Kvantitativna analiza flavonoida u listovima matičnjaka - Melissa officinalis L.

Žunić, Katarina

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:163:589779

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Katarina Žunić

Kvantitativna analiza flavonoida u listovima matičnjaka - *Melissa 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 savjetima, stručnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.
Također zahvaljujem doc. dr. sc. Mirzi Bojiću i tehničkoj suradnici Ljiljani Jurkin sa Zavoda za farmaceutsku kemiju na pruženoj pomoći i strpljenju prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.
Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci pruženoj tijekom cijelog studija.
Na kraju, htjela bih zahvaliti svim prijateljima, a posebno Aniti i Tei, na neizmjernoj potpori i pomoći tijekom raznih studentskih nevolja.

SADRŽAJ

1. UVOD…..……..……1

1.1. BOTANIČKI PODACI…….……..2

1.1.1. Morfološka obilježja i rasprostranjenost porodice Lamiaceae……....2

1.1.2. Morfološka obilježja i rasprostranjenost roda *Melissa* L. 2

1.1.3. Morfološka obilježja i rasprostranjenost vrste *Melissa officinalis* L. ...…….…….3

1.2. KEMIJSKI SASTAV……...……...…….4

1.2.1. Eterično ulje.…….……..…4

1.2.2. Fenilkarboksilne kiseline……..……..……5

1.2.3. Triterpeni……...……...……6

1.2.4. Flavonoidi.....…...……...…6

1.2.5. Ostale sastavnice……..……...……...6

1.3. DJELOVANJE I UPOTREBA…….....…….....6

1.3.1. Istraživanja na ljudima……...7

1.3.2. Istraživanja na životinjama….……...…8

1.3.3. In vitro istraživanja……..10

1.4. FLAVONOIDI…...…….……..11

1.4.1. Kemijski sastav flavonoida……...…..11

1.4.2. Biosinteza flavonoida…….……..11

1.4.3. Derivati flavonoida……..……....12

1.4.4. Uloga flavonoida u biljkama…….…..14

1.4.5. Uloga flavonoida u ljudskom organizmu...……...…15

1.4.6. Toksičnost flavonoida……...……..…….……17

1.4.7. Analiza flavonoida……..…….……18

2. OBRAZLOŽENJE TEME……..……19

3. MATERIJALI I METODE…..……...……...…….20

3.1. BILJNI MATERIJAL..……...20

3.2. APARATURA I KEMIKALIJE....……...…….20

3.3. METODE ISTRAŽIVANJA……...……...……..…21

3.3.1. Identifikacija biljnog materijala……...…..……21

3.3.2. Određivanje količine flavonoida…….……..…….....21

3.3.3. Računalni programi…..……...……...……...23

4. REZULTATI I RASPRAVA…….…….....23

4.1. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FLAVONOIDA…..……..…23
4.2. RASPRAVA...……...…….……...24
5. ZAKLJUČCI..…...……..……25
6. LITERATURA……...……...…..26
7. SAŽETAK/ SUMMARY……...……30
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Biljke i njihovi pripravci koriste se u ljudskoj medicini otkad se javila potreba za liječenjem. Tradicija takvog liječenja dovela je do spoznaja o ljekovitim biljkama, a posljedično i do izoliranja aktivnih sastavnica iz istih. Kemijskom promjenom osnovne strukture aktivnih tvari iz biljaka razvijena je većina današnjih lijekova. Unatoč toj činjenici, društvo 21. stoljeća izrazito je nepovjerljivo prema takozvanim „kemijskim lijekovima“. Razlozi tome mogu se pronaći u sve većim zahtjevima za lijekove - traži se da budu pristupačnih cijena, učinkoviti u kratkom vremenu uzimanja, da su nuspojave svedene na minimum, a idealno traži se lijek koji bi liječio sve moguće tegobe. S druge strane biljke, bilo da su svrstane u biljne lijekove ili dodatke prehrani, ostavljaju dojam potpune neškodljivosti i izrazite učinkovitosti, a standardizacija pripravaka od strane proizvođača često se vješto izbjegava. Moderna fitoterapija pokušava riješiti ove zablude te maksimalno iskoristiti znanstveno prepoznate učinke pojedinih biljnih vrsta kako bi pacijenti koji žele koristiti fitopreparate s njima ostvarili siguran i djelotvoran proces liječenja.

U Hrvatskoj ljudi se često odlučuju liječiti biljkama, stoga je odgovornost budućih farmaceuta znati koje biljne pripravke treba preporučiti. Osim toga, očekuju se i precizna znanja koja uključuju podatke o tome u kojim indikacijama, u kojoj dozi i koje djelatne tvari takvi pripravci trebaju sadržavati i koji se terapijski ishodi mogu njima postići. Jedna od češće korištenih biljaka naše pučke medicine je i matičnjak - *Melissa officinalis* L. koja je u našu tradiciju došla utjecajem srednjovjekovnih njemačkih samostana.

1.1. BOTANIČKI PODACI

1.1.1. Morfološka obilježja i rasprostranjenost porodice Lamiaceae

Biljke iz porodice Lamiaceae (Labiatae - usnače) mogu biti zeljaste ili drvenaste jednogodišnje biljke ili trajnice, a najčešće su grmovi. Imaju izrazito aromatični miris koji potječe od eteričnog ulja smještenog u žljezdanim dlakama ili rozetastim žlijezdama listova, cvjetova ili stabljike. Stabljika je četverobridna, a listovi su smješteni križasto nasuprotno, bez palistića. Cvjetovi su dvospolni i jednosimetrični, rijetko poligamni. Čaška je cjevasta s 4 do 5 zubaca. Vjenčić je srastao u cijev koja se proširuje u dvije nejednake usne po kojima je sama porodica i dobila naziv. Gornja usna je kratka i sastoji se od dvaju sraslih listića, a donja je dulja i građena je od triju sraslih listića. Prašnici su dvomoćni, od njih četiri obično su dva dulja, a druga dva kraća. Plodnica je nadrasla i četverogradna te u svakom pretincu sadrži jedan sjemeni zametak. Plod je dvoplodnički kalavac koji se najčešće raspada na 4 suha, rijetko mesnata plodića (Domac, 2002).

Porodica Lamiaceae obuhvaća oko 7200 vrsta i preko 240 rodova koji su rasprostranjeni po čitavom svijetu (kozmopoliti), a biljke ove porodice najviše su prisutne u zemljama mediteranskog područja. Njihovoj širokoj rasprostranjenosti pridonosi to što se koriste kao začini, ukrasne biljke, sirovine za izradu čajeva, parfema, ishodnih spojeva u kemijskoj industriji, a i zbog svojih ljekovitih svojstava (Shakeri i sur., 2016; Bräuchler, 2010).

1.1.2. Morfološka obilježja i rasprostranjenost roda *Melissa* L.

Vrste roda *Melissa* L. trajnice su koje mirisom podsjećaju na limun. Listovi su im jajoliki, a donji su gotovo srcolikog oblika. Cvatovi su jednostrani i u svakome se nalazi od šest do deset bijelih ili ružičastih cvjetova. Pojedine vrste mogu narasti do 150 centimetara visine (Usai i sur., 2016; Domac, 2002).

Točno podrijetlo roda *Melissa* nije utvrđeno, ali zasigurno se radi o mediteranskom području. Najčešće spominjana mjesta podrijetla su Bliski istok, istočni dio Mediterana ili južna Europa. Grčko ime Melissa može se prevesti kao pčela. Takvo ime dano je ovom biljnom rodu zbog sposobnosti privlačenja pčela. Hrvatski naziv matičnjak označava kako su

mirisom posebno privučene matice te stoga pčelari njime mogu vratiti odbjegli roj pčela. Biljke roda *Melissa* mogu se pronaći posvuda u svijetu jer se često kultiviraju, ali i zato što samoniklo rastu uz plotove, grmlja i živice. Azijske vrste kao što su *Melissa axillaris* Benth. i *Mellisa flava* Benth ex. Wall gotovo da se ni ne spominju u literaturi. Sva istraživanja i spoznaje usmjerene su na vrstu *Melissa officinalis* L., koja se dijeli na 9 podvrsta i varijeteta. Sve se nabrojene vrste uzimaju kao sinonimi za svojtu *M. officinalis*:

- *Melissa officinalis* subsp. *altissima* (Sm.) Arcang.,
- *Melissa officinalis* var. *altissima* (Sm.) K. Koch,
- *Melissa officinalis* var. *cordifolia* (Pers.) K. Koch,
- *Melissa officinalis* var. *foliosa* Briq.,
- *Melissa officinalis* var. *graveolens* (Host) Nyman,
- *Melissa officinalis* var. *hirsuta* K. Koch,
- *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*,
- *Melissa officinalis* var. *romana* (Mill.) Woodv., (ponegdje u literaturi navedena kao posebna vrsta *Melissa romana* Mill.)
- *Melissa officinalis* var. *villosa* Benth.

Spominje se i specifična podvrsta: *Melissa officinalis* subsp. *inodora* Bornm. (Usai i sur., 2016; Shakeri i sur., 2016; Grlić, 1990).

1.1.3. Morfološka obilježja i rasprostranjenost vrste *Melissa officinalis* L.

Matičnjak (*M. officinalis*) je u prosjeku 50 cm visoka višegodišnja biljka. Ima uspravnu, razgranjenu, četverobridastu stabljiku. Plodovi su izduženo jajastog oblika. Listovi, koji su oficinalna droga, mogu biti na kraćoj ili duljoj peteljci, a jajolikog su ili obrnuto srcolikog oblika s krupno nazubljenim pilastim rubom. Gornja strana lista tamnije je zelena i slabo dlakava, dok je donja strana lista svjetlije zelena s dlakama na jasno istaknutim provodnim žilama (Kuštrak, 2005; Kovačević, 2004).

Matičnjak je mediteranskog podrijetla, a danas je rasprostranjen u svim dijelovima svijeta kao uzgojena ukrasna i medonosna, ali i samonikla biljka. Zbog izrazito razgranatog korijena prilagodljiv je različitim okolišnim uvjetima. Raste dobro na suncu, ali i u

djelomičnom hladu, najbolje na vapnenačkom tlu koje ima pH od 5 do 7 (Slika 1.) (Usai i sur., 2016; Shakeri i sur., 2016; Kuštrak, 2005).



Slika 1. *Melissa officinalis* L. (Farmaceutski botanički vrt „Fran Kušan“)

1.2. KEMIJSKI SASTAV

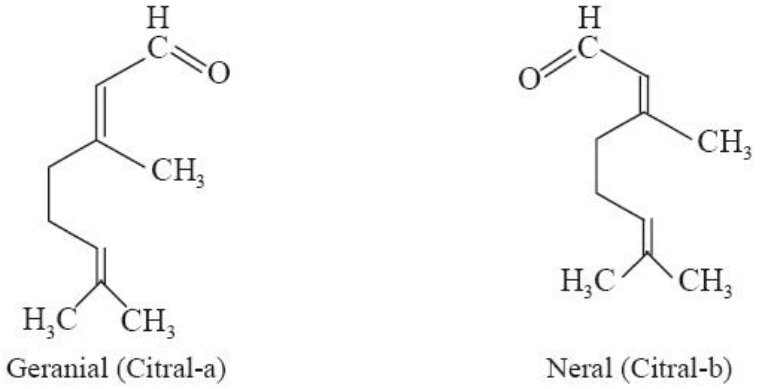
Poznavanjem kemijskog sastava bolje se upoznaje s djelatnim tvarima biljke, ali i ostalim sastavnicama koje omogućuju razlikovanje pojedinih vrsta od ostalih pripadnika istog roda i vrlo slične morfologije. Matičnjak sadrži čitav niz različitih kemijskih sastavnica kao što su eterično ulje, fenilkarboksilne kiseline, triterpeni, flavonoidi i mnoge druge (Kuštrak, 2005).

1.2.1. Eterično ulje

Listovi matičnjaka sadrže 0,02-0,3% eteričnog ulja te se zbog malog sadržaja u listovima često patvore vrstama roda *Cymbopogon* Spreng. ili limunovim uljem. Takvo krivotvorenje biljnih vrsta manje je opasno kad su posrijedi kozmetički proizvodi sve dok se

pazi na mikrobiološku ispravnost. Međutim, krivotvorena droga može ozbiljno narušiti zdravlje čovjeka i dovesti do nepovjerenja zdravstvenih djelatnika pri propisivanju i izdavanju liječenja biljnim pripravcima. Eterično ulje dobiva se destilacijom svježih vršnih dijelova. Glavne sastavnice su geranial i neral (poznate i pod nazivima citral a i b) te citronelal (+). Odnos geraniala prema neralu u pravilu je stalan, 4:3. Od seskiviterpena prevladava kariofilen (Kuštrak, 2005).

Prema jednom istraživanju, glavne sastavnice eteričnog ulja listova su: β-kariofilen oksid, geranial, neral, β-kariofilen i geranil-acetat, dok eterično ulje cvjetova sadrži najviše geraniala, zatim nerala, (Slika 2.) β-kariofilena i β-kariofilen oksida (Afsharypuor i sur., 2015).



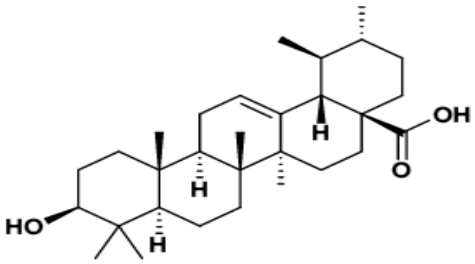
Slika 2. Strukture geraniala i nerala (www.epharmacognosy.com)

1.2.2. Fenilkarboksilne kiseline

U sastavu listova najzastupljenije fenilkarboksilne kiseline su slobodno i glikozidno vezana klorogenska i kavena kiselina, *p*-kumarna te ružmarinska kiselina. Neka opažanja ukazuju na to da u biljci fenilkarboksilne kiseline signaliziraju završetak rasta. Poznato je da *p*-kumarna kiselina snažno inhibira rast stabljike i njenih dijelova. Isto tako, pokazano je da dolazi do nakupljanja fenilkarboksilnih kiselina i flavonoida u proljeće nakon što se otvore pupoljci i u jesen prije početka procesa dormancije (Kefeli i Kalevtich, 2013; Kuštrak, 2005).

1.2.3. Triterpeni

Triterpeni su ugljikovi spojevi koji se sastoje od šest izoprenskih jedinica. Iz matičnjaka su izolirane ursolna (Slika 3.) i oleanolna kiselina. Terpeni u biljkama mogu biti lako hlapljivi i svojim mirisom privući razne kukce za oprašivanje. Gorak okus nekih terpena može štititi od biljojeda, a razmatra se i njihova uloga kao fitohormona (Shakeri i sur., 2016).



Slika 3. Struktura ursolne kiseline (wildflowerfinder.org.uk)

1.2.4. Flavonoidi

Od flavonoidnih spojeva u matičnjaku se u najvećem udjelu nalaze aglikon kvercetin te derivati apigenina i luteolina (Shakeri i sur., 2016).

1.2.5. Ostale sastavnice

Stabljika se sastoji uglavnom od različitih oblika celuloze s visokim udjelom α-celuloze i manjeg postotka lignina odgovornih za mehaničku čvrstoću biljke. (Shakeri i sur., 2016).

1.3. DJELOVANJE I UPOTREBA

Matičnjak je izrazito istraživana biljka zbog mnogih potencijalno poželjnih učinaka. Poznavali su ga već Grci i Rimljani, Plinije ga je preporučivao u liječenju hipohondričnih i histeričnih pacijenata. Arapi ga prenose u Europu, a zatim se uzgaja u njemačkim samostanima u 16. stoljeću (Kuštrak, 2005). Najpoznatiji proizvedeni ljekoviti oblik

srednjovjekovnih samostanskih ljekarni alkoholni je destilat listova matičnjaka i drugih droga s eteričnim uljem - „Karmelitergeist“ (Spiritus Melissae compositus), a danas je još uvijek prisutan na tržištu kao Klosterfrau-Melissengeist (Kuštrak, 2005; Wagner, 1982).

Matičnjak se upotrebljava i za dobivanje eteričnog ulja koje služi kao mirisna nota u parfemima te u industriji alkoholnih pića za izradu likera i koktela. Može služiti i kao kuhinjski začin umjesto limunove kore, ali duljim stajanjem listovi gube miris, stoga treba koristiti svježe skupljene listove (Grlić, 1990).

Istraživanja novih antimikrobnih tvari danas se izrazito potiču zbog rastuće antimikrobne rezistencije, ali kad se otkriju ostaju sačuvane kao rezervni lijekovi za teške infekcije dok izrazito rezistentni mikroorganizmi često ostaju prisutni na bolničkim instrumentima. Matičnjakovo eterično ulje ima antimikrobni učinak naspram čestih uzročnika bolničkih infekcija i stoga postoji mogućnost njegovog korištenja za dezinfekciju bolničke opreme i prostora (Jalal i sur., 2015).

1.3.1. Istraživanja na ljudima

PMS

Rezultati jednog kliničkog pokusa u Iranu pokazuju da 500 mg matičnjaka danog dvaput dnevno u kapsulama tijekom lutealne faze menstrualnog ciklusa ublažava predmenstrualne simptome te poboljšava fizičku i psihološku kvalitetu života u odnosu na placebo kod studentica (Mirghafourvand i sur., 2016).

Jedno drugo istraživanje, također provedeno u Iranu, pokazalo je da je 1200 mg dnevno tijekom lutealne faze menstrualnog ciklusa dovoljno za značajno ublažavanje predmenstrualnih simptoma. Istraživanje je trajalo tri mjeseca i svaki mjesec značajno se smanjivala težina predmenstrualnih simptoma (Akbarzadeh i sur., 2015).

Hiperaktivnost kod djece

640 mg ekstrakta korijena odoljena (valerijane) i 320 mg ekstrakta matičnjaka smanjile su hiperaktivnost, impulzivnost i teškoće pri koncentriranju kod djece predškolske dobi, koja unatoč pokazanim poteškoćama nisu zadovoljila kriterije za dijagnozu ADHD-a, u jednom istraživanju njemačkih znanstvenika. Neželjeni učinci razvili su se kod dvoje

ispitanika, ali analizom je pokazano da je vrlo malo vjerojatno da je do tih učinaka došlo zbog uzimanja prethodno navedenog preparata (Gromball i sur., 2014).

Hiperlipidemija

Pacijentima koji boluju od hiperlipidemije, 1000 mg praška dobivenog od listova matičnjaka značajno je smanjilo vrijednosti LDL-a i AST. Prašak matičnjaka nije pokazao značajan utjecaj na ostale lipidne parametre (Jandaghi i sur., 2016).

Palpitacije

Srčane palpitacije često su benigno stanje koje je povezano sa stresom u većine ljudi te ih je stoga teško liječiti. 500 mg liofiliziranog vodenog ekstrakta matičnjaka dvaput na dan tijekom 14 dana primjene značajno je smanjilo učestalost srčanih palpitacija i anksioznost kod ispitanika (Alijaniha i sur., 2015).

Antimikrobni učinak

Gel s matičnjakom nije se pokazao jednako učinkovitim u usporedbi s 5%-tnom kremom koja je sadržavala aciklovir u liječenju herpesa labialisa. Ipak, učinkovitost je dokazana u lokalnom smanjenju jačine boli prouzrokovane herpesom (Ahadian i sur., 2015).

1.3.2. Istraživanja na životinjama

Depresija

Vodeni ekstrakt matičnjaka pokazao je serotonergički antidepresivni učinak u štakora kao i sama ružmarinska kiselina. Opravdano bi bilo korištenje matičnjaka kao dodatne terapije depresije uz standardne lijekove ili za sprječavanje nastajanja klinički značajnog oblika bolesti, uz dokaze koje trebaju pokazati istraživanja na ljudima (Lin i sur., 2015).

Ulkus

Metanolni ekstrakt matičnjaka u dozama od 150 i 300 mg/kg pokazao je gastroprotektivni učinak u štakora. Pretpostavka je da je opaženi učinak posljedica inhibicije lipidne peroksidacije ili pojačavanja antioksidativnih obrambenih mehanizama (Saberi i sur., 2016).

Dijabetes

Učinkovitost matičnjaka dokazana je i u štakora kao modela dijabetesa. Uzimanje 0,04 mg na dan eteričnog ulja matičnjaka uklonilo je hiperalgeziju nastalu kao komplikaciju dijabetesa. Eterično ulje matičnjaka stoga predstavlja potencijalni tretman za dijabetičku neuropatiju. Također, dugotrajnom primjenom ekstrakta uspostavljena je euglikemija i smanjena je tjelesna masa (Hasanein i Riahi, 2015).

U jednom drugom istraživanju, pretpostavlja se da je antioksidativni učinak flavonoida iz vodenoalkoholnog ekstrakta matičnjaka utjecao na smanjenje razine glukoze, kolesterola, LDL-a, triglicerida te povećanje razine HDL-a u dijabetičkih štakora (Khodsooz i sur., 2016).

Pretilost

Autori istraživanja testirali su pretpostavku da ekstrakt matičnjaka, koji se već pokazao inhibitorom angiogeneze reduciranjem ekspresije mRNA faktora VEGF-A i FGF-2, djeluje i na inhibiciju adipogeneze te hipertrofiju adipocita. Hipoteza je potvrđena, ukazano je na povezanost angiogeneze i adipogeneze. Mogući mehanizam djelovanja na supresiju adipogeneze je i inhibicija ekspresije mRNA matriksnih metaloproteinaza (Woo i sur., 2016).

Aritmije

Istraživanje učinka vodenog ekstrakta matičnjaka na EKG štakora tijekom tjedan dana pokazalo je značajne promjene, ali potrebna su dodatna istarživanja da se pokažu klinički učinci takvih promjena (Joukar i sur., 2016).

U jednom istraživanju na štakorima dokazan je kardioprotektivni učinak manjih doza vodenog ekstrakta (50 i 100 mg/kg) prije infarkta miokarda, dok su veće doze (200 mg/kg) pojačale ishemiju (Joukar i sur., 2015).

Vodenoalkoholni ekstrakt u dozama od 100 i 200 mg/kg smanjio je učestalost ventrikularne fibrilacije, tahikardije i preuranjenih otkucaja u štakora kojima je inducirana aritmija, te se stoga smatra da ima kardioprotektivni učinak (Akhondali i sur., 2015).

1.3.3. In vitro istraživanja

Paraziti

Etanolni ekstrakt u količinama manjim od 500 mg/L pokazao je inhibiciju rasta različitih faza razvoja roda *Leishmania* kao i faze epimastigota kod vrste *Trypanosoma cruzi*. HPLC analizom, kao glavne sastavnice ekstrakta dokazane su kavena kiselina i rutin (Cunha i sur., 2016).

Virus gripe H9N2

Učinak eteričnog ulja matičnjaka kod virusa gripe H9N2 najjači je prije same infekcije stanica virusom jer onemogućava prianjanje virusa na ljudske stanice. Hemaglutinacija nije bila spriječena uporabom eteričnog ulja. Pokazan je i sinergistički učinak s niskim dozama oseltamivira. GC-MS analiza pokazala je da se istraživano ulje najvećim dijelom sastojalo od geraniala i nerala (Pourghanbari i sur., 2016).

Alzheimerova bolest

U istraživanju učinka matičnjaka na Alzheimerovu bolest, stanice PC12 linije bile su izložene ukupnom ekstraktu matičnjaka ili samo njegovom polifenolima bogatom frakcijom nakon čega su izazvane oksidativne promjene. Frakcija bogata polifenolima pokazala je bolji neuroprotektivni učinak od ukupnog ekstrakta te bi se stoga polifenoli mogli koristiti u pripravcima za sprječavanje bolesti (Sepand i sur., 2013).

Karcinom

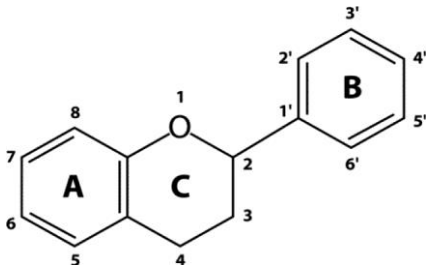
Antiproliferativni i proapoptotički učinak ekstrakta matičnjaka pokazan je na HT-29 i T84 stanicama ljudskog karcinoma crijeva. Autori ukazuju na mogućnost korištenja ekstrakta matičnjaka ili nekih njegovih frakcija u sprječavanju nastanka karcinoma crijeva. U drugoj studiji, 50%-tni etanolni ekstrakt pokazao je antiproliferativni i antioksidativni učinak, a kao glavna djelotvorna sastavnica označena je ružmarinska kiselina (Weidner i sur., 2015; Encalada i sur., 2011).

Inhibicija rasta stanica karcinoma korištenjem vodenoalkoholnog ekstrakta utvrđena je na staničnim linijama adenokarcinoma dojke i prostate, karcinoma jajnika i karcinoma ne-malih plućnih stanica. O hormonima ovisni tumori pokazali su se puno osjetljivijima na antitumorski učinak ekstrakta (Jahanban-Esfahlan i sur., 2015).

1.4. FLAVONOIDI

1.4.1. Kemijski sastav flavonoida

Flavonoidi su široko rasprostranjeni i raznoliki sekundarni metaboliti biljaka. Ovi polifenolni antioksidansi sadrže dva aromatska prstena povezana s propanskim lancem koji uglavnom s atomom kisika čini heterociklički prsten (Slika 4.).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida (www.researchgate.net)

Flavonoidi se mogu podijeliti u podskupine ovisno o oksidacijskom stanju heterocikličkog prstena C te broju i vrsti supstituenata vezanih na aromatskim prstenima A i B. Uz iznimku flavanola, većina flavonoida je u prirodi glikolizirana ili na drugi način konjugirana (hidroksilirana, ramnozirana, metilirana, acilirana). Položaj, broj i vrsta šećernih molekula vezanih na aglikonsku komponentu također doprinosi raznolikosti i rasprostranjenosti ove skupine spojeva (Beecher, 2003; Koes i sur, 1994).

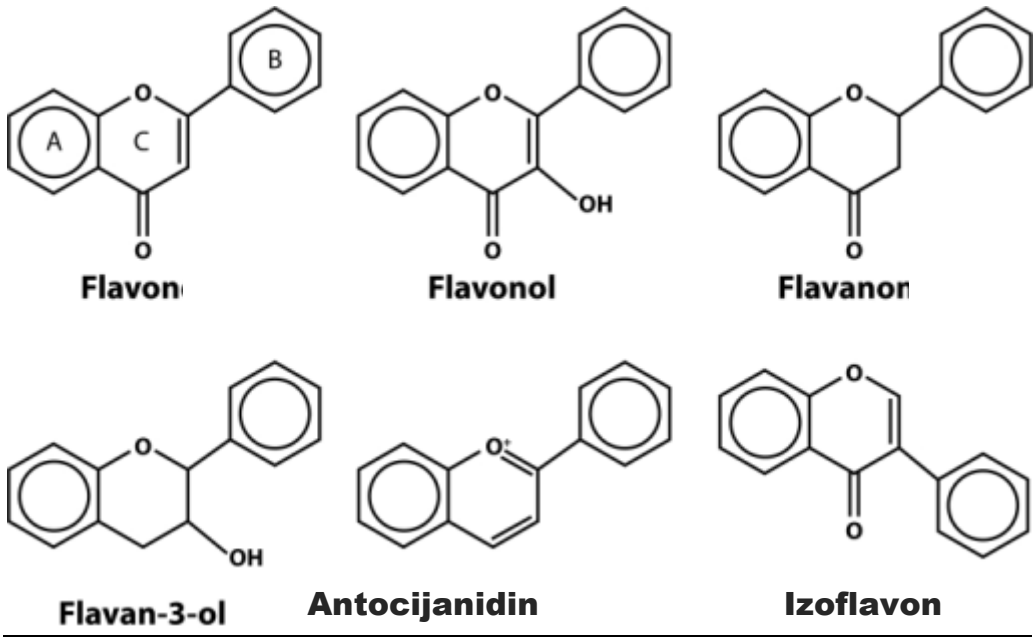
1.4.2 Biosinteza flavonoida

Biosinteza flavonoida započinje enzimskom reakcijom između triju molekula malonil-CoA i jedne molekule *p*-kumaril-CoA pri čemu nastaje naringenin-kalkon. Reakciju katalizira kalkon-sintaza. Ova dva neposredna prethodnika ishodnog spoja dolaze iz različitih metaboličkih puteva. Nastajanje *p*-kumaril-CoA odvija se u tri enzimska koraka počevši s fenilalaninom koji se deaminira pri čemu nastaje cimetna kiselina koja se zatim prevodi u *p*-kumarnu kiselinu. Zatim, uvođenjem koenzima A nastaje *p*-kumaril-CoA. Ovim biosintetskim

putem mogu nastati brojni sekundarni metaboliti, uključujući lignine, kumarine i stilbene. Malonil-CoA nastaje karboksilacijom acetil-CoA u Krebsovom ciklusu. Nastali naringenin-kalkon izomerizira se enzimom kalkon-flavon izomerazom čime nastaje osnovna struktura flavanona. Iz osnovne strukture daljnjim enzimskim reakcijama hidroksilacije, redukcije i metilacije nastaju ostali strukturni oblici flavonoida (Koes i sur., 1994).

1.4.3 Derivati flavonoida

Raznolikost flavonoidnih podskupina ukazuje na to da su se flavonoidi postupno razvijali tijekom evolucije. Kalkoni, flavanoni i flavonoli javili su se najranije i to s odjeljkom *Bryophyta* (mahovine). Kad su papratnjače razvile provodni sustav, pojavili su se proantocijanidini za održavanje strukture i čvrstoće. Antocijana, koji svojim šarenilom privlače kukce, nije bilo sve dok se nisu pojavile cvjetnice. Slika 5. prikazuje najpoznatije podskupine flavonoida.

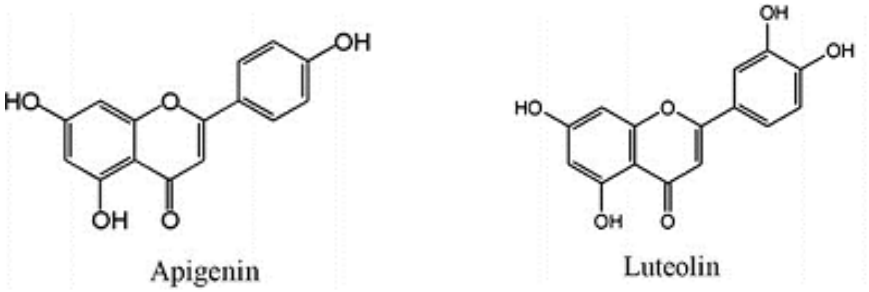


Slika 5. Strukture najpoznatijih flavonoidnih derivata (www.openi.nlm.nih.gov)

Flavoni

Najpoznatiji predstavnici aglikona flavona su apigenin i luteolin (Slika 6.). Flavoni se nalaze u zelenim lisnatim biljkama. U biljnim drogama od njihovih heterozida često se

javljaju O-glikozidi (apigenin-7-O-glukozid, luteolin-7-O-glukozid) i C-glikozidi (apigenin-8-C-glukozid=viteksin i luteolin-8-C-glukozid=orijentin) (Kuštrak, 2005; Beecher, 2003).



Slika 6. Strukture apigenina i luteolina (www.researchgate.net)

Flavonoli

Flavonoli su izrazito rasprostranjeni u biljnom svijetu. Kvercetin, miricetin, izoramnetin i kemferol najčešći su flavonolski aglikoni. Poznati heterozidi su: hiperozid (kvercetin-3-O-galaktozid), izokvercitrin (kvercetin-3-O-glukozid), kvercitrin (kvercetin-3-O-ramnozid), rutin (kvercetin-3-O-ramnoglukozid) te astragalin (kemferol-3-O-glukozid) (Kuštrak, 2005; Beecher, 2003).

Flavanoni

U vrstama roda *Citrus* L. mogu se pronaći flavanoni. Oni su odgovorni za gorak okus sokova i drugih napitaka pripravljenih od plodova vrsta ovog roda. Predstavnici ove skupine flavonoida su: hesperetin (glikozilirani hesperidin), naringenin (glikozilirani naringin) (Beecher, 2003).

Antocijanidini

Antocijani, glikozidi antocijanidina, većinom su odgovorni za raznolikost boja plodova i latica cvjetova u biljkama. Primjeri antocijanidina su pelargonidin, delfinidin, malvidin, petunidin, peonidin i cijanidin. Ukrasne biljke najčešće se odabiru na temelju boje cvjetova. Ipak mogući su različiti uzorci na listovima koji su, između ostalog, uvjetovani i načinom odlaganja antocijana kao kod biljaka iz roda *Maranta* Morren. Iako su antocijani najpoznatiji spojevi koji daju boju raznim biljnim dijelovima, nisu jedini. Primjerice, crvena boja cvjetova reda *Caryophyllales* potječe od betacijanina (Beecher, 2003; Bohm, 1999).

Izoflavoni

Daidzein, genistein i glicitein primjer su izoflavona koji se nalaze u mahunarkama (npr. soja). Njihov estrogeni učinak posebno je zanimljiv. Iako nisu steroidne strukture, zbog steričke sličnosti mogu se vezati na ljudske estrogenske receptore. S većim se afinitetom vežu na ERβ, u odnosu na ERα podtip receptora, a vežu se s 10^{-2} do 10^{-4} slabijim afinitetom od 17β estradiola. Zbog različitosti u prehrani, mogu se pronaći u krvi u količinama do 10 000 puta većim od steroidnih estrogena pa se stoga istražuju radi mogućnosti lakšeg podnošenja tegoba menopauze i sprječavanja razvoja karcinoma dojke. Azijska epidemiološka istraživanja pokazuju povoljan učinak na zdravlje, dok klinički pokusi u zapadnim zemljama često daju skromne, čak i suprotne rezultate. Razlog ovih različitih opažanja može se pronaći u tome što je prehrambeni unos izoflavona u Aziji tradicionalno visok što se ne mora potvrditi kratkotrajnim korištenjem izoliranih izoflavona biljnog podrijetla (Preedy, 2013; Beecher, 2003).

1.4.4 Uloga flavonoida u biljkama

Dugi niz godina uloga flavonoida u biljkama nije bila razjašnjena. Razlozi se mogu dijelom pronaći u tome što su se istraživanja uglavnom temeljila na njihovim učincima u ljudskom organizmu. Danas se smatra kako su se razvili kako bi bili kemijski oblici prijenosa informacija u biljnom svijetu, a dalje su se razvijali kao zaštita od UV zračenja. Biljkama svjetlo treba zbog procesa fotosinteze, ali štetno UV zračenje može dovesti do oštećenja DNA i nastanka raznih bolesti. Flavonoidi apsorbiraju UV zračenje pa se stoga ekspresija gena za proteine biosintetskog puta flavonoida pojačava pri povećanoj izloženosti suncu.

Antocijani i flavonoli imaju dobro razjašnjenu ulogu u privlačenju kukaca za oprašivanje i širenju sjemenaka biljaka. Dokazi za ovu njihovu ulogu mogu se pronaći u činjenicama da su najviše smješteni u epidermi latica, da je neposredno prije pupanja transkripcija gena za enzime koji sudjeluju u ovom procesu najveća kao i brzina nastajanja antocijana. Cvjetni pigmenti, koji se najčešće sastoje od upravo spomenutih sastavnica, tako privlače kukce velikim, šareno obojenim laticama i signaliziraju prisutnost nekog oblika nagrade - primjerice nektara. Antocijani su odgovorni za plave i crvene pigmente, a kalkoni i auroni za žute. Flavonoli i flavanoni, koji se također mogu pronaći u laticama, nemaju boje, ali sudjeluju u stvaranju različitih nijansi obojenosti stvarajući komplekse s cijaninima i

metalnim ionima. Proces stvaranja različitih boja koristeći komplekse naziva se kopigmentacijom, a primjer njezinog rezultata može se vidjeti kod cvjetova intenzivno plave boje. Nedostatak latica značajno smanjuje broj kukaca koji dolaze do biljke i zato nakon oplodnje, kako bi biljke signalizirale da je oplodnja izvršena, latice otpadaju.

Flavonoidi imaju utjecaj na razmnožavanje biljaka i time što daju boju prašnicima i tučku. Antocijani, flavoni i kalkoni najčešće su pronalaženi tipovi flavonoida u prašnicima i smatra se da imaju ulogu u razvoju cvjetne peludi. U tučku se najviše javljaju flavonoli i pretpostavlja se da sudjeluju u usmjeravanju peluda do mjesta oplodnje, ali još ne postoje eksperimentalno potvrđeni dokazi.

Flavonoidi imaju i svoju ulogu u prijenosu informacija kod biljaka iz porodice *Fabaceae* s bakterijskim vrstama (rodovi *Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium*) koje omogućavaju vezanje dušika iz tla, makar to još nije u potpunosti razjašnjeno. Smatra se da svaka biljka sposobna za ovakvu vrstu simbioze stvara svoju vlastitu kombinaciju flavonoidnih spojeva koje onda preko korijena ispušta u tlo i na taj način kemijski signalizira bakterijama svoju prisutnost. U ovom slučaju, flavonoidi djeluju poput biljnih hormona.

Kemijski heterogena skupina fitoaleksina, koji u svom sastavu sadrže i flavonoide, sudjeluje u obrani biljaka od patogena. Ostali mehanizmi obrane uključuju pojačano odlaganje lignina i glikoproteina bogatih hidroksiprolinom u stanične stijenke te indukciju sinteze litičkih enzima.

Parazitske ili poluparazitske biljne vrste koriste se flavonoidima koje ispušta domaćin kako bi razvile haustorije i naselile se na nju.

Trjeslovine (tanini), poznati i kao proantocijanidini, polimeri su flavonoida i dio su strukture biljaka koji joj pojačavaju mehaničku čvrstoću (Koes i sur., 1994).

1.4.5 Uloga flavonoida u ljudskom organizmu

Povijest ljudskog korištenja flavonoida izrazito je duga. Industrija parfema koristi ih kao mirisne note, prehrambena za postizanje željenih okusa ili boja gotovih proizvoda, a farmaceutska istražuje njihove učinke u liječenju (Koes i sur., 1994).

Protuupalni, antiviralni, citotoksični i antikarcinogeni učinci flavonoida potječu od interakcije s ljudskim biomolekulama poput regulatornih enzima. Antioksidativni učinci posredovani su stupanjem u reakciju sa slobodnim elektronima te sprječavanjem nastanka

slobodnih elektrona. Neki od dokazanih poželjnih učinaka flavonoida u različitim patološkim stanjima prikazani su u tablici 1. (Lee i sur., 2007).

Tablica 1. Prikaz specifičnih učinaka flavonoida

Pridruženi učinak	**Flavonoid**
Karcinom	Apigenin Silimarin Degvelin Flavopiridol Antocijan i cijanidin Flavonoidi brusnice i grejpa Flavonoidi ekstrakta biljke *Euphorbia peplus* L.
Imunomodulacija	miricetin
Hvatanje slobodnih radikala	likopen
Inhibicija enzima	katehin 3-furanil analozi toksoflavina
Utjecaj na hormone	gliceolini
Hipertenzija i mikrokrvarenja	epikatehin kvercetin
Diabetes mellitus	silimarin luteolin
Alergije	trokserutin
Kardiovaskularni sustav	stilbeni polimetoksiflavoni flavon-8-octena kiselina
Hiperkolesterolemija	fitoaleksin
Bolesti neurona	kvercetin floretin Flavonoidi nara (*Punica granatum* L.)

1.4.6. Toksičnost flavonoida

Flavonoidi se smatraju sigurnim molekulama jer su oduvijek prisutni u ljudskoj prehrani. Učinci visokih doza flavonoida koje bi se mogle koristiti u suvremenim ljekovitim oblicima i njihova potencijalna toksičnost još uvijek nije dovoljno istražena.

Smatra se da flavonoidi ne mogu izazvati imunosni odgovor kao male organske molekule - tek vezanjem na makromolekule poput proteina u plazmi mogu postati antigenični. Primjer takvog neželjenog učinka uočen je kod katehina i njegovih metabolita koji se mogu vezati na eritrocite i prouzrokovati imunosnu reakciju. Posljedica takve reakcije je hemolitička anemija koja se povlači prestankom uzimanja pripravaka s katehinom.

Sigurnost i podnošljivost kvercetina ispitivana je u pacijenata oboljelih od karcinoma. Svaka tri tjedna davala im se intravenska injekcija te je utvrđeno da je maksimalna podnošljiva doza čak 1700 mg/m^2. Pri toj količini javlja se nefrotoksičnost, ali ne i mijelosupresija. Iz ove faze 1 kliničke studije, u daljnoj, 2. fazi istraživanja primijenjena je doza od 1400 mg/m^2 (Alaoui-Jamali, 2010; Lee i sur., 2007).

Interakcija flavonoida s CYP enzimima posebno je zanimljiva. Naringenin, kojeg u većim količinama sadrži sok grejpa, inhibitor je CYP 3A4 enzima i smanjuje metabolizam lijekova koji se njime razgrađuju poput blokatora kalcijevih kanala.

Istraživanje na miševima pokazala je da kvercetin u dozi od 200 mg/kg povećava hepatotoksičnost i trajanje anestetičkog djelovanja propofola inhibicijom glukuronidacije lijeka.

Kavakalkoni iz biljke *Piper methysticum* G.Forst. mogu uzrokovati zatajenje jetre, koje je opisano u više od 30 slučajeva pa je navedena biljka zabranjena kao OTC preparat u Njemačkoj i Švicarskoj. Biljka je autohtona u južnom Pacifiku, a u zapadnim zemljama postala je popularna zbog anksiolitičkog učinka (Galatti i O'Brien, 2004).

Većina flavonoida dolazi na tržište u obliku dodataka prehrani, a često izvan svake farmaceutske kontrole. Dodatna istraživanja i nadzor pripravaka na tržištu mogu omogućiti sigurnu primjenu flavonoida.

1.4.7. Analiza flavonoida

Osiguravanje kvalitete biljnog materijala zahtjeva temeljitu analizu jer kvalitativni sastav biljke ovisi o podneblju u kojem raste kao i o različitim okolišnim uvjetima tijekom vremena.

Proučavanje flavonoida započinje ekstrakcijom iz biljke i odjeljivanjem od drugih sastavnica. Ekstrakcija se najčešće provodi metanolom u temperaturnom rasponu od 20 do 50° C, ovisno o stabilnosti sastavnica istraživane biljke. Moguće je i korištenje ostalih otapala poput vode, etanola, acetona ili drugih organskih otapala. Tako dobiveni uzorak treba pročistiti od lipida, klorofila, trjeslovina, organskih kiselina, soli i drugih sastavnica. Pročišćavanje se može provesti gel ili tekućinskom kromatografijom, makar su poznate i starije kemijske metode poput taloženja trjeslovina proteinima.

Za samu analizu primjenjuju se postupci visoko-djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC), masene spektrometrije (MS) i kapilarne elektroforeze (CE). HPLC najčešće je korištena tehnika analize, ali kapilarna elektroforeza pokazala se kao korisna zamjena jer je visoko selektivna te stoga omogućuje razdvajanje i dokazivanje flavonoida koje HPLC ne može prepoznati kao različite. Masena se spektrometrija relativno nedavno počela koristiti kao tehnika analize. Novije metode ionizacije omogućile su analizu bez derivatizacije flavonoida, a pri njihovom odabiru treba pripaziti i na termičku stabilnost sastavnica. Tehnike ionizacije koje se najčešće koriste pri analizi flavonoida su ionska stupica (IT), elektrosprej ionizacija (ESI) i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI). Kombinirane tehnike u kojem analiti prolaze kroz HPLC-UV ili HPLC-MS sustave omogućuju dobivanje raznih podataka samo jednom analizom pa se koriste kao metode prvog izbora kod potvrđivanja kemijskog identiteta biljaka, za određivanje količine pojedinih vrsta flavonoida i za otkrivanje patvorina (Rice-Evans i Parker, 2003).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Liječenje biljnim pripravcima izrazito je učestalo, stoga je u interesu javnog zdravlja saznati što je moguće više o njima. Pozadina farmakološkog djelovanja pojedinih biljaka, ovisnost kemijskog sastava o podneblju, sigurnost primjene i mogućnost krivotvorenja u središtu su suvremenih istraživanja.

Ljekovita svojstva matičnjaka (*M. officinalis*) stoljećima su poznata u Europi i širem mediteranskom području. Učinci poput antidepresivnog, anksiolitičkog, antidijabetičkog i antimikrobnog istraženi su u brojnim ispitivanjima. Polifenolima, među kojima su i flavonoidi, najčešće se pripisuju antivirusni i neuroprotektivni učinci. Postizanje upravo ovih dvaju djelovanja i danas su najveći izazov farmaceutske znanosti. Virusi često i brzo mutiraju te lako postaju otporni na ljudski razvijene antivirotike. Mentalne bolesti danas su u eksponencijalnom porastu, izrazito su zahtjevne za liječenje te bi idealno bilo spriječiti njihov nastanak razvijanjem lijeka s neuroprotektivnim učincima.

Svrha ovog rada bila je kvantitativna analiza flavonoida u listovima vrste *M. officinalis* s različitih uzgojnih nalazišta. Određivanje flavonoida provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru. Nakon analize u kojoj je određena količina flavonoida u pojedinom uzorku, podaci su statistički obrađeni.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su osušeni (Slika 7.) i usitnjeni listovi vrste *Melissa officinalis* L. uzgojene 2014., 2015., i 2016. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, 2014. u Našicama, 2014. u Banja Luci (Bosna i Hercegovina) i 2014. u Novom Sadu (Srbija).



Slika 7. Osušeni listovi matičnjaka

3.2. APARATURA I KEMIKALIJE

Za spektrofotometrijsko određivanje količine flavonoida upotrijebljen je UV-VIS spektrofotometar Varian Cary 50 Bio (proizvod tvrtke Varian Inc., SAD) Zavoda za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Za određivanje količine flavonoida korišteni su sljedeće kemikalije:

- aceton,
- 25%-tna kloridna kiselina,
- 0,5%-tna vodena otopina heksametilentetramina,
- etilacetat,
- 0,5%-tna vodena otopina natrijevog citrata,

- otopina aluminijevog klorida (2g $AlCl_3$ x 6 H_2O otopi se u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline),
- 5%-tna metanolna otopina octene kiseline,
- destilirana voda.

3.3. METODE ISTRAŽIVANJA

3.3.1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraživane biljne vrste potvrđen je ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka (Domac, 2002).

3.3.2. Određivanje količine flavonoida

0,5 g biljnog materijala ekstrahirano je s 20,0 mL acetona, 2,0 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1,0 mL 0,5%-tne vodene otopine heksametilentetramina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (Slika 8.). Hidrolizat je propušten kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala na pamuku ponovno su ekstrahirani s 20,0 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Otopina je propuštena kroz pamuk u odmjernu tikvicu te je ekstrakcija acetonom ponovljena još jedanput. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100,0 mL. 20,0 mL hidrolizata pomiješano je s 20,0 mL vode i ekstrahirano jednom s 15,0 mL te još tri puta s po 10,0 mL etilacetata (Slika 9.). Sjedinjene etilacetatne faze isprane su dva puta s 40,0 mL vode i propuštene kroz pamuk. Razrijeđene su etilacetatom do 50,0 mL. Po 10,0 mL ove otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25,0 mL. U obje tikvice dodano je 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijevog citrata. U jednu tikvicu dodano je 2,0 mL otopine $AlCl_3$, a zatim su obje tikvice nadopunjene do oznake 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline (Slika 10.).

Nakon 45 minuta izmjerena je apsorbancija otopine 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 izračuna se kao kvercetin prema izrazu:

$$\textbf{\% flavonoida računat kao kvercetin} = \frac{\textbf{A x 0,772}}{\textbf{b}}$$

A = apsorbancija; b = 0,5 (odvaga biljnog materijala u gramima)



Slika 8. Pripremanje ekstrakta



Slika 9. Ekstrakcija etilacetatom



Slika 10. Uzorci pripremljeni za mjerenje

3.3. Računalni programi

Statistička obrada podataka (Studentov *t*-test) izvedena je pomoću programa Microsoft Excel 2010.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FLAVONOIDA

Količina flavonoida u svim je uzorcima određena tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije (Tablica 2.).
Za uspoređivanje količine flavonoida između uzoraka korišten je Studentov *t*-test.

Tablica 2. Udio flavonoida (%) u uzorcima

Uzorci:	w(%)
1A/(„Fran Kušan“, 2014.)	0,21± 0,001[a, c]
1B /(„Fran Kušan“, 2015.)	0,35± 0,004[a, b]
1C/(„Fran Kušan“, 2016.)	0,42± 0,009[b, c]
2/ Našice, 2014.	0,14± 0,001[d, e]
3/ Banja Luka, 2014.	0,33± 0,01[d]
4/ Novi Sad, 2014.	0,36± 0,003[e]

w(%) = $\bar{x}$ ± SD (n = 3)

Statistički značajna razlika između uzoraka sa signifikantnošću: [a] p< 0,0004, [b] p<0,01, [c] p<0,0009, [d] p<0,002, [e] p<0,0001.

Sadržaj flavonoida u uzorcima kretao se od 0,14% do 0,42%. Najveću količinu flavonoida (0,42%) imao je uzorak uzgojen 2016. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, a najmanju (0,14%) imao je uzorak uzgojen 2014. u Našicama.

Provedeni Studentov *t*-test pokazao je da se statistički značajno razlikuju uzorci matičnjaka (*M. officinalis* L.) uzgojeni u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ 2014. i 2015. godine, 2015. i 2016. godine kao i 2014. i 2016. godine. Nadalje, statistički značajna razlika pokazana je i između uzoraka matičnjaka (*M. officinalis* L.) iz Našica 2014. i Banja Luke 2014., kao i između uzoraka iz Našica 2014. i Novog Sada 2014.

Količina flavonoida u uzorcima iz Banja Luke 2014. i Novog Sada 2014. nije pokazala statistički značajnu razliku, kao ni usporedba skupine uzoraka iz Farmaceutskog botaničkog vrta tijekom 3 godine s drugom skupinom uzoraka iz Našica, Banja Luke i Novog Sada.

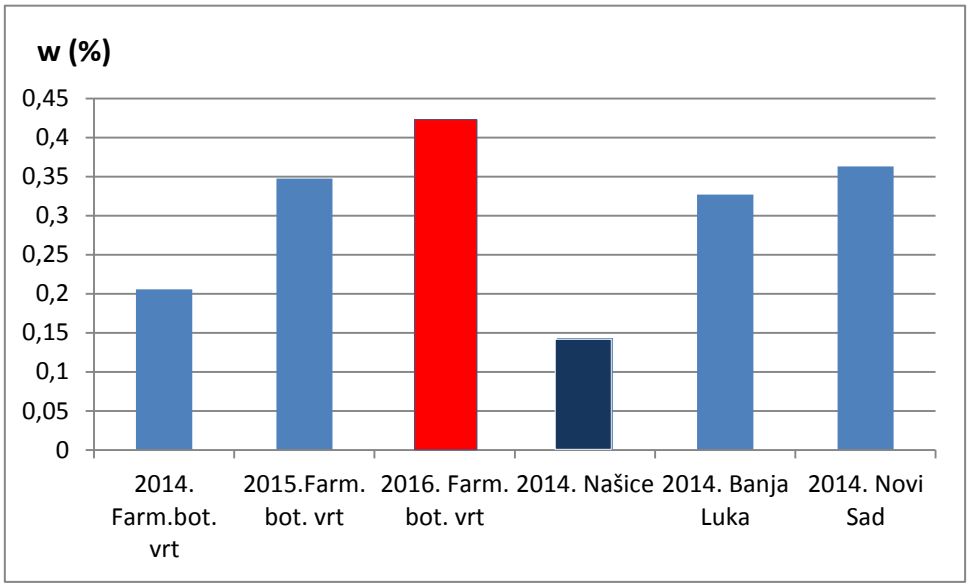
4.2. RASPRAVA

Značajka je ljekovitih biljaka da sadrže više različitih ljekovitih sastavnica. Često se jedna od tih sastavnica izdvaja kao glavna i ljekovita, ali u stvarnosti više njih pridonose djelovanju biljaka. Stoga je oponašanje ljekovitih učinaka biljke kemijskom sintezom jedne sastavnice vrlo zahtjevno, gotovo i nemoguće. Ipak, standardizacija pripravka na jednu sastavnicu u velikoj mjeri određuje kvalitetu takvog pripravka.

Ljekovite tvari u biljkama pohranjene su u njenim različitim dijelovima i nisu ravnomjerno raspoređene, već ovisno o funkciji u biljci. Također, količina flavonoida u biljnim dijelovima može biti različita. Na količinu flavonoida utječu brojni čimbenici poput mjesta uzgoja, vrste tla, nadmorske visine, količine sunca, oborina i hranjivih tvari koje su bile dostupne za razvoj mlade biljke. Navedeni podaci potvrđeni su i u ovom radu (Slika 11.) Biljke su tijekom rasta izložene različitim vrstama stresnih čimbenika kao što su vremenske nepogode, toplina, suša, jake oborine, biljojedi, patogeni, zagađenje zraka i brojnim drugima.

U različitim biljnim vrstama i biljnim dijelovima količina flavonoida je promjenljiva te je najčešće najveća u cvjetovima i listovima, a najmanja u stabljici i korijenu. U jednom istraživanju na matičnjaku pokazano je da se eterično ulje dobiveno od cvjetova i listova gotovo u potpunosti sastojalo od monoterpena i seskviterpena, dok se ulje stabljike uglavnom

sastojalo od zasićenih i nezasićenih masnih kiselina uz manje količine lako hlapljivih terpenoida (Afsharypuor i sur., 2015).



Slika 11. Grafički prikaz rezultata kvantitativne analize flavonoida

5. ZAKLJUČCI

Spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru kvantitativno su istraženi osušeni listovi matičnjaka (*M. officinalis*).

Najveća količina flavonoida od 0,42% utvrđena je u uzorku iz Farmaceutskog botaničkog vrta „Fran Kušan“ skupljenom 2016., a najmanja vrijednost od 0,14% u uzorku uzgojenom 2014. u Našicama.

Statističkom analizom potvrđene su različitosti u količinama flavonoida između uspoređivanih uzoraka te je utvrđeno da količina flavonoida u istoj biljnoj drogi varira ovisno o godini i mjestu uzgoja što može biti značajno za farmaceutsku kvalitetu.

6. LITERATURA

1. Afsharypuor S, Alijaniha F, Mosaddegh M, et al. Essential Oil Constituents of Leaf, Flower and Stem of Melissa officialis L. Grown in Gonbad-Kavus (Iran). *J Essent Oil Bear Pl*, 2015, 18, 460-463.
2. Ahadian H, Karbassi MH, Ghaneh S, Hakimian R. Therapeutic Effect of Melissa Gel and 5% Acyclovir Cream in Recurrent Herpes labialis: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *J Nat Pharm Prod*, 2015, 10.
3. Akbarzadeh M, Dehghani M, Moshfeghy Z, Emamghorieshi M, Tavakoli P, Zare N. Effect of Melissa officinalis Capsule on the Intensity of Premenstrual Syndrome Symptoms in High School Girl Students. *Nursing and midwifery studies*, 2015, 4.
4. Akhondali Z, Dianat M, Radan M. Negative Chronotropic and Antidysrhythmic Effects of Hydroalcoholic Extract of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.) on CaCl2-Induced Arrhythmias in Rats. *Electron physician*, 2015, 7, 971-976.
5. Alaoui-Jamali M. Alternative and Complementary Therapies for Cancer. Integrative Approaches and Discovery of Conventional Drugs. Springer Science and Business Media, 2010, str.600.
6. Alijaniha F, Naseri, M, Afsharypuor S, Fallahi F, Noorbala A, Mosaddegh M, Faghihzadeh S, Sadrai S. Heart palpitation relief with *Melissa officinalis* leaf extract: Double blind, randomized, placebo controlled trial of efficacy and safety. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164, 378-384.
7. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence, intake. *J Nutr*, 2003, 133
8. Bräuchler C, Meimberg H. Heubl G. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) – Taxonomy, biogeography and conflicts. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 55, 501-523.
9. Bohm BA. Introduction to flavonoids. CRC Press, 1999, str. 45-48.
10. Christ B, Müller KH. Zur serienmäβigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol Derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.
11. Cunha F, Tintino SR, Figueredo, et al. HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*. *Pharm Biol*, 2016, 54, 1664-1670.
12. Domac R. Flora Hrvatske. Priručnik za određivanje bilja (II. izdanje). Zagreb, Školska knjiga, 2002, str. 286-298.

13. Encalada AM, Hoyos, MK, Rehecho S, et al. Anti-proliferative Effect of *Melissa officinalis* on Human Colon Cancer Cell Line. *Plant Food Hum Nutr*, 2011, 66, 328-334.
14. Galatti G, O'Brien P. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *J Free Rad Bio Med,* 2004, 37, 287-303.
15. Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja (II. izdanje). Zagreb, August Cesarec Zagreb, 1990. str. 275.
16. Gromball J, Beschorner F, Wantzen C, Paulsen U, Burkart M. Hyperactivity, concentration difficulties and impulsiveness improve during seven weeks' treatment with valerian root and lemon balm extracts in primary school children. *Phytomedicine,* 2014, 21, 1098-1103.
17. Hasanein P. Riahi H. Antinociceptive and Antihyperglycemic Effects of *Melissa officinalis* Essential Oil in an Experimental Model of Diabetes. *Med Princ Pract*, 2015, 24, 47-52.
18. Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pac J Trop Biomed,* 2015, 5, 458-461.
19. Jahanban-Esfahlan A, Modaeinama S, Abasi M, Abbasi MM, Jahanbah-Esfahlan R. Anti Proliferative Properties of *Melissa officinalis* in Different Human Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer P*, 2015, 16, 5703-5707.
20. Jandaghi P, Noroozi M, Ardalani H, Alipour M. Lemon balm: A promising herbal therapy for patients with borderline hyperlipidemia-A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med*, 2016, 26, 136-140.
21. Joukar S, Asadipour H. Evaluation of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) Effects on Heart Electrical System. *Res Cardiovasc Med*, 2015, 4.
22. Joukar S, Asadipour H, Sheibani M, Najafipour H, Dabiri S. The effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) pretreatment on the resistance of the heart to myocardial injury. *Pharm Biol*, 2016, 54, 1005-1013.
23. Kefeli V, Kalevitch MV. Natural Growth Inhibitors and Phytohormones in Plants and Environment. Springer Science and Business Media, 2013, str. 65-70.
24. Khodsooz S, Moshtaghian J, Eivani M. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) in alloxan-induced diabetic rats. *J Physiol Pharmacol*, 2016, 20, 24-30.

25. Koes R, Quattrochio F, Mol JNM. The flavonoid biosynthetic pathway in plants. *Bioessays*, 1994, 16, 123-132.
26. Kovačević N. Osnovi farmakognozije (III. izdanje). Beograd, Institut za farmakognoziju, 2004, str. 287-289.
27. Kuštrak D. Farmakognozija-Fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005, str. 234-237.
28. Lee ER, Kang GH, Cho SG. Effect of flavonoids on human health: old subjects but new challenges. *Recent Pat Biotecnol*, 2007, 1, 139-150.
29. Lin S, Chou M, Chen W, Lai YS, Lu KH, Hao CW, Sheen LY. A medicinal herb, *Melissa officinalis* L. ameliorates depressive-like behavior of rats in the forced swimming test via regulating the serotonergic neurotransmitter. *J Ethnopharmacol*, 2015, 175, 266-272.
30. Mirghafourvand M, Malakouti J, Charandabi SMA, Khalili AF, Solmaz HG. The efficacy of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) alone and combined with lemon balm-Nepeta menthoides on premenstrual syndrome and quality of life among students: A randomized controlled trial. *J Herb Med*, 2016, 6, 142-148.
31. Osnovne strukture flavonoida (Slika 4.), 2016, https://www.researchgate.net, pristupljeno 8.12.2016.
32. Pourghanbari G, Nili H, Moattari A, Mohammadi A, Iraji A. Antiviral activity of the oseltamivir and *Melissa officinalis* L. essential oil against avian influenza A virus (H9N2). *VirusDisease*, 2016, 27, 170-178.
33. Preedy VR. Isoflavones: Chemistry, Analysis, Functions and Effects. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2013, str. 1-3.
34. Rice-Evans CA, Packer L. Flavonoids in Health and Disease. CRC Press, 2003, str. 43-65.
35. Saberi A, Abbasloo E, Sepehri G, Yadzanpanah M, Mirkamandari E, Sheibani V, Safi Z. The Effects of Methanolic Extract of *Melissa officinalis* on Experimental Gastric Ulcers in Rats. *Iran Red Crescent Me*, 2016, 18.
36. Sepand MR, Soodi M, Hajimehdipoor H, Soleimani M, Sahraei E. Comparison of Neuroprotective Effects of *Melissa officinalis* Total Extract and Its Acidic and Non-Acidic Fractions against A beta-Induced Toxicity. *Iran J Pharm Res*, 2013, 12, 415–423.
37. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188, 204-228.
38. Strukture apigenina i luteolina (Slika 6.), 2016, https://www.researchgate.net, pristupljeno 8.12.2016.

39. Strukture geraniala i nerala (Slika 2.), 2016, http://www.epharmacognosy.com, pristupljeno 8.12.2016.
40. Strukture najpoznatijih derivata flavonoida (Slika 5.), 2016, https://openi.nlm.nih.gov, pristupljeno 8.12.2016.
41. Struktura ursolne kiseline (Slika 3.), 2016, http://www.wildflowerfinder.org.uk, pristupljeno 8.12.2016.
42. Usai M, Atzei AD, Marchetti M. A Comparative Study on Essential Oil Intraspecific and Seasonal Variations: *Melissa romana* MILL. and *Melissa officinalis* L. from Sardinia. *Chem. Biodiversity*, 2016, 13, 1076 – 1087.
43. Wagner H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1982, str. 48-49.
44. Weidner C, Rousseau M, Plauth A, Wovro SJ, Fischer C, Abdel-Aziz H, Sauer S. *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine*, 2015, 22, 262-270.
45. Woo S, Yoon M, Kim J, Hong Y, Kim MY, Shin SS, Yonn M. The anti-angiogenic herbal extract from *Melissa officinalis* inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and suppresses adipocyte hypertrophy in high fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *J Ethnopharmacol*, 2016, 178, 238-250.

7. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Ljekovita svojstva matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) stoljećima su poznata u Europi i širem mediteranskom području, a tradicija liječenja u Hrvatskoj započela je utjecajem njemačkih srednjovjekovnih samostana. Farmakološki učinci poput antidepresivnog, anksiolitičkog, antidijabetičkog, kardioprotektivnog i antimikrobnog istraženi su u brojnim radovima. Polifenolima, među kojima su i flavonoidi, najčešće se pripisuju antivirusni i neuroprotektivni učinci.

U ovom radu, spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru kvantitativno su analizirani flavonoidi u osušenim listovima matičnjaka s različitih nalazišta. Statistička obrada rezultata provedena je Studentovim *t*-testom.

Najveća količina flavonoida od 0,42% određena je u uzorku iz Farmaceutskog botaničkog vrta „Fran Kušan“ skupljenom 2016., a najmanja vrijednost od 0,14% u uzorku uzgojenom 2014. u Našicama.

SUMMARY

Medicinal properties of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) have been known for centuries in Europe and the wider Mediterranean area. In Croatia, using lemon balm as a medicinal plant begun under the influence of German monasteries during the Middle Ages. Antidepressant, antidiabetic, cardioprotective and antimicrobial properties have been investigated in numerous studies. Polyphenols, including flavonoids, are considered to be the main components responsible for antiviral and neuroprotective effects.

In this thesis, the amount of flavonoids in dried leaves collected from various locations was assessed using the spectrophotometric method by Christ and Müller. The statistical analysis was performed using the Student's *t*-test.

The highest flavonoid content of 0,42% was found in leaves collected from the Pharmaceutical Botanical Garden of "Fran Kušan" (2016) while the lowest content of 0,14% was detected in leaves from Našice (2014).

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

KVANTITATIVNA ANALIZA FLAVONOIDA U LISTOVIMA MATIČNJAKA - *Melissa officinalis* L.

Katarina Žunić

SAŽETAK

Ljekovita svojstva matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) stoljećima su poznata u Europi i širem mediteranskom području, a tradicija liječenja u Hrvatskoj započela je utjecajem njemačkih srednjovjekovnih samostana. Farmakološki učinci poput antidepresivnog, anksiolitičkog, antidijabetičkog, kardioprotektivnog i antimikrobnog istraženi su u brojnim radovima. Polifenolima, među kojima su i flavonoidi, najčešće se pripisuju antivirusni i neuroprotektivni učinci.

U ovom radu, spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru kvantitativno su analizirani flavonoidi u osušenim listovima matičnjaka s različitih nalazišta. Statistička obrada rezultata provedena je Studentovim *t*-testom. Najveća količina flavonoida od 0,42 % određena je u uzorku iz Farmaceutskog botaničkog vrta „Fran Kušan“ skupljenom 2016., a najmanja vrijednost od 0,14% u uzorku uzgojenom 2014. u Našicama.

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

Rad sadrži: 31 stranicu, 11 grafičkih prikaza, 2 tablice i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Melissa officinalis* L., flavonoidi, kvantitativna analiza, spektrofotometrija

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, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Quantitative analysis of flavonoids in leaves of lemon balm - *Melissa officinalis* L.

Katarina Žunić

SUMMARY

Medicinal properties of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) have been known for centuries in Europe and the wider Mediterranean area. In Croatia, using lemon balm as a medicinal plant begun under the influence of German monasteries during the Middle Ages. Antidepressant, antidiabetic, cardioprotective and antimicrobial properties have been investigated in numerous studies. Polyphenols, including flavonoids, are considered to be the main components responsible for antiviral and neuroprotective effects.
In this thesis, the amount of flavonoids in dried leaves collected from various locations was assessed using the spectrophotometric method by Christ and Müller. The statistical analysis was performed using the Student's *t*-test.
The highest flavonoid content of 0,42% was found in leaves collected from the Pharmaceutical Botanical Garden of Medicinal Plants "Fran Kušan" (2016) while the lowest one of 0,14% was detected in leaves from Našice (2014).

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

Thesis includes: 31 pages, 11 figures, 2 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Melissa officinalis* L., flavonoids, quantitative analysis, spectrophotometry

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

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

Mirza Bojić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: January 2017