Određivanje količine ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u pet vrsta roda Teucrium L.

Tatalović, Zoran

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:163:638654

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Zoran Tatalović

Određivanje količine ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u pet vrsta roda *Teucrium* 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 uputama 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 ustupljenoj pomoći, strpljenju tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.
Posebno zahvaljujem Luki, Alanu, Vladimiru, Sibyl, Maji, Josipu i posthumno Juliusu na pomoći, podršci i usmjeravanju tijekom studija.

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 *Teucrium* L. 2
1.1.3 Morfološka obilježja i rasprostranjenost vrsta *T. botrys* L., *T. chamaedrys* L., *T. halacsyanum* Heldr., *T. hyrcanicum* L. i *T. scorodonia* L. 3
1.1.3.1 *Teucrium botrys* L. 3
1.1.3.2 *Teucrium chamaedrys* L. 4
1.1.3.3 *Teucrium halacsyanum* Heldr. 5
1.1.3.4 *Teucrium hyrcanicum* L. 6
1.1.3.5 *Teucrium scorodonia* L. 7
1.2 KEMIJSKI SASTAV 8
1.2.1 Gorke tvari 8
1.2.2 Eterična ulja 8
1.2.3 Steroli 9
1.2.4 Saponini 9
1.3 BIOLOŠKI UČINCI I UPOTREBA 10
1.4 POLIFENOLI 11
1.4.1 Uvod 11
1.4.2 Podjela i kemijska struktura polifenola 11
1.5 TRJESLOVINE 13
1.5.1 Kemijski sastav trjeslovina 13
1.5.2 Biosinteza trjeslovina 14
1.5.3 Metode analize trjeslovina 16
1.5.4 Raprostranjenost trjeslovina 17
1.5.5 Upotreba i djelovanje trjeslovina 17
1.5.6 Trjeslovine u vrstama roda *Teucrium* 17
2 OBRAZLOŽENJE TEME 18
3 MATERIJALI I METODE 19
3.1 BILJNI MATERIJAL 19
3.2 APARATI I PRIBOR 19
3.3 METODE ISTRAŽIVANJA 21

3.3.1 Identifikacija biljnog materijala 21
3.3.2 Određivanje količine ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina 21
3.3.3 Računalni programi 23
4 REZULTATI I RASPRAVA 24
4.1 KVANTITATIVNA ANALIZA UKUPNIH POLIFENOLA, NETANINSKIH POLIFENOLA I TRJESLOVINA 24
4.2 RASPRAVA 29
5 ZAKLJUČCI 30
6 LITERATURA 31
7 SAŽETAK/SUMMARY 35
8 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1 UVOD

Tradicija uporabe ljekovitog bilja je stara koliko i čovjek. Dragocjeno znanje o primjeni ljekovitog bilja je čovjek vjerojatno naučio od divljih životinja, pripitomljenih životinja i metodom pokušaja i pogrešaka. Velika količina tog znanja se sačuvala do danas.

Biljke imaju sposobnost sinteze velike količine raznolikih spojeva čija je svrha obrana od životinja, kukaca i biljojeda. Do danas je otkriveno otprilike 12000 spojeva, a pretpostavlja se da je taj broj samo 10 % ukupnih spojeva prisutnih u biljkama. Mnogi lijekovi koji se danas koriste su ili biljnog podrijetla, sintetiziraju se iz biljnih prethodnika ili su sintetizirani po uzoru na spojeve iz prirode.

U današnje vrijeme ljudi sve češće posežu za ljekovitim biljem djelomično zbog lake dostupnosti, velike terapijske širine, tradicije liječenja, manje nuspojava od sintetskih lijekova, osjećaja sigurnosti koji pruža mala kućna ljekarna ili romantičnog pogleda na minula vremena.

Biljke roda *Teucrium* L. su dio iznimno raznolike hrvatske flore. Sam rod *Teucrium* obuhvaća oko 300 vrsta od kojih je oko 50 rasprostranjeno u Europi, a 11 vrsta se nalazi na području Hrvatske. Najpoznatija i omiljena biljna vrsta iz ovog roda je *Teucrium montanum* L. – trava iva koja „od mrtva radi živa“.

Uz svo mnoštvo lijekova, širenje znanja o ljekovitim oblicima iz prirode je potrebno iz praktičnih razloga, ali i iz čiste znanstvene radoznalosti. Upravo je s tim ciljem napisan ovaj diplomski rad.

1.1 BOTANIČKI PODACI

1.1.1 Morfološka obilježja i rasprostranjenost porodice Lamiaceae

Biljke porodice Lamiaceae (Labiatae – usnače) su polugrmovi ili grmovi, a rjeđe zeljaste biljke. Često su aromatičnog mirisa zbog sadržaja etričnog ulja u žljezdanim dlakama i rozetastim žlijezdama listova, cvjetova i stabljika. Pojavljuju se kao jednogodišnje biljke ili trajnice. Listovi su jednostavni, cjelovitog ili narovašenog ruba, smješteni križasto nasuprotno, te su donji listovi često skupljeni u rozetu. Cvjetovi biljaka ove porodice su dvospolni, rijetko poligamni, jednosimetrični i često združeni u klasasti vršni cvat. Čaška ima cjevasti ili zvonoliki oblik s 5 lapova. Vjenčić ima oblik cijevi koja se prema gornjem dijelu širi u obliku lijevka te na vrhu razdvaja u dvije nejednake usne. Donja usna je dulja i sastoji se od tri režnja, a gornja je kraća i građena je od dva srasla režnja. Najčešće imaju po dva para prašnika, jedan dulji i jedan kraći. Dva plodnička lista čine nadraslu plodnicu u kojoj se nalaze četiri pretinca odvojena nepravilnom pregradom. Plod je najčešće suhi kalavac koji se raspada u četiri plodića (Domac, 2002).

Porodica Lamiaceae obuhvaća preko 3500 vrsta čije stanište se proteže po cijelom svijetu. Najbolje rastu u toplim podnebljima i stoga su najzastupljenije u zemljama Sredozemlja i Južne Azije, na vapnenačkoj podlozi. U Hrvatskoj se većina nalazi u primorskom području, no često rastu i u unutrašnjosti (Forenbacher, 2001; Kušan, 1956).

1.1.2 Morfološka obilježja i rasprostranjenost roda *Teucrium* L.

Rod *Teucrium* je poznat još iz grčke tradicije te je sam znanstveni naziv dobio po Teuceru, mitološkom sinu riječnog boga Skamandera i nimfe Idee, koji je otkrio dubačce i njihova ljekovita svojstva svom narodu.

Vrste roda *Teucrium* su aromatične biljke koje se nalaze u obliku zeljastih biljaka ili polugrmova. Listovi se obično nalaze na kratkoj peteljci, a rub je cjelovit, narovašen ili perast. Cvjetovi su skupljeni u grozdaste ili klasaste cvatove na vrhu stabljike okrenuti u jednu stranu ili su u pazušcima listova raspoređeni u 1 do 3 prividna pršljena. Čaška je cjevasta ili zvonasta, nazubljena ili dvousnata. Vjenčić ima oblik cijevi uklopljene u čašku. Gornje usne prividno nema jer je mala, rascijepljena i polovice su joj priklonjene donjoj usni. Donja usna se sastoji od pet dijelova, s velikim srednjim režnjem čiji je rub cjelovit ili nazubljen. Prašnika su četiri i prolaze kroz pukotinu u gornjoj usni. Plod je obrnuto jajasti oraščić (Forenbacher, 2001).

1.1.3 Morfološka obilježja i rasprostranjenost vrsta *T. botrys* L., *T. chamaedrys* L., *T. halacsyanum* Heldr., *T. hyrcanicum* L. i *T. scorodonia* L.

1.1.3.1 *Teucrium botrys* L.

Vrsta *T. botrys* (grozdasti dubačac) je jednogodišnja, rjeđe dvogodišnja biljka vrlo neugodnog mirisa. Korijen joj je vretenast, često nepravilan i zavijen. Stabljike su čvrste, uspravne, visine između 10 i 35 cm, jednostavne i četverobridne. Mogu se pojaviti u zelenoj ili crvenkastoj boji. Listovi su između 1,5 i 2 cm duljine, od polovice oštro urezani, često duboko rascijepljeni na pet ili sedam dijelova. Cvjetovi su dugi 10 do 15 cm, po 2 do 4 skupljena u cimozni cvat. Čaška je prilegla, žljezdasto dlakava, mrežaste nervature, s pet trokutastih zubaca. Vjenčić je svijetlocrven, svjetlije sredine, s tamnim crvenoljubičastim pjegama (Slika 1.). Plod je oraščić kuglastog oblika.

Grozdasti dubačac često raste na kamenitim mjestima. Pogoduju mu sunčana mjesta s tlom relativno siromašnom mineralnim tvarima. Porijeklo vrste je iz zapadne Europe, većinom Francuske i Njemačke. Nalazi se još u Španjolskoj, Italiji, Ujedinjenom Kraljevstvu, srednjoj Europi, Rumunjskoj, Alžiru, sjeveroistočnoj Americi i Balearima. U Hrvatskoj raste u Primorju i Dalmaciji (Jurišić, 1998).



Slika 1. *Teucrium botrys* L.

(www.robsplants.com)

1.1.3.2 *Teucrium chamaedrys* L.

Vrsta *T. chamaedrys* (obični dubačac, trbušac, mali dubačac) je polugrm i vazdazelena trajnica. Stabljike su uspravne, razgranjene, visoke 15 do 30 cm, crvenoljubičaste boje i prekrivene vunastim dlakama. Korijen je drvenast i ima podzemne vriježe. Listovi su 2 do 4 cm dugi, široki 1 do 2 cm, eliptičnog oblika, nasuprotno postavljeni, urezanog narovašenog ruba. Cvjetovi se nalaze na dugim stapkama, stoje uspravno i po 1-6 su skupljeni u grozdaste, pršljenasto raspoređene cvatove. Čaška ima oblik cijevi ili zvona, često je obložena dlakama i crvenoljubičastog je preljeva. Cvjetovi su dugi oko 1 cm, crvene su boje, dok ponekad mogu biti bijeli. Vjenčić se sastoji od cijevi koja je gola i donje usne koja je izvana dlakava. Srednji režanj ima oblik kugle, a postrani režnjevi su zašiljeni pa postavljeni uspravno (Slika 2.). Plod je glatki, jajoliki oraščić, duljine 1,5-2 mm, s čvrsto priljubljenom ovojnicom. Biljka ima vrlo ugodan miris i cvate od lipnja do kolovoza (Domac, 2002; Forenbacher, 2001).

Obični dubačac raste na ilovači, često i crljenici kamenitih obronaka od obale do pretplaninskih položaja (do 1400 m). Biljka voli suho, vapnenačko tlo obasjano suncem ili polusjenu. Podnosi velike temperaturne razlike i hladnoću. Ne pogoduje joj tlo s previše soli, niskog pH niti previše bogata tla. Ova vrsta se nalazi u Srednjoj i Južnoj Europi, u Sredozemlju i jugozapadnoj Aziji (Kovačić i sur., 2008; Forenbacher, 2001).



Slika 2. *Teucrium chamaedrys* L.

(www.robsplants.com)

1.1.3.3 *Teucrium halacsyanum* Heldr.

Vrsta *T. halacsyanum* je patuljasti polugrm koji naraste do visine od 15 cm, a rjeđe do 50 cm. Cvjetovi su ljubičaste boje i gusto su raspoređeni na izduženom grozdu. Listovi su zelene boje, jajoliki ili široko ovalni, 1-1,5 cm duljine, nazubljenog ruba i dlanaste nervature. Na kratkoj, plosnatoj peteljci su pršljenasto poredani na stabljici te se na njima nalaze sitne dlake. Čaška je dvousnata i sastoji se od 5 lapova. Vjenčić je ljubičast, obložen dlakama i dug 7 mm. Prašnici su dulji od zubaca čaške i vire van, a tučak ima zakrivljeni oblik i uvučen je u čašku (Slika 3.). Plod je jajasti oraščić.

Vrsta *T. halacsyanum* raste na kamenitom terenu, a najviše je rasprostranjena na području Grčke i Egipta. U Grčkoj je zaštićena vrsta (Polinum, 1980; Tutin, 1972).



Slika 3. *Teucrium halacsyanum* Heldr.

(www.greekflora.gr)

1.1.3.4 *Teucrium hyrcanicum* L.

Vrsta *T. hyrcanicum* je višegodišnja, zeljasta biljka čiji rast doseže 80 cm. Listovi su jajasti, nazubljeni, zelene boje dok je donji dio listova prekriven gustom dlakom i sive je boje. Cvat je grozdast, uzak, nalik cilindru i na njemu su smješteni ljubičasti cvjetovi. Čaška se sastoji od 5 lapova i podijeljena je na dvije usne. Vjenčić je tamnoljubičaste boje, sastoji se od pet zubaca koji daju privid jedne usne (Slika 4.). Plod su 4 duguljasta oraščića.

Stanište vrste *T. hyrcanicum* je na području Kavkaza, Turske i Irana na nadmorskoj visini od 700 do 1800 m. Ugrožena je vrsta (www.mnp.am).



Slika 4. *Teucrium hyrcanicum* L.

(www.zauberstaude.de)

1.1.3.5 *Teucrium scorodonia* L.

Vrsta *T. scorodonia* (kaduljasti dubačac, lukovina, mali dubačac) je otporna vazdazelena trajnica. Naraste do visine od 30 do 60 cm. Stabljika je četverobridna, smeđa, prekrivena dlačicama i pri dnu drvenasta. Listovi su pri dnu srcoliki, mekani, narovašeni i blijedozeleni. Cvjetovi su žućkastozeleni, neugledni i rastu u do 15 cm dugom cvatu. Čaška je prekrivena dlakama, kao i sam vjenčić, i ima četiri prašnika s ljubičastim prašničkim nitima. Plod je suh. Period cvatnje je od srpnja do rujna (Domac, 2002).

Ova vrsta raste na šljunkovitom terenu, u suhim i sjenovitim šumama. Pogoduje joj umjerena klima. Najviše je rasprostranjena u Ujedinjenom Kraljevstvu te rjeđe u Australiji i Novom Zelandu (Houdret, 2002).



Slika 5. *Teucrium scorodonia* L.

(keyserver.lucidcentral.org)

1.2 KEMIJSKI SASTAV

Provedena su brojna kvalitativna i kvantitativna ispitivanja djelatnih tvari roda *Teucrium*.

1.2.1 Gorke tvari

U ovu skupinu tvari ubrajaju se spojevi raznolike i nejedinstvene strukture. Okus im je gorak, potiču izlučivanje sline, žuči i želučane kiseline, time potiču probavu, stimuliraju tek i djeluju kao tonici. Najčešće gorke tvari su terpenoidi, heterozidi i spojevi s laktonskom skupinom. Dijele se prema strukturi na terpenoidne i neterpenoidne gorke tvari. Postoji pet skupina gorkih tvari:

Amara pura – čiste gorke tvari

Amara aromatica – gorke tvari s eteričnim uljem

Amara mucilaginosa – gorke tvari sa sluzima

Amara salina – gorke tvari s anorganskim solima

Amara alkaloida – gorke tvari s alkaloidima (www.pharma.hr; Jurišić, 1998).

1.2.2 Eterična ulja

Vrste roda *Teucrium* su vrlo aromatične biljne vrste zbog sadržaja eteričnog ulja koji im daje ljekovita svojstva. Eterična ulja su lako hlapljive tekuće smjese više spojeva. Većinom su to terpeni (90 %), fenilpropani, spojevi s dušikom i dr. (Jurišić, 1998).

Sadržaj eteričnog ulja u vrstama roda *Teucrium* varira od 0,07 do 1,30 % (Arnold i sur.; 1991).

Eterično ulje vrste *T. botrys* sadrži beta-kariofilen (20,4 %), alfa-humulen (13,9 %) i (E)-beta-farnezen (17,7 %). Sadržaj je ispitivan GC i GC/MS analizom (Kovačević i sur., 2001).

Eterično ulje vrste *T. chamaedrys* sadrži beta-kariofilen (26,9 %) i germakren (22,8 %) (Kovačević i sur., 2001).

U eteričnom ulju vrste *T. arduini* L. GC i GC/MS analizom je utvrđena količina seskviterpenskih ugljikovodika od 70,4 %. Od toga je beta-kariofilen činio 35,2 % i germakren D 18,7 % (Kremer i sur., 2013).

Većinu sastava eteričnog ulja vrste *T. hyrcanicum* čini (E)-ß-farnezen. Korištena je GC i GC/MS analiza (Morteza-Semnani i sur., 2011).

Analizom eteričnog ulja vrste *T. scorodonia* subsp. *scorodonia* kombiniranom kapilarnom GC-RI i GC/MS analizom utvrđen je sadržaj seskviterpena od 75,6-82,9 % i oksigeniranih seskviterpena od 3,1-8,9 % (Djabou i sur., 2012). Identificirani su germakren (26,2 %) i *p*-kariofilen (25,2 %) GC i GC-MS analizom (Maccioni, 2007).

1.2.3 Steroli

Steroli su organski, steroidni spojevi koji se javljaju uz masti ili su dio strukture voskova. Nalaze se u biljnim i životinjskim organizmima. U biljnim organizmima su najčešći i najvažniji sitosteroli, a smjesa su ß-sitosterola i nekih zasićenih sterola. Djeluju hiperkolesterolemički, tj. ometaju apsorpciju kolesterola iz probavnog trakta (Jurišić, 1998).

Postupkom tankoslojne kromatografije utvrđena je prisutnost ß-sitosterola i stigmasterola u vrstama *T. botrys, T. chamaedrys, T. montanum, T. polium i T. scordium* (Pavlović i sur., 1983).

1.2.4 Saponini

Saponini su vrlo rasprostranjena skupina spojeva heterozidne strukture. Ime im potječe od velike sposobnosti pjenjenja. U biljkama dolaze u obliku složenih i teško topljivih otopina u udjelu od 0,1-30 %. Saponini su dokazani u vrstama *T. botrys, T. chamaedrys i T. scordium* (Jurišić, 1998).

1.3 **BIOLOŠKI UČINCI I UPOTREBA**

Vrste roda *Teucrium* imaju dugu tradiciju u narodnoj medicini kao kolagogi, diuretici, spazmolitici, antipiretici, stimulansi, karminativi, anthelmintici, antiseptici, protuupalna sredstva, antireumatici i antidijabetici.

Ekstrakti s acetonom i metanolom listova i cvjetova vrste *T. botrys* pokazuju antioksidativno djelovanje gdje su klorogenska kiselina i esktrakt vrste *Ginkgo biloba* L. služili za usporedbu (Stanković i sur., 2014).

Etanolni ekstrakt vrste *T. chamaedrys* pokazuje antioksidativno i antimikrobno djelovanje. Antimikrobno djelovanje je ispitivano disk difuzijskom metodom dok je antioksidativno djelovanje ispitivano DPPH metodom, TEAC metodom, HAPX metodom i EPR metodom (Vlase i sur., 2014). Također je uočena i zabilježena prolazna hepatotoksičnost (Gori i sur., 2011).

Metanolni ekstrakt vrste *T. montbretii* Bentham subsp. *pamphylicum* P.H. Davis pokazuje antioksidativnu aktivnost od 191,5 mg/g fosfomolibdenskom metodom. Također je ispitivana antibakterijska aktivnost u volumnom odjelu od 1 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 % i 10 % metodom difuzije na agaru. Uzorci s 1 % i 2,5 % udjela nisu pokazali učinkovitost. Vrsta *Listeria monocytogenes* je bila najviše podložna antibiotskom učinku, dok je vrsta *Salmonella typhi* pokazala najveću rezistentnost (Ozkan i sur., 2007).

Eterično ulje vrste *T. hyrcanicum* pokazuje antimikrobnu aktivnost prema bakterijama *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* i *Pseudomonas aeruginos* te gljivici *Aspergillus niger,* dok na bakterije *Escherichia coli* i gljivicu *Candida albicans* nije djelovalo (Morteza-Semnani i sur., 2011).

Vrsta *T. halacsyanum* je slabo opisana i potrebno je provesti dodatna istraživanja.

1.4 POLIFENOLI

1.4.1 Uvod

Polifenoli su skupina spojeva koji sudjeluju u više metaboličkih funkcija biljaka kao što je npr. obrana od nametnika, signalizacija dozrijevanja plodova, zaštita od zračenja (UV i ionizirajućeg) itd. Prehranom čovjek unosi polifenole većinom kroz voće, povrće te neke vrste čaja. Pokazuju snažno antioksidativno, protuupalno, antialergijsko i antikancerogeno djelovanje. Štite krvne žile, srce, imunološki sustav i pretpostavlja se da bi mogli ublažiti teškoće starenja (Jakobek i sur., 2008).

1.4.2 Podjela i kemijska struktura polifenola

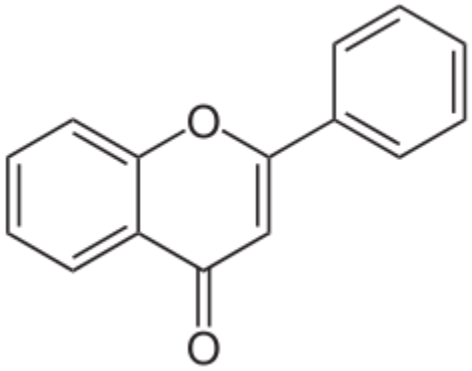
Struktura polifenola je jednostavna, a u nju spadaju aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Polifenoli su fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Fenolne kiseline su sekundarni biljni metaboliti opće formule C6-C1 ili C3-C1. C6-C1 su derivati benzojeve kiseline, dok su C3-C1 derivati cimetne kiseline. U staničjima biljaka se nalaze u obliku estera ili u slobodnom obliku. Biosinteza dijeli isti put s drugim fenilpropanima, a nastaju iz razgradnih produkata ugljikohidrata. Njihov sadržaj se određuje tankoslojnom kromatografijom visoke razlučivosti, spektrofotometrijom ili denzitometrijom. Značajno im je antioksidativno djelovanje (Steinegger i Hänsel, 1998).

Stilbeni su polifenoli bez osnovne strukture flavonoida. Funkcionalna skupina je 1,2-difenileten, s resveratolom kao najvažnijim spojem skupine (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Flavonoidi su polifenoli, derivati benzopirana čija su rasprostranjenost i raznolikost velike. S obzirom da su neki flavonoidi žute boje, ime im potječe od lat. *flavus* = žut.

Osnovna struktura im je C6-C3-C6, tj. dva aromatska prstena su vezana propanskim lancem koji s kisikom tvore heterocikl (Slika 6.) (Maleš, 1995).



Slika 6. Osnovna struktura flavonoida (upload.wikimedia.org)

U prirodi se najčešće pojavljuju kao C3 ili C7 heterozidi. Raznolikost strukture se karakterizira različitim stupnjevima oksidacije heterocikličkog prstena B, vrstom, brojem i poretkom supstituenata na prstenima A i C te vrstom, brojem i položajem šećera na aglikonskoj komponenti. Najzastupljeniji šećeri su d-glukoza, d-galaktoza, l-ramnoza i dr.

Postoje O-glikozidi i C-glikozidi gdje je C-C veza između aglikona i glikona puno čvršća od O-veze (Steinegger i Hänsel, 1992).

Velike količine polifenola su pronađene kod vrsta *T. montanum* (13,68 %) i *T. polium* (10,80 %), dok vrsta *T. arduini* sadrži manju količinu (6,40 %) (Jurišić Grubešić i sur., 2012).

1.5 **TRJESLOVINE**

1.5.1 Kemijski sastav trjeslovina

Trjeslovine su derivati fenola i fenolnih kiselina. Kada se govori o trjeslovinama tj. taninima, ne govori se o jednom spoju nego o cijeloj skupini različitih spojeva koje povezuju zajednička fizikalna i kemijska svojstva. Trjeslovine spadaju u skupinu najrasprostranjenijih sekundarnih biljnih metabolita. Prisutne su u svim porodicama kritosjemenjača osim porodica Brassicaceae i Papaveraceae. Dijelovi biljke s najvećom koncentracijom trijeslovina su kora stabljike i korijena, listovi, srčikine zrake i perikarp plodova (Jurišić, 1998).

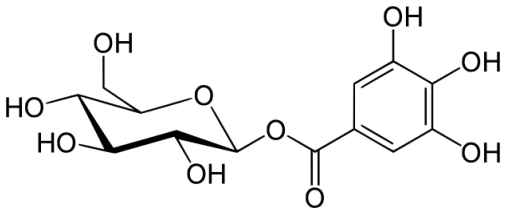
Strukturno se mogu podijeliti na:

1) trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini i elagnatanini)
2) kondenzirane trjeslovine (katehinske trjeslovine)

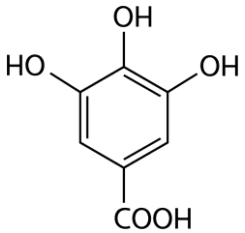
Trjeslovine koje hidroliziraju se dijele na dvije podskupine: tanine i depside.

Tanini podrazumijevaju estere galne kiseline (Slika 8.), ili esterske anhidride više galnih kiselina (Slika 9. i Slika 10.), često galoilgalne kiseline i šećera. Najjednostavniji predstavnik je 1-galoil-ß-glukoza ili glukogalin (Slika 7.).

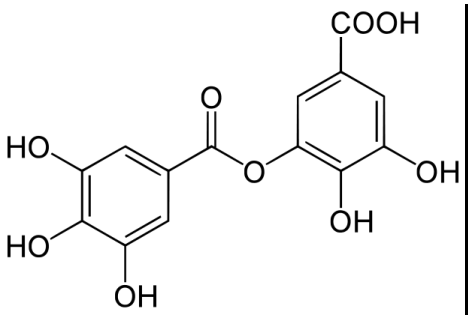
Depsidi su esterski vezane fenilkarboksilne kiseline. Mogu se javljati samostalno u drogi, dok su češće komponenta galotaninskih trjeslovina.



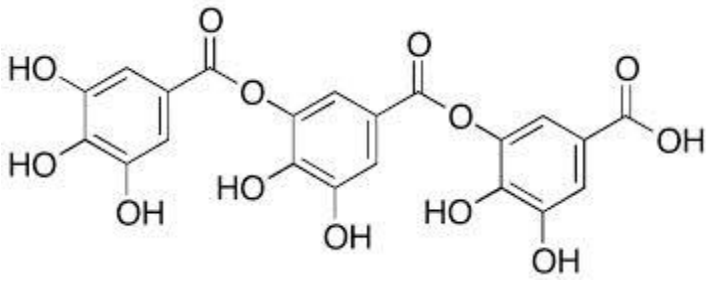
Slika 7. 1-galoil-ß-glukoza (upload.wikimedia.org)



Slika 8. galna kiselina (upload.wikimedia.org)



Slika 9. *m*-digalna kiselina
(upload.wikimedia.org)



Slika 10. *m*-trigalna kiselina
(www.trc-canada.com)

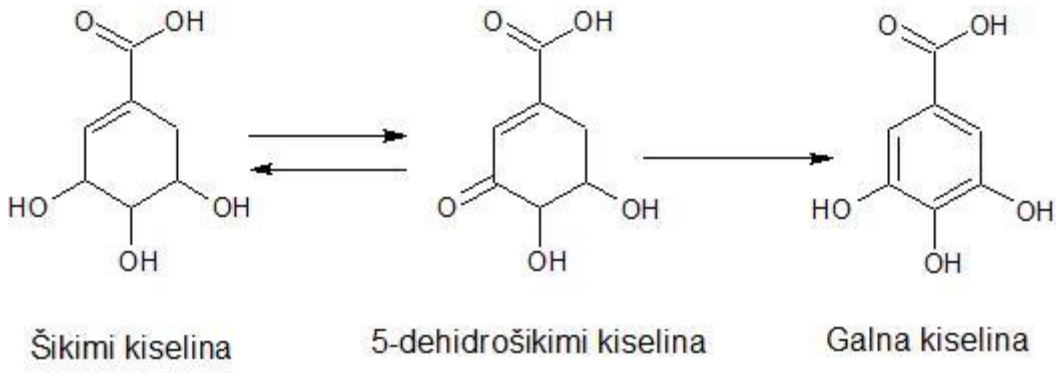
Kondenzirane, tj. katehinske trjeslovine se dijele na oligomerne i polimerne proantocijanidine. Nastaju kondenzacijom dva ili više katehina, flavonoida, leukoantocijanidina, kavene i ferula kiseline u slabo kiselom mediju staničnog soka. Kondenzacija se odvija uz pomoć enzima, ali može ići i neenzimskim putem. Tijekom sušenja ili skladištenja biljnog materijala nastaju flobafeni ili trjeslovinsko crvenilo iz monomernih flavanola i oligomernih proantocijanidina. To su amorfni pigmenti sastavljeni od velikog broja molekula crvene ili smeđe boje. Također su poznati kao katehinsko crvenilo (Kuštrak, 2005; Jurišić, 1998).

1.5.2 Biosinteza trjeslovina

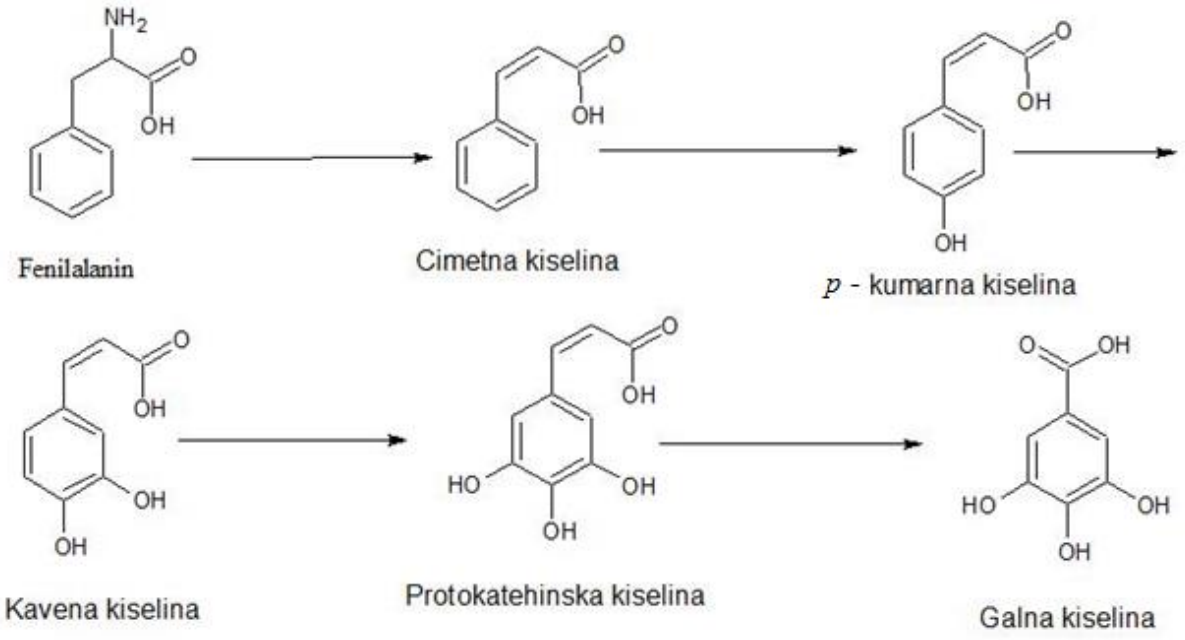
Trjeslovine nastaju polimerizacijom jednostavnijih spojeva, ali točna biosinteza nije u potpunosti razjašnjena.

Poznata je sinteza galne kiseline koja može ići u dva smjera. Jedan put ide iz šikimi kiseline preko 5-dehidrošikimi kiseline dehidrogenacijom (Slika 11.) dok drugi put uključuje ß-oksidaciju raznih fenilpropanskih prethodnika (Slika 12.).

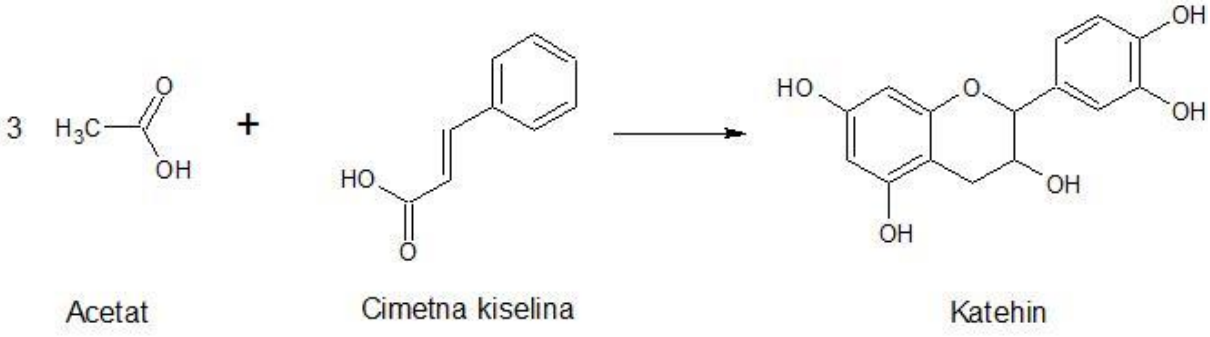
Sinteza katehina, derivata flavan-3-ola, se odvija fenilpropanskim putem (Slika 13.) (Tyler i sur., 1976).



Slika 11. Biosinteza galne kiseline iz šikimi kiseline



Slika 12. Biosinteza galne kiseline iz fenilalanina



Slika 13. Biosinteza katehina

1.5.3 Metode analize trjeslovina

Trjeslovine se dokazuju na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava. Fenolne skupine su ključne za reakcije koje većinom nisu specifične. Najstariji reagens je 0,5 %-tna otopina želatine koja s trjeslovinama daje zamućenje ili talog, ovisno o koncentraciji. Optimalni pH za taloženje je između 3,5 i 4,5. Mnogi alkaloidi reagiraju sa želatinom kao što su brucin, strihnin, kinin i cinhonin.

Češće se upotrebljavaju feri-soli koje spadaju pod reakcije obojenja. Galotanini daju plavu ili crnu boju, dok katehinske trjeslovine daju zelenu boju otopine koja dodatkom natrij-acetata prelazi u ljubičastu. Reakcija nije specifična, jer ovisi o reakciji s fenolima, nego služi za određivanje vrste trjeslovina. Istu reakciju koja se koristi u dokazivanju galotanina daju vanilin, morfin i neke druge tvari.

Katehinske trjeslovine i trjeslovine koje hidroliziraju se odjeljuju taložnom reakcijom s formaldehidom i kloridnom kiselinom gdje se katehinske trjeslovine istalože, a trjeslovine koje hidroliziraju ostaju otopljene. Također se za odjeljivanje mogu koristiti olovo-acetat, bromna voda i amonij-sulfat.

Kromatografske metode postaju sve važnije u određivanju trjeslovina. Prednost im je što se mogu koristiti za identifikaciju trjeslovina u galenskim pripravcima i što se može pratiti hidroliza i ostale kemijske promjene tijekom skladištenja.

Kemijski sastav trjeslovina je raznolik i velikim dijelom još uvijek nepoznat i ti spojevi su iznimno osjetljivi na reagense. Također je problem što ne postoji apsolutno pouzdana metoda određivanja. Neke od metoda određivanja trjeslovina su:

1. Taloženje solima teških metala
2. Kolorimetrijska metoda
3. Biološka metoda s glistama (Enchytraeus albidus)
4. Aglutinacijska metoda s eritrocitima
5. Taloženje kazeinom
6. Metoda kožnog praška (Eitnerova metoda, gravimetrijska i fotometrijska)
7. Titrimetrijska metoda s kalijevim permanganatom (Jurišić, 1998; Petričić, 1983).

1.5.4 Raprostranjenost trjeslovina

Trjeslovine su najčešći sekundarni metaboliti kod biljaka no ne nalaze se u svim dijelovima biljke. Najveći udio trjeslovina sadrže šiške ili Gallae i nešto manje kora stabljike. Veće količine trjeslovina se nalaze u mlađim izdancima biljaka (Petričić, 1983).

Droge koje sadrže kondenzirane trjeslovine su korijen ratanije (*Ratanhiae radix*) i zelen turice (*Agrimoniae herba*). Droge s galotaninima su turske (*Gallae asiaticae*) i kineske šišarke (*Gallae sinensis*). Droge koje sadrže i galotanine i kondenzirane trjeslovine su kora hrasta (*Quercus cortex*) i zelen gospine trave (*Hyperici herba*) (Kuštrak, 2005; Wagner, 1982).

1.5.5 Upotreba i djelovanje trjeslovina

Trjeslovine djeluju na način da stvaraju koagulacijsku membranu na sluznici i vezivnom tkivu te tako stežu tkivo. Vežu se na proteine ili slabim, reverzibilnim vezama (vodikove i ionske) ili jakim, ireverzibilnim vezama (kovalentno vezanje). Također djeluju protuupalno, slabo anestetski, antisekretorno, isušuju kožu i rane, smanjuju iritaciju i djeluju baktericidno. Koristile su se kod rana, opeklina, ozeblina, krvarenja, hemeroida, upala usne sluznice i ždrijela, interno kod enteritisa i gastritisa. Najvažnija im je primjena kao antidijaroik te zbog svojstva taloženja teških metala i alkaloida kao antidot uz emetike i purgative. Danas se odustalo od korištenja trjeslovina kod opeklina zbog iritacije kože pod utjecajem velike koncentracije trjeslovina (Petričić, 1983; Wagner, 1982).

1.5.6 Trjeslovine u vrstama roda *Teucrium*

Prema podacima dostupnim u literaturi, trjeslovine su prisutne u vrstama *T. arduini*, *T. botrys, T. chamaedrys, T. flavum, T. montanum, T. polium*, i *T. scordium* subsp. *scordioides*. Najveću količinu trjeslovina sadrži vrsta *T. montanum* (3,48 %), dok vrsta *T. botrys* (1,00 %) sadrži najmanju količinu (Jurišić, 1998).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Biljni pripravci imaju važno mjesto u liječenju raznih oboljenja. To dokazuje sve veća popularnost i korištenje biljnih pripravaka. Prema podacima WHO-a, 80% država Azije i Afrike koristi biljne pripravke u primarnoj zdravstvenoj skrbi, također i razvijene države s dugom tradicijom fitoterapije, kao što je Njemačka, koriste biljne magistralne pripravke za razne jednostavnije i ozbiljnije bolesti.

Vrste roda *Teucrium* se tradicionalno koriste u narodnoj medicini tisućljećima kao antipiretici, dijaforetici, antiinflamatorici, diuretici, kod kardiovaskularnih bolesti, spazmolitici, antidijabetici i ekspektoransi. Smatra se da većina djelovanja potječe od eteričnog ulja i flavonoida koji imaju snažno antioksidativno djelovanje, dok trjeslovine pridonose djelujući primarno adstringentno i protuupalno.

Svrha ovog rada bila je kvantitativna analiza ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u uzorcima osušenih i usitnjenih nadzemnih dijelova pet vrsta roda *Teucrium*: *T. botrys, T. chamaedrys, T. halacsyanum, T. hyrcanicum* i *T. scorodonia.* Određivanje polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina provedeno je spektrofotometrijskom metodom.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 BILJNI MATERIJAL

U praktičnom dijelu rada korišteni su osušeni i usitnjeni nadzemni dijelovi pet vrsta roda *Teucrium* uzgojenih i skupljenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u srpnju 2012. i 2013., tijekom perioda cvatnje. Analiza je učinjena na vrstama *T. botrys*, *T. chamaedrys*, *T. halacsyanum*, *T. hyrcanicum* i *T. scorodonia*. Jedan uzorak vrste T. *scorodonia* je skupljen u srpnju 2012., a dva u srpnju 2013., ali na različitim lokacijama – uz klijalište i živicu. Po jedan uzorak od ostalih vrsta je skupljen u srpnju 2012. i u srpnju 2013.

3.2 **APARATI I PRIBOR**

Sadržaj ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina je određivan spektrofotometrijski uz pomoć UV/VIS spektrofotometra Varian Cary 50 Bio (proizvod tvrtke Varian Inc. SAD) Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Slika 14.).



Slika 14. UV/VIS spektrofotometar Varian Cary 50 Bio

Za određivanje je upotrijebljen sljedeći pribor i kemikalije:

- Erlenmeyerova tikvica od 300 mL s ubrušenim grlom
- menzure
- čaše od 100 mL i 500 mL
- filtar papir i lijevak
- vodena kupelj i povratno hladilo
- okrugla tikvica od 300 mL
- odmjerne tikvice od 25,0 mL
- odmjerne tikvice od 20,0 mL
- tikvica od 100 mL
- magnetska mješalica
- kapaljka
- pipete i propipete
- odmjerne tikvice od 250,0 mL
- kožni prašak
- 38%-tna otopina natrij karbonata (38 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ je otopljeno u 62 g vruće vode)
- volfram-fosforna kiselina (10 g natrij-volgramata je pomiješano s 8 mL koncentrirane fosforne kiseline i 75 mL vode te zagrijavano 3 sata na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Ohlađena otopina je nadopunjena vodom do 100,0 mL) (Slika 15.).



Slika 15. Priprema volfram-fosforne kiseline

3.3 METODE ISTRAŽIVANJA

3.3.1 Identifikacija biljnog materijala

Identitet ispitivanih vrsta je potvrđen ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka (Domac, 2002; www.mnp.am)

3.3.2 Određivanje količine ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina

Sadržaj trjeslovina u uzorcima vrsta roda *Teucrium* je određivan kombinacijom kolorimetrijske metode i metode kožnog praška. Kožni prašak je korišten za taloženje i odjeljivanje trjeslovina od ostalih fenolnih spojeva (Ph. Eur. 2004; Arbeitsvorschriften für die Pharmakognostischen Übungen II, 1993).

Priprema ekstrakta: U Erlenmeyerovoj tikvici od 300 mL se 0,75 g usitnjenog biljnog materijala ekstrahiralo sa 150 mL vode na vodenoj kupelji uz povratno hladilo tijekom 30 minuta (Slika 16.). U ohlađeni ekstrakt je dodano 100 mL vode, lagano promiješano i ostavljeno stajati (Slika 17.). Nakon filtriranja se prvih 50 mL filtrata bacilo, a ostatak je sačuvan za daljnja ispitivanja.



Slika 16. Priprema ekstrakta



Slika 17. Ekstrakt vrste *T. botrys*

Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih sastavnica: U odmjernu tikvicu od 25,0 mL stavljeno je 5 mL filtrata i nadopunjeno vodom do oznake. U 2 mL ove otopine dodano je 1 mL volfram-fosforne kiseline i 17 mL 38 %-tne vodene otopine natrij-karbonata. Postupak je ponovljen još jednom. Nakon točno dvije minute izmjerena je apsorbancije otopina na 750 nm u odnosu na čistu vodu (A1). Mjerenje je ponovljeno tri puta, a rezultat izražen kao srednja vrijednost.

Određivanje sadržaja fenolnih sastavnica koje se nisu vezale za kožni prašak: U 10 mL filtrata je dodano 0,10 g kožnog praška te mješano 60 minuta na magnetskoj mješalici. Zatim je profiltrirano, 5 mL filtrata stavljeno je u odmjernu tikvicu od 25,0 mL i nadopunjeno vodom do oznake. U 2 mL ove otopine dodano je 1 mL volfram-fosforne kiseline i 17 mL 38%-tne vodene otopine natrij-karbonata. Postupak je ponovljen još jednom. Nakon točno dvije minute izmjerena je apsorbancija otopina na 750 nm u odnosu na čistu vodu (A2). Mjerenje je ponovljeno tri puta, a rezultat izražen kao srednja vrijednost.

Sadržaj ukupnih polifenola je izračunat prema sljedećem izrazu:

$$\textbf{\% ukupnih polifenola} = \frac{13{,}125 \text{ x } A1}{b \text{ x } A3}$$

Ukupan sadržaj netaninskih polifenola (fenolne sastavnice koje se nisu vezale za kožni prašak) izračunat je prema sljedećem izrazu:

$$\textbf{\% netaninskih polifenola} = \frac{13{,}125 \text{ x } A2}{b \text{ x } A3}$$

Ukupan sadržaj trjeslovina (razlika sadržaja ukupnih polifenola i netaninskih polifenola) izračunat je prema sljedećem izrazu:

$$\textbf{\% trjeslovina} = \frac{13{,}125 \text{ x } (A1 - A2)}{b \; x \; A3}$$

A1 = apsorbancija ukupnih polifenola

A2 = apsorbancija netaninskih polifenola

A3 = 0,519 (apsorbancija poredbene otopine pirogalola)

b = masa biljnog materijala (g)

Količina ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u svim se uzorcima odredila tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

3.3.3 Računalni programi

Statistička obrada podataka (Studentov *t*-test) provedena je pomoću programa GraphPad QuickCalcs (www.graphpad.com).

Strukture spojeva su crtane pomoću programa ACD Labs/ChemSketch (www.acdlabs.com).

4 REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati istraživanja prikazani su tablicama i grafičkim prikazima te je učinjena statistička obrada podataka (Studentov *t*-test).

4.1 KVANTITATIVNA ANALIZA UKUPNIH POLIFENOLA, NETANINSKIH POLIFENOLA I TRJESLOVINA

U tablicama 1. – 3. prikazana je količina ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina obrađenih u ovom radu.

Tablica 1. Količina (%)[a] ukupnih polifenola u istraživanim uzorcima

Uzorak	Vrsta	Godina skupljanja	% ukupnih polifenola
1	*Teucrium botrys* L.	2012.	**0,87 ± 0,035**[1,2,3,4,5,6,7,8,9]
2	*Teucrium botrys* L.	2013.	1,68 ± 0,042[10,11,12,13,14,15,16,17,18]
3	*Teucrium chamaedrys* L.	2012.	3,13 ± 0,014[1,10,19,20,21,22,23,24,25,26]
4	*Teucrium chamaedrys* L.	2013.	3,53 ± 0,191[2,11,19,27,28,29,30,31,32,33]
5	*Teucrium halacsyanum* Heldr.	2012.	2,20 ± 0,106[3,12,20,27,34,35,36,37,38]
6	*Teucrium halacsyanum* Heldr.	2013.	4,01 ± 0,134[4,13,21,28,34,39,40,41,52]
7	*Teucrium hyrcanicum* L.	2012.	2,83 ± 0,120[5,14,22,29,35,39,42,43,44,45]
8	*Teucrium hyrcanicum* L.	2013.	2,11 ± 0,028[6,15,23,30,40,42,46,47,48]
9 k	*Teucrium scorodonia* L.	2012.	2,43 ± 0,014[7,16,24,31,36,41,43,46,47,49,50]
10 k	*Teucrium scorodonia* L.	2013.	1,83 ± 0,078[8,17,25,32,37,44,47,49,49,51,52]
11 ž	*Teucrium scorodonia* L.	2013.	**4,09 ± 0,148**[9,18,26,33,38,45,48,50,51]

a = $\bar{x}$ ± SD (n = 3), k = klijalište, ž = živica

Izračunata je značajna statistička razlika između uzoraka sa signifikantnošću :

$p < 0{,}0001$ - [1, 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,16,17,18,20, 23,24,32,34,38,40,41,46,48,50,51,52], $p < 0{,}0002$ [12,30,49], $p < 0{,}0003$ [21,39,44,45],

$p < 0{,}0005$ [26,27,42], $p < 0{,}006$ [29,31], $p < 0{,}001$ [37], $p < 0{,}005$ [43,47], $p < 0{,}025$ [19,22,28,33,35,36], $p < 0{,}05$ [17]

Tablica 2. Količina (%)[a] netaninskih polifenola u istraživanim uzorcima

Uzorak	Vrsta	Godina skupljanja	% netaninskih polifenola
1	*Teucrium botrys* L.	2012.	**0,83 ± 0,002**[1,2,3,4,5,6,7,8,9,10]
2	*Teucrium botrys* L.	2013.	1,15 ± 0,005[1,11,12,13,14,15,16,17]
3	*Teucrium chamaedrys* L.	2012.	3,02 ± 0,057[2,11,18,19,20,21,22,23]
4	*Teucrium chamaedrys* L.	2013.	**3,36 ± 0,233**[3,12,24,25,26,27,28,29]
5	*Teucrium halacsyanum* Heldr.	2012.	1,14 ± 0,014[4,18,24,30,31,32,33,34]
6	*Teucrium halacsyanum* Heldr.	2013.	3,02 ± 0,177[5,13,30,35,36,37,38]
7	*Teucrium hyrcanicum* L.	2012.	2,22 ± 0,085[6,14,19,25,31,35,39,40,41]
8	*Teucrium hyrcanicum* L.	2013.	1,60 ± 0,028[7,15,20,26,32,36,39,42,43]
9 k	*Teucrium scorodonia* L.	2012.	2,24 ± 0,071[8,16,21,27,33,37,42,44,45]
10 k	*Teucrium scorodonia* L.	2013.	1,47 ± 0,233[9,22,28,38,40,44,46]
11 ž	*Teucrium scorodonia* L.	2013.	2,69 ± 0,106[10,17,23,29,34,41,43,45,46]

a = $\bar{x}$ ± SD (n = 3), k = klijalište, ž = živica

Izračunata je značajna statistička razlika između uzoraka sa signifikantnošću :

$p < 0{,}0001$[1,2,3,4,5,6,7,8, ,11,12,13,14,15,16,17,18,20,21,30,31,32,33,34,42,43,44, 47] , $p < 0{,}0002$ [19,26,36] , $p < 0{,}0003$[40] , $p < 0{,}0005$ [22], $p < 0{,}006$ [45] , $p < 0{,}001$[9,23,28,38] , $p < 0{,}002$[25,27], $p < 0{,}005$ [35,37,10,46] , $p < 0{,}007$[41], $p < 0.025$ [29]

Tablica 3. Količina (%)[a] trjeslovina u istraživanim uzorcima

Uzorak	Vrsta	Godina skupljanja	% trjeslovina
1	*Teucrium botrys* L.	2012.	**0,04 ± 0,025**[1,2,3,4,5,6,7,8,9,10]
2	*Teucrium botrys* L.	2013.	0,53 ± 0,025[1,11,12,13,14,15,16,17]
3	*Teucrium chamaedrys* L.	2012.	0,11 ± 0,030[2,11,18,19,20,21,22,23,]
4	*Teucrium chamaedrys* L.	2013.	0,17 ± 0,035[3,12,24,25,26,27,28]
5	*Teucrium halacsyanum* Heldr.	2012.	1,06 ± 0,090[4,13,18,24,29,30,31,32,32]
6	*Teucrium halacsyanum* Heldr.	2013.	0,99 ± 0,030[5,14,19,25,33,34,35,36,37]
7	*Teucrium hyrcanicum* L.	2012.	0,61 ± 0,025[6,15,20,26,29,33,38,39,40,41]
8	*Teucrium hyrcanicum* L.	2013.	0,51 ± 0,001[7,21,27,30,34,38,42,43]
9 k	*Teucrium scorodonia* L.	2012.	0,19 ± 0,040[8,16,31,35,39,42,44]
10 k	*Teucrium scorodonia* L.	2013.	0,36 ± 0,110[9,22,32,36,40]
11 ž	*Teucrium scorodonia* L.	2013.	**1,40 ± 0,180**[10,17,23,28,37,41,43,44]

a = $\bar{x}$ ± SD (n = 3), k = klijalište, ž = živica

Izračunata je značajna statistička razlika između uzoraka sa signifikantnošću :

$p < 0,0001$ [1,4,5,6,7,9,11,12,14,17,18, 19,20,24,25,32,34,35,36,40], $p < 0,0002$ [16,43], $p < 0,0003$ [23,28,45], $p < 0,0005$[31], $p < 0,006$[8], $p < 0,001$[33,37,44], $p < 0,002$[17,30,42], $p < 0,005$ [39], $p < 0,007$[3,13], $p < 0,01$[9], $p < 0,025$ [15,22,38,41]

UKUPNI POLIFENOLI

Sadržaj ukupnih polifenola se kretao od 0,87 do 4,09 %. Od uzoraka iz 2012. , najveću količinu je imala vrsta *T. chamaedrys* (3,13 %), a najmanju količinu je imala vrsta *T. botrys* (0,87 %) što je i ujedno najmanja količina ukupnih polifenola. Od uzoraka iz 2013., najveću količinu je imala vrsta *T. scorodonia* - živica (4,09 %) što je ujedno i najveća izmjerena vrijednost, a najmanju količinu je imala vrsta *T. botrys* (1,68 %).

Studentovim t-testom utvrđene su statistički značajne razlike s visokom signifikantnošću ($p < 0,0001$, $p < 0,0002$, $p < 0,0003$, $p < 0,0005$, $p < 0,006$, $p < 0,001$, $p < 0,005$, $p < 0,025$, $p < 0,05$) u količini ukupnih polifenola između uzoraka pojedine vrste skupljenih 2012. i 2013. godine. Značajne razlike nisu pronađene kod vrsta *T. botrys* skupljene 2012. i *T. botrys* skupljene 2013., *T. halacsyanum* skupljene 2012. i *T. hyrcanicum* skupljene 2013. te *T. halacsyanum* skupljene 2013. i *T. scorodonia* - živica.

NETANINSKI POLIFENOLI

Sadržaj netaninskih polifenola se kretao od 0,83 do 3,36 %. Od uzoraka iz 2012., najveću količinu je imala vrsta *T. chamaedrys* (3,02 %), a najmanju količinu je imala vrsta *T. botrys* (0,83 %) što je i ujedno najmanja količina netaninskih polifenola. Od uzoraka iz 2013., najveću količinu je imala vrsta *T. chamaedrys* (3,36 %) što je ujedno i najveća izmjerena vrijednost, a najmanju količinu je imala vrsta *T. botrys* (1,15 %).

Studentovim *t*-testom utvrđene su statistički značajne razlike s visokom signifikantnošću ($p < 0,0001$, $p < 0,0002$, $p < 0,0003$, $p < 0,0005$, $p < 0,006$, $p < 0,001$, $p < 0,002$, $p < 0,005$, $p < 0,007$, $p < 0,025$) u količini netaninskih polifenola između uzoraka pojedine vrste skupljenih 2012. i 2013. godine. Značajne razlike nisu pronađene kod vrsta *T. botrys* skupljene 2013. i *T. scorodonia* – klijalište skupljene 2013., *T. chamaedrys* skupljene 2012. i *T. chamaedrys* skupljene 2013., *T. chamaedrys* skupljene 2012. i *T. halacsyanum* skupljene 2013., te *T. halacsyanum* skupljene 2013. i *T. chamaedrys* skupljene 2013., *T. halacsyanum* skupljene 2012. i *T. scorodonia* - klijalište skupljene 2013. te *T. halacsyanum* skupljene 2013. i *T. scorodonia* - živica.

TRJESLOVINE

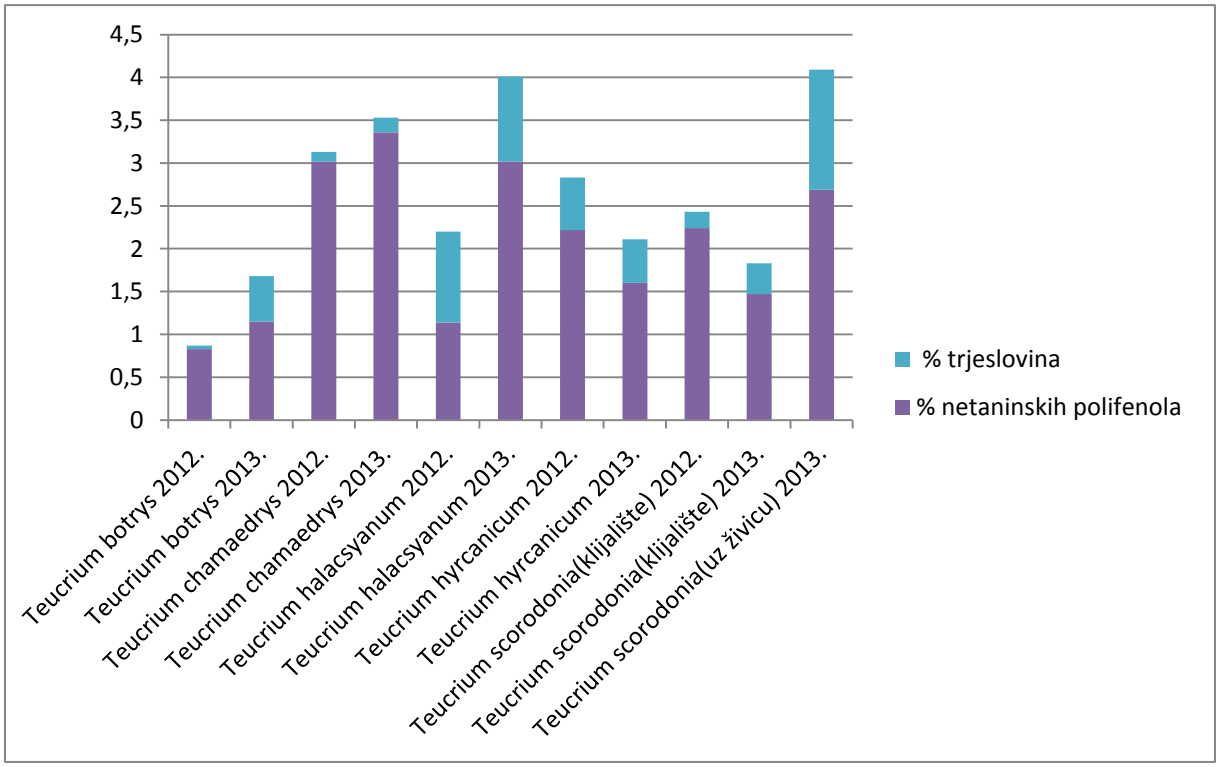
Sadržaj trjeslovina se kretao od 0,04 do 1,40 %. Od uzoraka iz 2012., najveću količinu je imala vrsta *T. halacsyanum* (1,06 %), a najmanju količinu je imala vrsta *T. botrys* (0,04 %) što je i ujedno najmanja količina trjeslovina. Od uzoraka iz 2013., najveću količinu je imala vrsta *T. scorodonia* uz živicu (1,40 %) što je ujedno i najveća izmjerena vrijednost, a najmanju količinu je imala vrsta *T. chamaedrys* (0,17%).

Studentovim *t*-testom utvrđene su statistički značajne razlike s visokom signifikantnošću ($p < 0,0001$, $p < 0,0002$, $p < 0,0003$, $p < 0,0005$, $p < 0,006$, $p < 0,001$, $p < 0,002$, $p < 0,005$, $p < 0,007$, $p < 0,01$, $p < 0,025$) u količini trjeslovina između uzoraka pojedine vrste skupljenih 2012. i 2013. godine. Značajne razlike nisu pronađene kod vrsta *T. botrys* skupljene 2013. i *T. hyrcanicum* skupljene 2013., *T. botrys* skupljene 2013. i *T. scorodonia* - klijalište skupljene 2013., *T. chamaedrys* skupljene 2012. i *T. chamaedrys* skupljene 2013., *T. chamaedrys* skupljene 2012. i *T. scorodonia* - klijalište skupljene 2013., *T. chamaedrys* skupljene 2013. i *T. scorodonia* skupljene 2012., *T. chamaedrys* skupljene 2013. i *T. scorodonia* – klijalište skupljene 2013., *T. halacsyanum* skupljene 2012. i *T. halacsyanum* skupljene 2013., *T. halacsyanum* skupljene 2012. i *T. scorodonia* – živica, *T. hyrcanicum* skupljene 2013. i *T. scorodonia* - živica te *T. scorodonia* skupljene 2012. i *T. scorodonia* – klijalište skupljene 2013.

Količina trjeslovina je u svim uzorcima manja od količine netaninskih polifenola (Slika 18.).

4.2 RASPRAVA

Ljekovite biljke sadrže više različitih ljekovitih tvari od kojih su samo neke glavne sastavnice. O glavnim sastavnicama ovisi primjena i ljekovita svojstva. Biološki aktivne tvari ne nalaze se homogeno raspoređene u biljci nego su najčešće ukoncentrirane u određenim dijelovima biljke, a njihova koncentracija ovisi o stadiju razvoja biljke, klimatskim, pedološkim i ekološkim uvjetima te o stresu koji biljka trpi.



Slika 18. Grafički prikaz kvantitativne analize ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u uzorcima skupljenim 2012. i 2013. godine

5 ZAKLJUČCI

U ovom radu spektrofotometrijskom metodom određene su količine ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u osušenim i usitnjenim nadzemnim dijelovima pet vrsta roda *Teucrium* skupljenim 2012. i 2013. godine. Odjeljivanje netaninskih polifenola od trjeslovina provedeno je metodom kožnog praška. Apsorbancija je izmjerena u vodenom ekstraktu, a volfram-fosforna kiselina služio je kao reagens.

Količina ukupnih polifenola se kretala od 0,87 do 4,09 %. Najveća količina ukupnih polifenola unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,13 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,87 %). Najveća količina ukupnih polifenola unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. scorodonia* – živica (4,09 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (1,68 %).

Količina netaninskih polifenola je iznosila od 0,83 do 3,36 %. Najveća količina netaninskih polifenola unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,02 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,83 %). Najveća količina netaninskih polifenola unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,36 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (1,15 %).

Količina trjeslovina je iznosila od 0,04 do 1,40 %. Najveća količina trjeslovina unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. halacsyanum* (1,06 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,04 %). Najveća količina trjeslovina unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. scorodonia*-živica (1,40 %), a najmanja u uzorku vrste *T. chamaedrys* (0,17 %).

Statističkim testom su uspoređene količine ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u uzorcima istih vrsta skupljenih 2012. i 2013. godine te su međusobno uspoređene količine između uzoraka skupljenih unutar jedne godine. Potvrđene su različitosti u količinama ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina između većine uspoređenih uzoraka.

6 LITERATURA

ACD/ChemSketch Freeware, program za crtanje struktura molekula, 2012., http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/, pristupljeno 1. 12. 2014.

Arbeitsvorschriften für die Pharmakognostischen Übungen II, Institut für Pharmakognosie, Graz, Karl-Franzens-Universität; 1993., str. 39.

Arnold N, Bellomaria B, Valentini G, Rafaiani SM. Comparative-study on essential oil of some *Teucrium* species from Cyprus. *J Ethnopharmacol*, 1991, 35, 105-113.

Djabou N, Allali H, Battesti MJ, Tabti B, Costa J, Muselli A, Varesi L. Chemical and genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of Teucrium scorodonia L. *Phytochemistry*, 2012, 74, 123-132.

Domac R. Flora Hrvatske: Priručnik za određivanje bilja (II izdanje). Zagreb, Školska knjiga, 2002, str. 7-8., 286-290.

European Pharmacopoeia, Fifth Edition, Volume 2. Strasbourg, Council of Europe, 2004, str. 1990.

Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb, Školska knjiga, 2001, str. 570.

Gori L, Galluzzi P, Mascherini V, Gallo E, Lapi F, Menniti-Ippolito F, Raschetti R, Mugelli A, Vannacci A, Firenzuoli F. Two Contemporary Cases of Hepatitis Associated with Teucrium Chamaedrys L. Decoction Use. Case Reports and Review of Literature. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011, 109, 521-526.

GraphPad QuickCalcs, program za računanje t testa, 1984., http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?invalidNumbers=1&format=SD, pristupljeno 20. 12. 2014.

Houdret J. Ljekovito bilje-uzgoj i uporaba. Rijeka, Dušević & Kršovnik, 2002, str. 229.

Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidović-Kosanović M, Lukačević, I. Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode. *Pomol. Croat.* 2008, 14, 13-25.

Jurišić Grubešić R, Kremer D, Vladimir Knežević S, Vuković Rodriguez J. Analysis of polyphenols, phytosterols and bitter principles in *Teucrium* L. species. *Cent Eur J Biol*, 2012, 7, 542-550.

Jurišić R. Kemotaksonomska istraživanja vrsta roda *Teucrium*. Magistarski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 1998.

Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D, Jasprica N, Bogdanović S, Topić J. Flora jadranske obale i otoka. Zagreb, Školska knjiga, 2008, str. 398-399.

Kovačević, NN , Lakušić BS, Ristić MS, Composition of the essential oils of seven Teucrium species from Serbia and Montenegro, *J Essent Oil Res*, 2001, 13, 163-165.

Kremer D, Kosir IJ, Kosalec I, Koncic MZ, Potocnik T, Cerenak A, Bezic N, Srecec S, Dunkic V. Investigation of Chemical Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Teucrium arduini L. (Lamiaceae). *Curr Drug Targets*, 2013, 14, 1006-1014.

Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb, Poljoprivredni nakladni zavod, 1956, str. 440-442.

Kuštrak D. Farmakognozija – Fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005, str. 43-44., 447-451.

Maccioni S, Baldini R, Tebano M, Cioni PL, Flamini G. Essential oil of Teucrium scorodonia L. ssp scorodonia from Italy. *Food Chem*, 2007, 104, 1393-1395.

Maleš Ž. Strukturna karakterizacija izoliranih flavonoida drače - *Paliurus spina-christi* Mill. Doktorska disertacija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 1995.

Morfologija vrste *Teucrium hyrcanicum* L., 2010., http://mnp.am/red_book_fauna/eng/p352.html, pristupljeno 13. 11. 2014.

Morteza-Semnani, K , Saeedi, M , Akbarzadeh, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Teucrium hyrcanicum L., *J Essent Oil-Bear Pl*, 2011, 14, 770-775.

Ostali mono- i seskviterpeni, 2009., www.pharma.hr, pristupljeno 14. 11. 2014.

Ozkan G, Kulesan H, Celik S, Gokturk RS, Unal O. Screening of Turkish endemic Teucrium montbretii subsp pamphylicum extracts for antioxidant and antibacterial activities, *Food control*, 2007, 18, 509-512.

Pavlović S, Ivanić R, Savin K, Živanović P, Jančić R, Milinković D, Vujčić S. Eterično ulje, tanini i flavonoidi kod vrsta rodova rasprostranjenih u Jugoslaviji. *Arh Farm*, 1983, 33, 287-291.

Petričić J. Farmakognozija (Farmaceutska botanika) I. dio. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 1983, str. 182-193.

Polinum O. Flowers of Greece and the Balkans a field guide. Oxford, Oxford University Press Inc, 1980 str. 388-399.

Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind* 2009, 58, 121-128.

Slika 1-galoil-B-glukoze, 2010, http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Flavon.svg, pristupljeno 25. 11. 2014.

Slika *m*-digalne kiseline, 2010., http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b6/Digallic_acid.svg/620px-Digallic_acid.svg.png, pristupljeno 25. 11. 2014.

Slika flavona, 2008., http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Flavon.svg, pristupljeno 25. 11. 2014.

Slika galne kiseline, 2008., http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0d/Gallic_acid.svg, pristupljeno 25. 11. 2014.

Slika *m*-trigalne kiseline, 2012., http://www.trc-canada.com/detail.php?CatNum=T793760&CAS=2131-66-0&Chemical_Name=Trigallic%20Acid&Mol_Formula=C21H14O13&Synonym=3,4-Dihydroxy-5-[%283,4,5-trihydroxybenzoyl%29oxy]benzoic%20Acid%205-Carboxy-2,3-dihydroxyphenyl%20Ester;%20Gallic%20acid%203-Ester%20with%20Gallic%20Acid,%20Gallic%20Acid%203-Gallate%203-Gallate;%20m-Trigallic%20Acid;, pristupljeno 25. 11. 2014.

Stankovic MS, Jakovljevic D, Topuzovic, M, Zlatkovic, B. Antioxidant activity and contents of phenolics and flavonoids in the whole plant and plant parts of Teucrium botrys L. *Oxid Commun*, 2014, 37, 522-532.

Steinegger E, Hänsel R. Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie. Berlin, Springer – Verlag, 1998, str. 372-376, 411-413.

Steinegger E, Hänsel R. Pharmakognosie (V Auflage). Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, Springer-Verlag, 1992, str. 372, 390, 411.

Teucrium botrys, 2014., http://www.robsplants.com/plants/TeucrBotry, pristupljeno 12. 11. 2014.

Teucrium chamaedrys L., 2008., http://www.robsplants.com/plants/teucrchama, pristupljeno 12. 11. 2014.

Teucrium halacsyanum Heldr., 2014., http://greekflora.gr/el/flowers/2275/Teucrium-halacsyanum-Heldr-1879, pristupljeno 13. 11. 2014.

Teucrium hyrcanicum L., 2014., http://www.zauberstaude.de/Zauberstaude-p6241h74s99-Teucrium-hyrcanicum-.html, pristupljeno 14. 11. 2014.

Teucrium scorodonia L., 2011., http://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/080c0106-040c-4508-8300-0b0a06060e01/media/Html/Teucrium_scorodonia.htm, pristupljeno 14. 11. 2014.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moor DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europaea (Diapensaceae to Myoporaceae). Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 129.

Tyler VE, Brady LR, Robbers EJ. Pharmacognosy. Philadelphia, Lea-Febiger, 1976, str. 104-110.

Vlase L, Benedec D, Hanganu D, Damian G, Csillag I, Sevestre B, Mot AC, Silaghi-Dumitrescu R, Tilea L. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for Hyssopus officinalis, Ocimum basilicum and Teucrium chamaedrys. *Molecules*, 2014, 19, 5490-5507.

Wagner H. Pharmazeutische Biologie – Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Stuttgart - New York, Gustav Fischer Verlag, 1982, str. 241-50.

7 SAŽETAK/SUMMARY

A. SAŽETAK

U ovom radu je određen sadržaj ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u pet vrsta roda *Teucrium: T. botrys, T. chamaedrys, T. halacsyanum, T. hyrcanicum* i *T. scorodonia.* Nadzemni dijelovi navedenih vrsta su skupljeni tijekom perioda cvatnje 2012. i 2013. godine.

Kvantitativna analiza je provedena spektrofotometrijskom metodom, dok je odjeljivanje trjeslovina od netaninskih polifenola provedeno metodom kožnog praška. Statistička analiza je provedena pomoću Studentovog *t*-testa.

Najveća količina ukupnih polifenola unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,13 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,87 %). Najveća količina ukupnih polifenola unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. scorodonia* - živica (4,09 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (1,68 %).

Najveća količina netaninskih polifenola unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,02 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,83 %). Najveća količina netaninskih polifenola unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,36 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (1,15 %).

Najveća količina trjeslovina unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. halacsyanum* (1,06 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,04 %). Najveća količina trjeslovina unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. scorodonia* - živica (1,40 %), a najmanja u uzorku vrste *T. chamaedrys* (0,17 %).

B. SUMMARY

In this thesis, the content of total polyphenols, nontannic polyphenols and tannins of five species of the genus *Teucrium: T. botrys, T. chamaedrys, T. halacsyanum, T. hyrcanicum* and *T. scorodonia*, was determined. The aerial parts of the plants were collected during the flowering period in 2012. and 2013.

Quantitative analysis was performed by the spectrophotometric method, while the separation of tannins from nontannic polyphenols was performed by hide powder method. Statistical analysis was assesed by Student's *t*-test.

The highest quantity of total polyphenols in 2012 was found in the sample of *T. chamaedrys* (3.13 %) and the lowest in the sample of *T. botrys* (0.87 %). The highest content of total polyphenols in 2013 was found in the sample of *T. scorodonia* (4.09 %), and the lowest in the sample of *T. botrys* (1.68 %).

The highest quantity of nontannic polyphenols in 2012 was found in the sample of *T. chamaedrys* (3.02 %) and the lowest in the sample of *T. botrys* (0.83 %). The highest content of nontannic polyphenols in 2013 was found in the sample of *T. chamaedrys* (3.36 %), and the lowest in the sample of *T. botrys* (1.15 %).

The highest content of tannins in 2012 was found in the sample of *T. halacsyanum* (1.06 %) and the lowest in the sample of *T. botrys* (0.04 %). The highest quantity of tannins in 2013 was found in the sample of *T. scorodonia* from the hedge (1.40 %), and the lowest in the sample of *T. chamaedrys* (0.17 %).

8 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ODREĐIVANJE KOLIČINE UKUPNIH POLIFENOLA, NETANINSKIH POLIFENOLA I TRJESLOVINA U PET VRSTA RODA TEUCRIUM L.

Zoran Tatalović

SAŽETAK

U ovom radu je određen sadržaj ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u pet vrsta roda *Teucrium: T. botrys, T. chamaedrys, T. halacsyanum, T. hyrcanicum* i *T. scorodonia.* Nadzemni dijelovi navedenih vrsta su skupljeni tijekom perioda cvatnje 2012. i 2013. godine. Kvantitativna analiza je provedena spektrofotometrijskom metodom, dok je odjeljivanje trjeslovina od netaninskih polifenola provedeno metodom kožnog praška. Statistička analiza je provedena pomoću Studentovog *t*-testa. Najveća količina ukupnih polifenola unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,13 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,87 %). Najveća količina ukupnih polifenola unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. scorodonia* - živica (4,09 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (1,68 %). Najveća količina netaninskih polifenola unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,02 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,83 %). Najveća količina netaninskih polifenola unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. chamaedrys* (3,36 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (1,15 %). Najveća količina trjeslovina unutar 2012. je određena kod uzorka vrste *T. halacsyanum* (1,06 %), a najmanja u uzorku vrste *T. botrys* (0,04 %). Najveća količina trjeslovina unutar 2013. je određena kod uzorka vrste *T. scorodonia* - živica (1,40 %), a najmanja u uzorku vrste *T. chamaedrys* (0,17 %).

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

Rad sadrži: 36 stranica, 18 grafičkih prikaza, 3 tablice i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Teucrium botrys* L., *T. chamaedrys* L., *T. halacsyanum* Heldr., *T. hyrcanicum* L., *T. scorodonia* L., ukupni polifenoli, netaninski polifenoli, trjeslovine, spektrofotometrija, statistička analiza

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: rujan 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DETERMINATION OF THE QUANTITY OF TOTAL POLYPHENOLS, NONTANNIC POLYPHENOLS AND TANNINS IN SOME SPECIES OF THE GENUS TEUCRIUM L.

Zoran Tatalović

SUMMARY

In this thesis, the content of total polyphenols, nontannic polyphenols and tannins of five species of the genus *Teucrium: T. botrys, T. chamaedrys, T. halacsyanum, T. hyrcanicum* and *T. scorodonia*, was determined. The aerial parts of the plants were collected during the flowering period in 2012. and 2013. Quantitative analysis was performed by the spectrophotometric method, while the separation of tannins from nontannic polyphenols was performed by hide powder method. Statistical analysis was assesed by Student's *t*-test. The highest quantity of total polyphenols in 2012 was found in the sample of *T. chamaedrys* (3.13 %) and the lowest in the sample of *T. botrys* (0.87 %). The highest content of total polyphenols in 2013 was found in the sample of *T. scorodonia* (4.09 %), and the lowest in the sample of *T. botrys* (1.68 %). The highest quantity of nontannic polyphenols in 2012 was found in the sample of *T. chamaedrys* (3.02 %) and the lowest in the sample of *T. botrys* (0.83 %). The highest content of nontannic polyphenols in 2013 was found in the sample of *T. chamaedrys* (3.36 %), and the lowest in the sample of *T. botrys* (1.15 %). The highest content of tannins in 2012 was found in the sample of *T. halacsyanum* (1.06 %) and the lowest in the sample of *T. botrys* (0.04 %). The highest quantity of tannins in 2013 was found in the sample of *T. scorodonia* from the hedge (1.40 %), and the lowest in the sample of *T. chamaedrys* (0.17 %).

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

Thesis includes: 36 pages, 18 figures, 3 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Teucrium botrys* L., *T. chamaedrys* L., *T. halacsyanum* Heldr., *T. hyrcanicum* L., *T. scorodonia* L., total polyphenols, nontannic polyphenols, tannins, spectrophotometry, statistical analysis

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: September 2017.