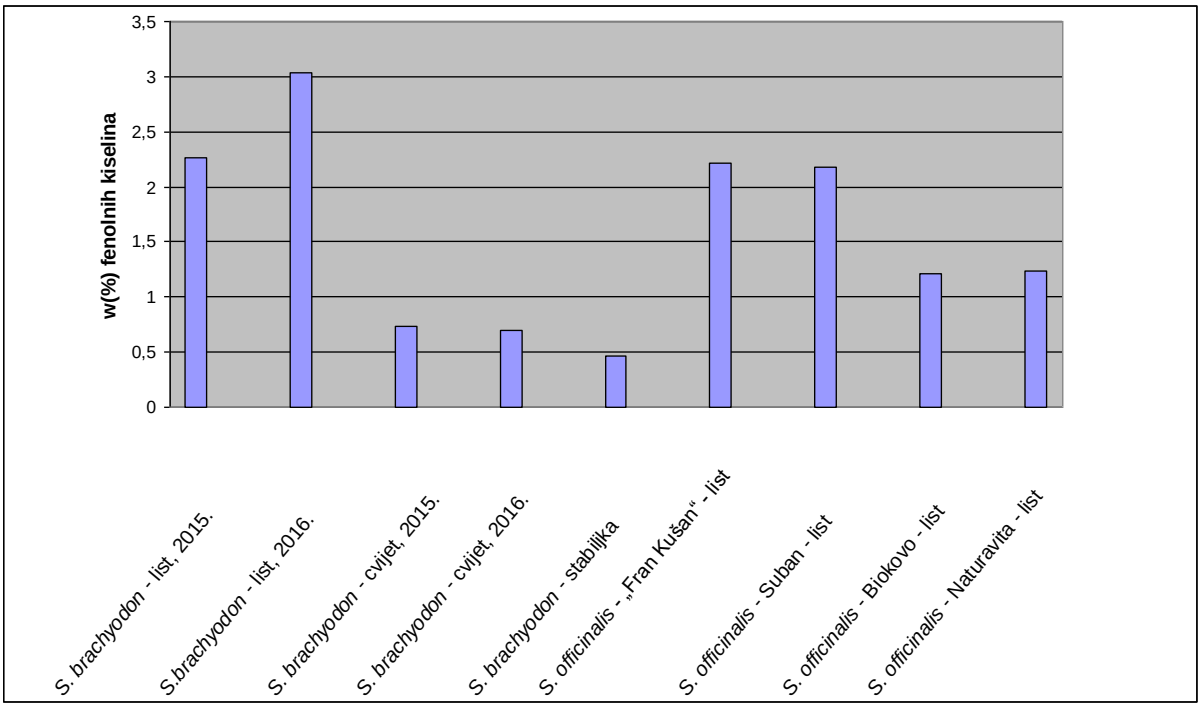
Statistički značajna razlika, sa signifikantnošću od $p < 0,001$, u količini fenolnih kiselina, utvrđena je u uzorcima listova - Naturavita i Suban, vrste *S. officinalis*.

Uzorci Naturavita - list i „Fran Kušan“ - list, vrste *S. officinalis*, statistički se značajno razlikuju u količini fenolnih kiselina, sa signifikantnošću od $p < 0,003$.

Uzorci listova - Biokovo i Suban, vrste *S. officinalis*, statistički se značajno razlikuju u količini fenolnih kiselina, uz signifikantnost od $p < 0,0005$.

U uzorcima vrste *S. officinalis* - Biokovo - list i „Fran Kušan“ - list utvrđena je statistički značajna razlika, sa signifikantnošću od $p < 0,0003$, u količini fenolnih kiselina.

Uzorci listova - Suban i „Fran Kušan“, vrste *S. officinalis*, ne pokazuju statistički bitnu razliku u količini fenolnih kiselina.



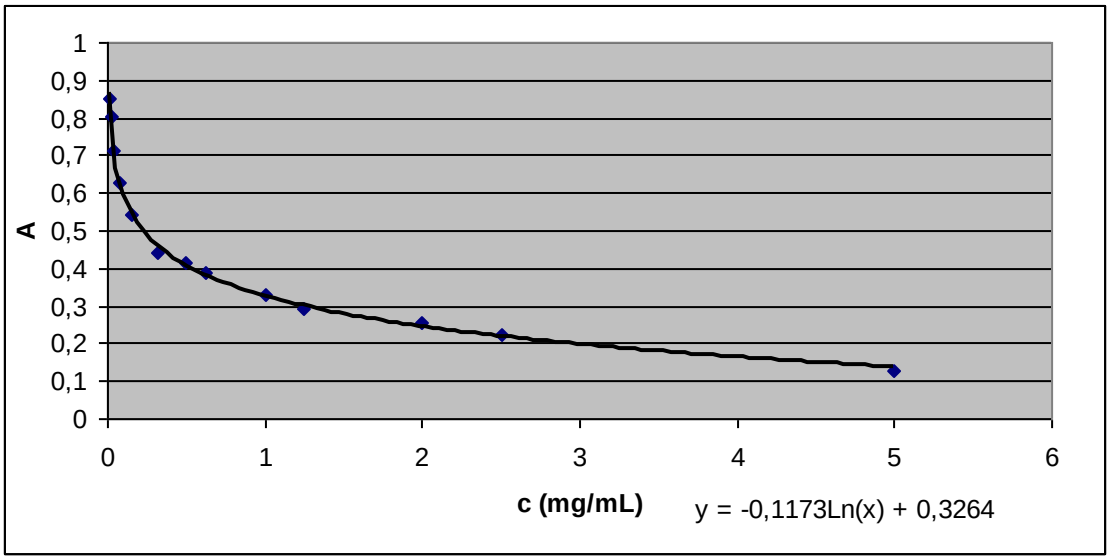
Slika 14. Grafički prikaz rezultata kvantitativne analize fenolnih kiselina

4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA

Za određivanje antioksidacijskog učinka najprije je određena apsorbancija DPPH radikala u prisutnosti galne kiseline koja je primjenjena kao standard (Slika 15.).

Tablica 7. Apsorbancija DPPH radikala u prisutnosti standarda (galne kiseline)

c (mg/mL)	**A**
0,01	0,8490
0,02	0,8010
0,039	0,7123
0,078	0,6294
0,156	0,5450



Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije DPPH radikala o koncentraciji galne kiseline

Kao mjera antioksidacijskog učinka koristi se ekvivalent galne kiseline (GKE).

Promjena apsorbancije slobodnog radikala DPPH, ovisno o koncentraciji antioksidansa može se izraziti jednadžbom: GKE = e ^ [(A – 0,3264) / (-0,12)],

A: apsorbancija DPPH radikala u prisutnosti uzorka.

Antioksidacijski učinak u svim uzorcima je određen dva puta, a iz dobivenih vrijednosti izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije (Tablica 8.).

Tablica 8. Antioksidacijski učinak uzoraka

R.b.	**Uzorak**	**Etanolni ekstrakt mg GKE/g droge $\bar{x}$ ± SD**
1.	*S. brachyodon* - list, 2015.	**36 ± 7**
2.	*S.brachyodon* - list, 2016.	29 ± 5
3.	*S. brachyodon* - cvijet, 2015.	**15 ± 2**
4.	*S. brachyodon* - cvijet, 2016.	16 ± 1
5.	*S. brachyodon* - stabljika, 2015.	**15 ± 3**
6.	*S. officinalis* - „Fran Kušan“ - list, 2016.	28 ± 4
7.	*S. officinalis* - Suban - list, 2016.	**29 ± 4**
8.	*S. officinalis* - Biokovo - list, 2016.	**20 ± 2**
9.	*S. officinalis* - Naturavita - list, 2016.	21 ± 3
R.b.	**Uzorak**	**Acetonski ekstrakt mg GKE/g droge $\bar{x}$ ± SD**
1.	*S. brachyodon* - list, 2015.	26 ± 1
2.	*S.brachyodon* - list, 2016.	**29 ± 2**
3.	*S. brachyodon* - cvijet, 2015.	11 ± 2
4.	*S. brachyodon* - cvijet, 2016.	13 ± 1
5.	*S. brachyodon* - stabljika, 2015.	**10 ± 2**
6.	*S. officinalis* - „Fran Kušan“ - list, 2016.	26 ± 1
7.	*S. officinalis* - Suban - list, 2016.	**29 ± 3**
8.	*S. officinalis* - Biokovo - list, 2016.	**22 ± 1**
9.	*S. officinalis* - Naturavita - list, 2016.	25 ± 3

GKE = ekvivalent galne kiseline

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata vrste *S. brachyodon* kretao se od 15 do 36 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak je utvrđen kod uzorka listova iz 2015. godine, a najmanji u uzorku cvjetova i u uzorku stabljika, također iz 2015. godine.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata vrste *S. officinalis* kretao se od 20 do 29 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak je određen kod uzorka listova - Suban, a najmanji u uzorcima listova - Biokovo.

Antioksidacijski učinak acetonskih ekstrakata vrste *S. brachyodon* kretao se od 10 do 29 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak je nađen u uzorcima listova iz 2016. godine, a najmanji u uzorku stabljika iz 2015. godine.

Antioksidacijski učinak acetonskih ekstrakata vrste *S. officinalis* kretao se od 22 do 29 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak utvrđen je u uzorcima listova - Suban, a najmanji kod uzorka listova - Biokovo.
Provedeni Studentov *t*-test dva uzorka jednake varijance pokazao je da se antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata uzoraka listova, vrste *S. brachyodon*, iz 2015. i 2016. godine, statistički bitno ne razlikuje.

U uzorcima cvjetova iz 2015. i 2016. godine, vrste *S. brachyodon*, nije utvrđena statistički značajna razlika u antioksidacijskom učinku etanolnih ekstrakata.

Uzorak listova iz 2015. godine i uzorak cvjetova iz iste godine, vrste *S. brachyodon*, ne pokazuju statistički bitnu razliku antioksidacijskog učinka etanolnih ekstrakata.

U uzorcima vrste *S. brachyodon* - listova iz 2016. godine i cvjetova iz iste godine, nije utvrđena statistički značajna razlika u antioksidacijskom učinku etanolnih ekstrakata.

Uzorci listova - Naturavita i Biokovo, vrste *S. officinalis*, ne pokazuju statistički značajnu razliku u antioksidacijskom učinku etanolnih ekstrakata.

Među uzorcima listova - Naturavita i Suban, vrste *S. officinalis*, nije utvrđena razlika u antioksidacijskom učinku etanolnih ekstrakata koja bi bila od statističke važnosti.

Uzorci vrste *S. officinalis* - Naturavita - list i „Fran Kušan“ - list ne pokazuju statistički značajnu razliku antioksidacijskog učinka etanolnih esktrakata.

U uzorcima listova - Biokovo i Suban, vrste *S. officinalis*, nije utvrđena razlika u antioksidacijskom učinku etanolnih ekstrakata, koja bi bila od statističke važnosti.

Uzorci Biokovo - list i „Fran Kušan“ - list, vrste *S. officinalis*, ne pokazuju statistički značajnu razliku antioksidacijskog učinka etanolnih ekstrakata.

U uzorcima listova - Suban i „Fran Kušan“, vrste *S. officinalis*, nije utvrđena statistički bitna razlika antioksidacijskog učinka etanolnih ekstrakata.

Provedenim Studentovim *t*-testom dva uzorka jednake varijance pokazano je da se antioksidacijski učinak acetonskih ekstrakta uzoraka listova, vrste *S. brachyodon*, iz 2015. i 2016. godine, statistički bitno ne razlikuje.

Uzorci cvjetova iz 2015. i 2016. godine, vrste *S. brachyodon*, ne pokazuju statistički značajnu razliku u antioksidacijskom učinku acetonskih ekstrakata.

Uzorak listova iz 2015. godine i uzorak cvjetova iz iste godine, vrste *S. brachyodon*, pokazuju statistički značajnu razliku, sa signifikantnošću od $p < 0,013$, u antioksidacijskom učinku acetonskih ekstrakata.

U uzorcima listova iz 2016. godine i cvjetova iz iste godine, vrste *S. brachyodon*, utvrđena je statistički značajna razlika antioksidacijskog učinka acetonskih ekstrakata, uz signifikantnost od $p < 0,001$.

Između uzoraka listova - Naturavita i Biokovo, vrste *S. officinalis*, nije dokazana statistički značajna razlika u antioksidacijskom učinku acetonskih ekstrakata.

U uzorcima listova - Naturavita i Suban, vrste *S. officinalis*, nije utvrđena statistički bitna razlika u antioksidacijskom učinku acetonskih ekstrakata.

Uzorci Naturavita - list i „Fran Kušan“ - list, vrste *S. officinalis*, ne pokazuju statistički važnu razliku antioksidacijskog učinka acetonskih ekstrakata.

Među uzorcima listova - Biokovo i Suban, vrste *S. officinalis*, nije pokazana razlika u antioksidacijskom učinku acetonskih ekstrakata, koja bi bila od statističke važnosti.

Uzorci Biokovo - list i „Fran Kušan“ - list, vrste *S. officinalis*, ne pokazuju statistički značajnu razliku antioksidacijskog učinka acetonskih ekstrakata.

U uzorcima listova - Suban i „Fran Kušan“, vrste *S. officinalis*, nije utvrđena statistički važna razlika u antioksidacijskom učinku acetonskih ekstrakata.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu analizirani su uzorci dviju vrsta roda *Salvia* - *S. brachyodon* i *S. officinalis*. Spektrofotometrijskim postupcima određene su količine flavonoida i fenolnih kiselina, dok je antioksidacijski učinak određen DPPH postupkom, a rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu droge. Količina flavonoida određena je prema Christu i Mülleru, a količina fenolnih kiselina prema postupku iz Europske farmakopeje.
Analizirano je 9 uzoraka - 5 uzoraka vrste *S. brachyodon* i 4 uzorka vrste *S. officinalis*. Uzorci vrste *S. brachyodon* skupljeni su u 2015. i 2016. godini, a uzorci vrste *S. officinalis* u 2016. godini.

Količina flavonoida u vrsti *S. brachyodon* se kretala od 0,08% do 0,21%. Najveća količina flavonoida je određena u uzorku listova iz 2016. godine, a najmanja u uzorku cvjetova iz 2015. godine.
U vrsti *S. officinalis* sadržaj flavonoida se kretao od 0,14% do 0,23%. Najveća količina flavonoida utvrđena je u uzorku listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, a najmanja u uzorcima listova - Naturavita.

U vrsti *S. brachyodon* sadržaj fenolnih kiselina se kretao od 0,47% do 3,04%. Najveća količina fenolnih kiselina nađena je u uzorku listova iz 2016. godine, dok je najmanja utvrđena kod uzorka stabljika iz 2015. godine.
U vrsti *S. officinalis* količina fenolnih kiselina se kretala od 1,21% do 2,22%. Najveća količina fenolnih kiselina određena je u uzorcima listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, a najmanja u uzorku listova - Biokovo.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata vrste *S. brachyodon* kretao se od 15 do 36 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak je određen u uzorcima listova iz 2015. godine, a najmanji kod uzorka cvjetova i u uzorku stabljika iz 2015. godine.
U vrsti *S. officinalis,* antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata kretao se od 20 do 29 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak utvrđen je kod uzorka listova - Suban, a najmanji u uzorcima listova - Biokovo.
Antioksidacijski učinak acetonskih ekstrakata vrste *S. brachyodon* kretao se od 10 do 29 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak je određen kod uzorka listova iz 2016. godine, a najmanji u uzorku stabljika iz 2015. godine.

U vrsti *S. officinalis*, antioksidacijski učinak acetonskih ekstrakata kretao se od 22 do 29 mg GKE/g droge. Najveći antioksidacijski učinak je nađen kod uzorka listova - Suban, a najmanji u uzorcima listova - Biokovo.

6. LITERATURA

1. Arroyo-Currás N, Rosas-Garcia VM, Videa M. Substituent Inductive effect on the Electrochemical Oxidation of Flavonoids Studied by Square Wave Voltammetry and Ab Initio calculations. *Molecules*, 2016, 21, 1442.
2. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines, Second edition. London, Pharmaceutical Press, 2002, str. 408-410.
3. Cherrak SA, Mokhtari-Soulimane N, Berroukeche F, Bensenane B, Cherbonnel A, Merzouk H, Elhabiri M. *In Vitro* Antioxidant *versus M*etal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLOS ONE*, 2016, 11, 0165575.
4. Christ B, Müller KH. Zur serienmäβigen des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.
5. Domac R. Flora Hrvatske - Priručnik za određivanje bilja, II izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 2002, str. 286, 296.
6. European Pharmacopoeia, Fifth Edition, Volume 2. Strasbourg, Council of Europe, 2004, str. 898.
7. Garcia EJ, Cadorin Oldoni TL, de Alencar SM, Reis A, Loguerci AD, Grande RHM. Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth. *Braz Dent J*, 2012, 23, 22-27.
8. Ghasemzadeh A, Ashkani S, Baghadi A, Pazoki A, Jaafar HZE, Rahmat A. Improvement in Flavonoids and Phenolic Acids Production and Pharmaceutical Quality of Sweet Basil (Ocimum basilicum L.) by Ultraviolet-B Irradiation. *Molecules*, 2016, 21, 1203.
9. Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, drugo izdanje. Zagreb, August Cesarec, 1990, str. 263.
10. Herrmann KM. The shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell*, 1995, 7, 907-919.
11. Kedare SB, Singh RP. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48, 412-422.
12. Kuštrak D. Farmakognozija - Fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing - Tehnička knjiga, 2005, str. 270-290.
13. Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, Kong M, Li L, Zhang Q, Liu Y, Chen H, Qin W, Wu H, Chen S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Menagement of Type 2 Diabetes. *Molecules*, 2016, 21, 1374.

14. Maksimović M, Vidic D, Miloš M, Šolić ME, Abadžić S, Siljak - Yakovlev S. Effect of the Environmental Conditions on Essential oil profile in two dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochem Syst Ecol*, 2007, 35, 473-478.
15. Maleš Ž, Šarić D, Bojić M. Quantitative Determination of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves of *Arbutus unedo* L. Using Thin Layer Chromatography. *J Anal Methods Chem*, 2013, 2013, 385473.
16. Marković S. Fitoaromaterapija. Zagreb, CENTAR CEDRUS, 2010, str. 244-245, 351-352, 364, 370-371.
17. Perez-Cano FJ, Castell M. Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients*, 2016, 8, 659.
18. Schaffner W, Häfelfinger B, Ernst B. Ljekovito bilje - Kompendij. Rijeko, Leo commerce, 1999, str. 246-247.
19. Shahidi F, Yeo J. Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 2016, 21, 1216.
20. Vrste roda Salvia, http://www.hirc.botanic.hr, pristupljeno 10. 11. 2016.
21. Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, Li HB. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 2016, 8, 515.

7. SAŽETAK

Vrste *S. brachyodon* i *S. officinalis* predmet su istraživanja moderne medicine i vrlo cijenjene u pučkoj medicini. Dok su u prošlosti cijenjene zbog svoje aromatičnosti i visokog sadržaja kvalitetnog eteričnog ulja, danas se proučavaju zbog sadržaja flavonoida i fenolnih kiselina koji su vrlo moćni antioksidansi.

U ovom radu spektrofotometrijskom metodom, prema Christu i Mülleru, određena je količina flavonoida, količina fenolnih kiselina prema postupku iz Europske farmakopeje i antioksidacijski učinci DPPH metodom.

Za statističku analizu podataka korišten je Studentov *t*-test.

Najveća količina flavonoida u vrsti *S. brachyodon* nađena je u uzorcima listova iz 2016. godine, a najmanja u uzorku cvjetova iz 2015. godine. U vrsti *S. officinalis* najveći sadržaj flavonoida određen je u uzorcima listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, a najmanji u uzorcima listova - Naturavita.

Najveći sadržaj fenolnih kiselina u vrsti *S. brachyodon* utvrđen je u uzorcima listova iz 2016. godine, a najmanji kod uzorka stabljika iz 2015. godine. Kod vrste *S. officinalis,* u uzorcima listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ nađena je najveća količina fenolnih kiselina, dok je najmanja utvrđena u uzorku listova - Biokovo.

Najveći antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata, vrste *S. brachyodon*, određen je u uzorku listova iz 2015. godine, a najmanji kod uzorka cvjetova i stabljika iz 2015. godine. U vrsti *S. officinalis* najveći antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata utvrđen je kod uzorka listova - Suban, a najmanji u uzorcima listova - Biokovo.

U vrsti *S. brachyodon* najveći antioksidacijski učinak acetonskih ekstrakata određen je u uzorcima listova iz 2016. godine, a najmanji kod uzorka stabljika iz 2015. godine. Najveći antioksidacijski učinak među acetonskim ekstraktima uzoraka vrste *S. officinalis*, nađen je kod uzorka listova - Suban, a najmanji u uzorcima listova - Biokovo.

7. SUMMARY

Species *S. brachyodon* and *S. officinalis* are object of scientific research by modern medicine and are highly appreciated by tradional medicine. While in past they were appreciated because of its aroma and quality of their essential oil, today they are studied for their content of flavonoids and phenolic acids which are very potent antioxidants.
In this study the amount of flavonoids was determined by spectrophotometric method according to Christ and Müller, as well as phenolic acids by procedure in European Pharmacopoeia. The study also included DPPH assay. The results of DPPH test were expressed as miligrams of equivalent of gallic acid per gram of plant material.
For statistical analysis of data Student *t*-test was used.

The highest amount of flavonoids, in species *S. brachyodon*, was determined in sample of leaves from 2016, while the lowest amount was determined in sample of flowers from 2015. In species *S. officinalis* the highest quantity of flavonoids was determined in sample of leaves collected in Pharmaceutical Botanical Garden „Fran Kušan“, while the lowest quantity was determined in sample of leaves - Naturavita.
The highest amount of phenolic acids, in species *S. brachyodon*, was determined in sample of leaves from 2016, while the lowest amount was determined in sample of stalks from 2015. In species *S. officinalis* the highest content of phenolic acids was determined in sample of leaves collected in Pharmaceutical Botanical Garden „Fran Kušan“, while the lowest content of phenolic acids was determined in sample of leaves - Biokovo.
The highest antioxidative effect of ethanolic extracts, in species *S. brachyodon*, was determined in sample of leaves from 2015, while the lowest effect was determined in samples of stalks and flowers from 2015. In species *S. officinalis* the highest antioxidative effect of ethanolic extracts was determined in sample of leaves - Suban, while the lowest effect was determined in sample of leaves - Biokovo.
In species *S. brachyodon*, the highest antioxidative effect of acetonic extracts was determined in sample of leaves from 2016, while the lowest effect was determined in sample of stalks from 2015. Among acetonic extracts of species *S. officinalis* the highest antioxidative effect was determined in sample of leaves - Suban, while the lowest effect was determined in sample of leaves - Biokovo.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ODREĐIVANJE KOLIČINE FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA TE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA U VRSTAMA *SALVIA BRACHYODON* VAND. I *SALVIA OFFICINALIS* L.

Ante Pažur

SAŽETAK

Vrste *S. brachyodon* i *S. officinalis* predmet su istraživanja moderne medicine i vrlo cijenjene u pučkoj medicini. Dok su u prošlosti cijenjene zbog svoje aromatičnosti i visokog sadržaja kvalitetnog eteričnog ulja, danas se proučavaju zbog sadržaja flavonoida i fenolnih kiselina koji su vrlo moćni antioksidansi.
U ovom radu spektrofotometrijskom metodom, prema Christu i Mülleru, određena je količina flavonoida, količina fenolnih kiselina prema postupku iz Europske farmakopeje i antioksidacijski učinci DPPH metodom. Za statističku analizu podataka korišten je Studentov *t*-test.

Najveća količina flavonoida u vrsti *S. brachyodon* nađena je u uzorcima listova iz 2016. godine, a najmanja u uzorku cvjetova iz 2015. godine. U vrsti *S. officinalis* najveći sadržaj flavonoida određen je u uzorcima listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, a najmanji u uzorcima listova - Naturavita.
Najveći sadržaj fenolnih kiselina u vrsti *S. brachyodon* utvrđen je u uzorcima listova iz 2016. godine, a najmanji kod uzorka stabljika iz 2015. godine. Kod vrste *S. officinalis*, u uzorcima listova skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ nađena je najveća količina fenolnih kiselina, dok je najmanja utvrđena u uzorku listova - Biokovo.
Najveći antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata, vrste *S. brachyodon*, određen je u uzorku listova iz 2015. godine, a najmanji kod uzorka cvjetova i stabljika iz 2015. godine. U vrsti *S. officinalis* najveći antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata utvrđen je kod uzorka listova - Suban, a najmanji u uzorcima listova - Biokovo.
U vrsti *S. brachyodon* najveći antioksidacijski učinak acetonskih ekstrakata određen je u uzorcima listova iz 2016. godine, a najmanji kod uzorka stabljika iz 2015. godine. Najveći antioksidacijski učinak među acetonskim ekstraktima uzoraka vrste *S. officinalis*, nađen je kod uzorka listova - Suban, a najmanji u uzorcima listova - Biokovo.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 15 grafičkih prikaza, 8 tablica i 21 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *S. brachyodon*, *S. officinalis*, flavonoidi, fenolne kiseline, antioksidacijski učinak, spektrofotometrija, DPPH.

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željan Maleš**, *redoviti profesor*, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Mirza Bojić, *docent*, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica*, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Siječanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

QUANTITATIVE ANALYSIS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS AND DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE EFFECT IN SPECIES *SALVIA BRACHYODON* VAND. AND *SALVIA OFFICINALIS* L.

Ante Pažur

SUMMARY

Species *S. brachyodon* and *S. officinalis* are object of scientific research by modern medicine and are highly appreciated by tradional medicine. While in past they were appreciated because of its aroma and quality of their essential oil, today they are studied for their content of flavonoids and phenolic acids which are very potent antioxidants.
In this study the amount of flavonoids was determined by spectrophotometric method according to Christ and Müller, as well as phenolic acids by procedure in European Pharmacopoeia. The study also included DPPH assay. The result of DPPH test were expressed as miligrams of equivalent of gallic acid per gram of plant material.
For statistical analysis of data Student *t*-test was used.

The highest amount of flavonoids, in species *S. brachyodon*, was determined in sample of leaves from 2016, while the lowest amount was determined in sample of flowers from year 2015. In species *S. officinalis* the highest quantity of flavonoids was determined in sample of leaves collected in Pharmaceutical Botanical Garden „Fran Kušan“, while the lowest quantity was determined in sample of leaves - Naturavita.
The highest amount of phenolic acids, in species *S. brachyodon*, was determined in sample of leaves from 2016, while the lowest amount was determined in sample of stalks from 2015. In species *S. officinalis* the highest content of phenolic acids was determined in samples of leaves collected in Pharmaceutical Botanical Garden „Fran Kušan“, while the lowest content of phenolic acids was determined in sample of leaves - Biokovo.
The highest antioxidative effect of ethanolic extracts, in species *S. brachyodon*, was determined in sample of leaves from 2015, while the lowest effect was determined in samples of stalks and flowers from 2015. In species *S. officinalis* the highest antioxidative effect of ethanolic extracts was determined in sample of leaves - Suban, while the lowest effect was determined in sample of leaves - Biokovo.
In species *S. brachyodon*, the highest antioxidative effect of acetonic extracts was determined in samples of leaves from 2016, while the lowest effect was determined in sample of stalks from 2015. Among acetonic extracts of species *S. officinalis* the highest antioxidative effect was determined in sample of leaves - Suban, while the lowest effect was determined in sample of leaves - Biokovo.

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

Thesis includes: 48 pages, 15 figures, 8 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *S. brachyodon, S. officinalis*, flavonoids, phenolic acids, antioxidative effect, spectrophotometry, DPPH.

Mentor: **Željan Maleš, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biocemistry.

Reviewers: **Željan Maleš, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biocemistry.
Mirza Bojić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biocemistry.
Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biocemistry.

The thesis was accepted: January 2017.