

# HPLC analiza polifenola u samoniklim jestivim biljnim vrstama Dalmacije

---

Antišić, Antea

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:163:545693>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Antea Antišić**

**HPLC analiza polifenola u samoniklim jestivim  
biljnim vrstama Dalmacije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fitofarmacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta, a izrađen je na Zavodu za farmakognoziiju pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Marijane Zovko-Končić.

*Izrada ovog diplomskog rada je bilo posebno iskustvo koje mi je omogućilo praktičnu nadogradnju stečenog znanja, stoga veliku zahvalu upućujem mentorici izv.prof.dr.sc. Marijani Zovko Končić na ukazanom povjerenju, strpljenju te korisnim i stručnim savjetima.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za farmakognoziiju na susretljivosti prilikom izvođenja ovog rada, kao i referentici Fehir na pomoći i prijedlozima u traženju literature.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojim prijateljicama- Ivoni, Lauri, Mariji i Katarini na svakoj nesebičnoj pomoći i savjetu, prijateljskoj riječi i ohrabrenju, iskrenom zagrljaju i smijehu. Vi ste mi uvijek bile vjetar u leđa i bez vas studiranje ne bi bilo isto.*

*Zahvaljujem se svom Inu na bezuvjetnoj podršci te svojoj obitelji, sestrama i roditeljima, na razumijevanju, ljubavi i potpori tokom moga školovanja.*

## SADRŽAJ

|        |                                                                 |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | UVOD .....                                                      | 1  |
| 1.1    | UPORABA JESTIVOG SAMONIKLOG BILJA.....                          | 1  |
| 1.1.1. | <i>Allium ampeloprasum</i> L., Amaryllidaceae, divlji luk ..... | 2  |
| 1.1.2. | <i>Sonchus</i> spp., Compositae, kostriš .....                  | 2  |
| 1.1.3. | <i>Beta vulgaris</i> L., Amaranthaceae, divlja repa .....       | 3  |
| 1.1.4. | <i>Daucus carota</i> L., Apiaceae, divlja mrkva.....            | 3  |
| 1.1.5. | <i>Crepis</i> spp., Compositae, dimak.....                      | 4  |
| 1.1.6. | <i>Foeniculum vulgare</i> Mill., Apiaceae, komorač .....        | 5  |
| 1.1.7. | <i>Papaver rhoeas</i> L., Papaveraceae, divlji mak.....         | 5  |
| 1.2    | UČINAK POLIFENOLA NA LJUDSKI ORGANIZAM.....                     | 6  |
| 1.3    | POLIFENOLI .....                                                | 7  |
| 1.3.1  | Flavonoidi.....                                                 | 7  |
| 1.3.2  | Fenolne kiseline.....                                           | 8  |
| 1.4    | TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI .....           | 9  |
| 1.5    | GRANIČNE VRIJEDNOSTI UTVRĐIVANJA.....                           | 11 |
| 2.     | OBRAZLOŽENJE TEME .....                                         | 12 |
| 3.     | MATERIJALI I METODE .....                                       | 13 |
| 3.1.   | MATERIJALI.....                                                 | 13 |
| 3.1.1  | Biljni materijal.....                                           | 13 |
| 3.1.2  | Kemikalije .....                                                | 14 |
| 3.1.3  | Instrumenti .....                                               | 14 |
| 3.2.   | METODE ISPITIVANJA.....                                         | 15 |
| 3.2.1  | Izrada standardnih otopina .....                                | 15 |
| 3.2.2  | Priprema uzoraka za analizu.....                                | 15 |
| 3.2.3  | HPLC analiza .....                                              | 15 |
| 3.2.4  | Baždarni dijagrami i kvantifikacija .....                       | 16 |
| 4.     | REZULTATI.....                                                  | 18 |
| 4.1    | BAŽDARNI PRAVCI STANDARADA .....                                | 18 |
| 4.1.1  | Klorogenska kiselina .....                                      | 18 |
| 4.1.2  | Kavena kiselina .....                                           | 19 |
| 4.1.3  | Ferulična kiselina .....                                        | 20 |
| 4.1.4  | Ružmarinska kiselina .....                                      | 21 |
| 4.1.5  | Siringična kiselina .....                                       | 22 |
| 4.1.6  | Luteolin .....                                                  | 23 |
| 4.1.7  | Krizin.....                                                     | 24 |
| 4.1.8  | Rutin .....                                                     | 25 |
| 4.2    | KVANTITATIVNA ANALIZA POLIFENOLA U UZORCIMA .....               | 26 |

|        |                        |    |
|--------|------------------------|----|
| 4.2.1  | Uzorak 1 .....         | 26 |
| 4.2.2  | Uzorak 2 .....         | 27 |
| 4.2.3  | Uzorak 3 .....         | 29 |
| 4.2.4  | Uzorak 4 .....         | 30 |
| 4.2.5  | Uzorak 5 .....         | 31 |
| 4.2.6  | Uzorak 6 .....         | 32 |
| 4.2.7  | Uzorak 7 .....         | 33 |
| 4.2.8  | Uzorak 8 .....         | 35 |
| 4.2.9  | Uzorak 9 .....         | 36 |
| 4.2.10 | Uzorak 10 .....        | 37 |
| 4.2.11 | Uzorak 11 .....        | 38 |
| 4.2.12 | Uzorak 12 .....        | 39 |
| 5.     | RASPRAVA.....          | 41 |
| 6.     | ZAKLJUČCI .....        | 47 |
| 7.     | LITERATURA.....        | 48 |
| 8.     | SAŽETAK/ SUMMARY ..... | 54 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1 UPORABA JESTIVOG SAMONIKLOG BILJA

Primjena divljeg samoniklog bilja je široko rasprostranjena na prostoru Mediterana. Takav primjer herbofilije je posebno prisutan u Dalmaciji i time ju čini zanimljivim mjestom za proučavanje uporabe divljeg bilja. S obzirom na svoj položaj, Dalmacija se nalazi na raskrižju utjecaja slavenskih naroda, čija prehrana je insuficijentna povrćem, te Mediteranske kuhinje, s kojom dijeli prehranu bogatu raznolikim lisnatim povrćem. Bogata tradicija konzumacije divljeg samoniklog bilja je najvjerojatnije rezultat jakog venecijanskog i grčkog utjecaja kroz prošlost kao i nužnosti korištenja svih resursa hrane, dostupnih u suhoj, neplodnoj zemlji (Łuczaj i sur., 2013).

Među najučestalijim povrćem koje se može naći na dalmatinskim tržnicama, ubrajaju se: *Sonchus oleraceus* L., Compositae (zeljasti kostriš), *Allium ampeloprasum* L., Amaryllidaceae (divlji luk), *Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae (komorač), *Papaver rhoeas* L., Papaveraceae (divlji mak), *Daucus carota* L., Apiaceae (divlja mrkva), *Taraxacum* sp., Asteraceae, (maslačak), *Crepis* spp., Compositae (dimak), *Picris echioides* L., Asteraceae i *Urospermum picroides* F.W.Schmidt, Asteraceae (zajedničkog imena hrastej), te *Silene latifolia* Poir, Caryophyllaceae (ušac). Također, često se nađu i kultivirane biljke poput *Beta vulgaris* L., Amaranthaceae (divlja repa) kao i razne vrste porodice Brassicaceae. Navedene biljne vrste se na tržnicama prodaju zajedno pod različitim imenima, poput: "mišanca", "mišancija", "gruda", "parapač", "pazija" i "divlje zelje". U prehrani se koriste u kuhanom obliku i začinjavaju se maslinovim uljem i solju. S druge strane, *Asparagus acutifolius* L., Asparagaceae (šparoga), *Tamus communis* L., Dioscoreaceae (bljušt) te pojedine vrste porodice Asteraceae, poznate pod nazivom žućenica/radič, se prodaju zasebno, u strčku i konzumiraju se sirove ili kratko kuhane (Łuczaj i sur., 2013).

Konzumacija divljih mješavina povrća ima dugu neprekinutu tradiciju i predstavlja dio tradicionalne dalmatinske baštine. Dok je nekoć sačinjavala glavni obrok, danas se mišancija uglavnom konzumira samo kao prilog uz glavno jelo. Međutim, u europskim zemljama (time i u Hrvatskoj), sve više raste popularnost vegetarijanske prehrane, tako da su paralelno prisutni znakovi degeneracije i oživljavanja tradicije (Łuczaj i sur., 2013).

#### 1.1.1. *Allium ampeloprasum* L., Amaryllidaceae, divlji luk

*Allium ampeloprasum* L. (Amaryllidaceae), divlji luk, je biljna vrsta koja preferira sunčana staništa i suho tlo, a može narasti i do 1,8 m visine. U prehrani se koriste korijen, list i cvijet te se može konzumirati u sirovom i kuhanom obliku. Svoju primjenu nalazi i u medicinskom području, no znatno je blažeg djelovanja u odnosu na srodni *Allium sativum* L., (Amaryllidaceae), češnjak (*Allium ampeloprasum*, [www.pfaf.org](http://www.pfaf.org) ).

Češnjak je još od davnina cijenjen kao začim i lijek, a njegovo djelovanje je višestrano. Osim antimikrobnog učinka, ima antitrombotički i fibrinolitički učinak te se koristi i kao pomoćno sredstvo u dijetama kod hiperlipemije (Schaffner i sur., 1999).



**Slika 1.** *Allium ampeloprasum*, divlji luk (<http://database.prota.org>).

#### 1.1.2. *Sonchus* spp., Compositae, kostriš

*Sonchus* spp. (Compositae/Asteraceae), kostriš, je rod raznolikih biljnih vrsta iz porodice glavočika. U ispitivanoj mješavini prisutne su 4 vrste, među više od 130 do danas poznatih vrsta ovog roda. Listovi i stabljika koriste se najčešće u kulinarstvu kao salata ili začim, ali primjenu nalaze i u medicini (*Sonchus* spp., [www.pfaf.org](http://www.pfaf.org)).

*Sonchus arvensis* L. (Compositae), poljski kostriš, je jedna od vrsta roda *Sonchus* interesantna u pakistanskoj prehrani radi antioksidativnog (Khan, 2012) i antibakterijskog učinka (Xia i sur., 2011), a pripisuje joj se također i protuupalni učinak kod kolika i intestinalnih upala (Guarrera, Savo, 2013). Antimikrobno djelovanje se pripisuje i vrsti *Sonchus oleraceus* (L.) L. (Compositae), zeljasti kostriš (Xia i sur., 2011), a također se smatra da bi svoju primjenu mogao naći i u psihofarmakologiji radi primijećenog blagog anksiolitičkog djelovanja (Sarris i sur., 2013) uz brojna ostala pogodna i kurativna djelovanja na ljudsko zdravlje (Guarrera, Savo, 2013).



**Slika 2.** *Sonchus* spp., kostiš (<http://nyc.books.plantsofsuburbia.com>).

#### 1.1.3. *Beta vulgaris* L., Amaranthaceae, divlja repa

*Beta vulgaris*, L. (Amaranthaceae), divlja repa, je lisnato povrće koje pripada porodici Amaranthaceae. Primjenjuje se pretežno u kulinarstvu u sirovom te kuhanom obliku, a jestive dijelove čine korijen i list ([www.missouribotanicalgarden.org](http://www.missouribotanicalgarden.org)).

Posljednjih godina raste interes za vrstu *Beta vulgaris* var. *rubra* L. (Amaranthaceae), crvenu divlju repu, radi potencijalne učinkovitosti u očuvanju zdravlja i prevenciji bolesti. Kao bogat izvor nitrata, crvena divlja repa prevenira hipertenziju i ima učinak u poboljšanju endotelne funkcije. Također, zahvaljujući betalain pigmentu, smatra se obećavajućim terapijskim tretmanom u širokom rasponu patoloških oboljenja povezanih sa upalom i oksidativnim stresom, odnosno pokazuje potentnu antioksidativnu, protuupalnu i kemopreventivnu aktivnost *in vitro* i *in vivo* (Clifford i sur., 2015).



**Slika 3.** *Beta vulgaris*, divlja repa (<http://database.prota.org> ; <http://nargil.ir/plant>).

#### 1.1.4. *Daucus carota* L., Apiaceae, divlja mrkva

*Daucus carota* L. (Apiaceae), divlja mrkva, je dvogodišnja biljka iz porodice štitarki, tj. Apiaceae te se smatra jednom od najvažnijih povrtnih namirnica.

Bogat je izvor antioksidansa-lipofilnih karotenoida i hidrofilnih polifenola. Sadrži vitamine C i E koji su prvi u obrani organizma od reakcija oksidativnog stresa. Divlja mrkva je važan je izvor i ostalih vitamina B kompleksa, poput pantotenske i folne kiseline, kao i ugljikohidrata te elemenata u tragovima poput Ca, P, Fe i Mg. Među ostalim karakteristikama

značajan učinak ima na poboljšanje vida, probave i snižavanje kolesterola (Bystricka i sur., 2015), a pripisuje joj se još i antitumorski, antifungalni, antibakterijski i protuupalni učinak (Dawid i sur., 2015).



**Slika 4.** *Daucus carota*, divlja mrkva (<http://database.prota.org>).

#### 1.1.5. *Crepis* spp., Compositae, dimak

Rod *Crepis*, (Compositae/Asteraceae), dimak, broji više od 200 biljnih vrsta koje su rasprostranjene široko u svijetu, izuzev Australije (Karaismailoglu, 2015).

Među vrstama, ističe se *Crepis vesicaria* L., (Compositae), mjehurasti dimak, koji se koristi u prehrani te ima diuretički i laksativni (Sansanelli, Tassoni, 2014) te također hipoglikemijski i antihipertenzivni učinak (Guarrera, Savo, 2013). Zahvaljujući polifenolima, navedenoj biljci se također pripisuje i protektivni učinak na oštećenje DNA uzrokovano oksidativnim stresom (Kapiszewska i sur., 2005).



**Slika 5.** *Crepis* spp (<http://www.naturespot.org.uk>).

#### 1.1.6. *Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae, komorač

*Foeniculum vulgare* Mill. (Apiaceae), komorač, je jedna od najrasprostranjenijih medicinskih biljaka porodice štitarki, Apiaceae, s prvobitnim staništem na području Sredozemlja, a danas se uzgaja širom svijeta (Schaffner i sur., 1999).

Koristi se kod lakših želučano-crijevnih tegoba, poput konstipacije (Picon i sur., 2010) te protiv prehlade i bronhijalnog katara. Ekspektorans je te ima spazmolitičko i karminativno djelovanje, dok u vanjskoj primjeni služi kao vodica za umorne oči i kod funkcionalnih poremećaja vida (Schaffner i sur., 1999; Kuštrak, 2005). Komoraču se pridaje i potencijalno inhibitorni učinak na diferencijaciju osteoklasta kod postmenopauzalne osteoporoze (Kim i sur., 2012). Sjemenke sadrže oko 6 % eteričnog ulja koje se sastoji uglavnom od anetola s dodatkom estragola, fenhona i raznih terpena. Osim ulja, sjemenke sadržavaju fitosterole, flavonoide i kumarine (Raal i sur., 2012).



**Slika 6.** *Foeniculum vulgare*, komorač (<http://www.naturespot.org.uk>).

#### 1.1.7. *Papaver rhoeas* L., Papaveraceae, divlji mak

*Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae), divlji mak, je zeljasta biljka koja je svoju primjenu našla u prehrani, posebno sjemenke, koje ne sadrže toksične alkaloidne, cvjetovi i listovi, uz oprez da se listovi nakon cvatnje biljke ne smiju konzumirati. Zahvaljujući alkaloidima, divlji mak se, uz nadzor, može koristiti i u medicinske svrhe gdje ublažava kašalj, ollašava umjerenu bol, a može djelovati i kao sedativ, hipnotik i narkotik. (*Papaver rhoeas*, [www.pfaf.org](http://www.pfaf.org)). Također, radi antioksidativnog, antimutagenog i antikarcinogenog učinka na *Saccharomyces cerevisiae*, razmatra se njegova primjena kao aditiva u hrani (Todorova i sur., 2015).



Slika 7. *Papaver rhoeas*, divlji mak (<http://www.naturespot.org.uk>).

## 1.2 UČINAK POLIFENOLA NA LJUDSKI ORGANIZAM

Polifenoli pokazuju raznolik učinak na zaštitu ljudskog organizma. Imaju jaka antioksidacijska svojstva pa stoga štite stanice od oštećenja uzrokovanog oksidacijskim stresom, čime se smanjuje rizik od bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, raka i neurodegenerativnih bolesti (Shivashankara i Acharya, 2010).

Zabilježena je pozitivna korelacija između konzumacije prehrane bogate flavonoidima i smanjenja kardiovaskularnih morbiditeta i mortaliteta. Potiču jačanje krvnih žila i imaju antiagregacijsku aktivnost čime smanjuju rizik nastajanja plakova u blizini oštećenog endotela (Essa i sur., 2016). Antikancerogen potencijal flavonoida se primjećuje preko njihove uloge u inhibiranju inicijacije i progresije tumora. Induciraju apoptozu, inhibiraju angiogenezu, zahvaljujući antioksidativnim svojstvima, te se ponašaju citotoksično prema tumorskim stanicama (Essa i sur., 2016). Značaj flavonoida u sprječavanju neurodegenerativnih oboljenja je otkriven nedavno promatrajući utjecaj životnih navika na dobne zdravstvene poremećaje. Unatoč velikom broju različitih bolesti koje se skrivaju pod tim pojmom, jedino nekolicina, poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, dominantno su vezane uz gubitak kognitivnih funkcija i pamćenja (Essa i sur., 2016). Poznato je da neke fenolne kiseline i flavonoidi mogu usporiti razvoj dijabetičkih komplikacija, poput dijabetičke retinopatije (Shin i sur., 2013) te postižu antioksidativnu zaštitu  $\beta$  stanica gušterače (Govindaraj i sur., 2015).

Iako postoje brojni dokazi o povoljnim učincima polifenola u liječenju i prevenciji najčešćih bolesti današnjeg vremena, zaštitni učinci ovise o samoj biodostupnosti polifenolnih spojeva u organizmu te su potrebna dodatna klinička istraživanja da bi se dokazale navedene pretpostavke i odredio potpuni potencijal flavonoida.

### 1.3 POLIFENOLI

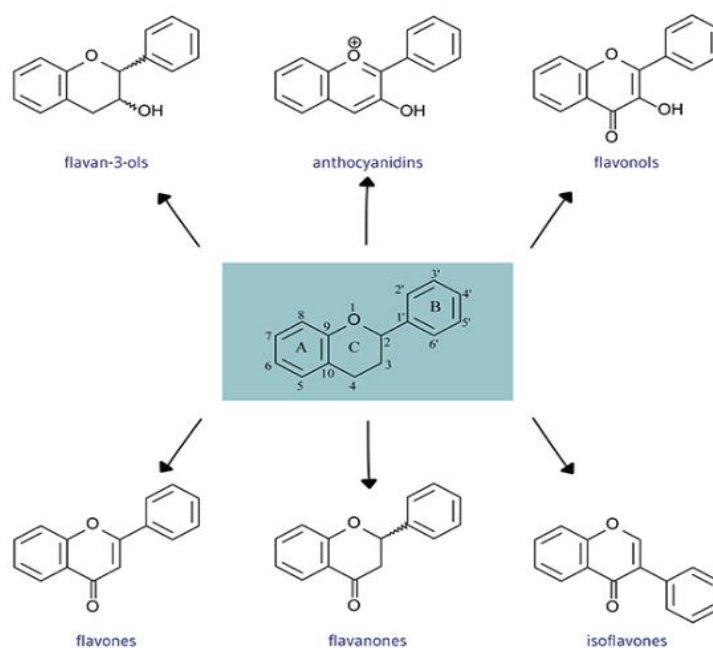
Polifenoli su biološki aktivne tvari vrlo rasprostranjene u prirodi i značajno prisutne u ljudskoj prehrani. Sekundarni su metaboliti biljaka kojima služe za obranu od UV-zračenja ili napada patogena te za pigmentaciju, rast i razmnožavanje (Manach i sur., 2004). Epidemiološke studije upućuju da veći unos voća i povrća u prehrani može smanjiti rizik od mnogih kroničnih bolesti zahvaljujući sadržaju polifenola (Shivashankara i Acharya, 2010).

Više od 8000 polifenolnih sastavnica otkriveno u raznim biljnim vrstama i time čine vrlo raznoliku skupinu kemijskih spojeva koje, na temelju njihove strukture i sličnih kemijskih svojstava, možemo svrstati u nekoliko definiranih grupa. Razlikujemo fenolkarboksilne kiseline i derivate, flavonoide, kumarine, lignane, trjeslovine i antranoide. Svi polifenoli nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora, šikiminske kiseline (Pandey i sur., 2009). Po strukturi to su aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku u prirodi, uglavnom su u esterificiranom ili konjugiranom obliku (Čović i sur, 2009).

Fenolni spojevi imaju najmanje jedan aromatski prsten s priključenom jednom ili više hidroksilnih skupina te se svrstavaju pod flavonoide i ne-flavonoide (Del Rio i sur, 2013).

#### 1.3.1 Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji imaju strukturu tipa  $C_6-C_3-C_6$  (dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem). U većine flavonoida središnji fragment povezan je s kisikom u heterociklički prsten (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2009). Na temelju raznolikosti heterocikličkog prstena, flavonoidi se mogu podijeliti u 6 podrazreda: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antocijanini i izoflavoni (Slika 8). Individualne razlike između svake grupe uvjetovane su varijacijama u broju i položaju hidroksilnih skupina vezanih na benzenske jezgre kao i stupnjem alkilacije i/ili glikozilacije (Pandey i sur., 2009). Uglavnom se nalaze u glikozidnom obliku. Obilježava ih vrsta, broj i položaj šećera vezanih na aglikon. Pretežno su O-glikozidi, a šećer je najčešće vezan u položaju 3 i 7 (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).

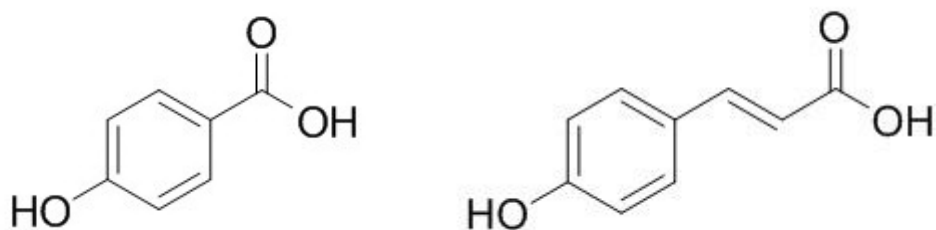


**Slika 8.** Podjela flavonoida prema strukturi (<http://lpi.oregonstate.edu>).

### 1.3.2 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline, uz stilbene i lignane, se ubrajaju u skupinu ne-flavonoida, spojeva jednostavnije građe od flavonoida koji se sastoje od jednog benzenskog prstena. Velikog su prehrambenog značaja te čine otprilike trećinu polifenolnih spojeva u prehrani (Del rio i sur., 2013).

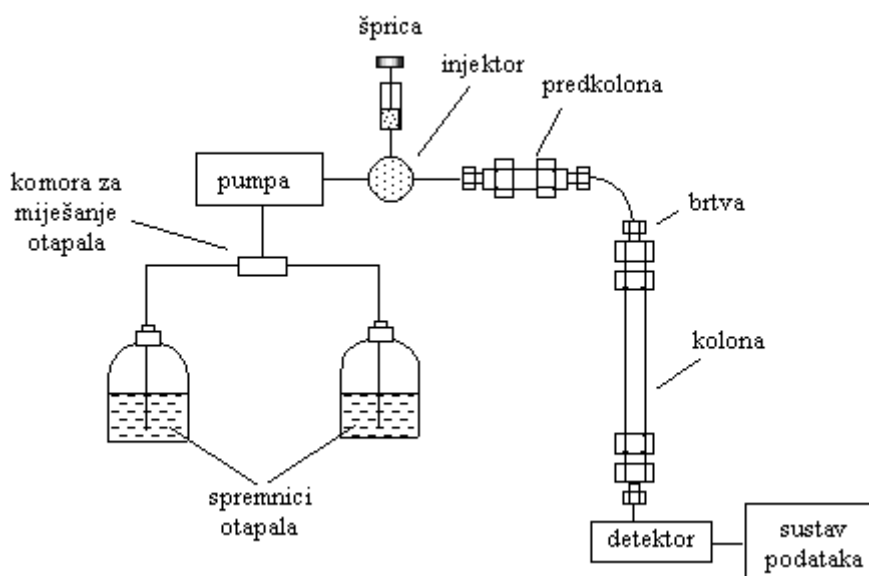
Fenolne kiseline prisutne u biljnim drogama dijele se na hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline. Mogu biti u slobodnom obliku, u obliku estera ili glikozida. Osnovnu strukturu hidroksibenzojevih kiselina predstavlja C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> jedinica, a međusobne razlike proizlaze iz hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (npr. galna i vanilinska kiselina). U biljnim drogama zastupljenije su hidroksicimetne kiseline (C-C) koje se također međusobno razlikuju prema hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena. Među njima su najučestalije kavena i kumarinska kiselina. Uglavnom se nalaze u obliku estera (npr. klorogenska i ružmarinska kiselina), a rjeđe u slobodnom obliku (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).



**Slika 9.** Hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina ([www.chemfaces.com](http://www.chemfaces.com)).

#### 1.4 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je visoko efikasna razdjelna kromatografija koja se u 75% primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. Osnovni konstrukcijski dijelovi u HPLC kromatografu su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor. Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće i valja ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica, npr., pomoću mikroporoznih filtera pod vakuumom. U kromatografiji obrnutih faza, mobilnu fazu najčešće čini smjesa otapala poput vode, metanola, acetonitrila i tetrahidrofurana različitih udjela kako bi se postiglo što efikasnije odjeljivanje analita. Pumpa služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom ( $0,1-10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ) u kolonu. Uzorak se unosi "autosampler"-om, ili manualno mikrolitarskom špricom ("syringe") kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje u kojoj se održava tlak. Predkolona služi za zaštitu kolone od mogućih onečišćenja, dok unutar same kolone dolazi do razdjeljivanja analita između stacionarne i mobilne faze. Kolona je cijev duljine 20-25 cm, unutarnjeg promjera 4,6 mm i punjena je česticama stacionarne faze veličine 5 ili 10  $\mu\text{m}$ . U kromatografiji obrnutih faza koriste se kemijski modificirane čestice silika gela na kojima se nalaze alkilni lanci koji zapravo određuju nepolarost stacionarne faze. Među detektorima najčešću primjenu našao je DAD spektroskopski detektor kakav se i koristio u izradi ovog diplomskog rada, a u analitici se koriste još detektori fluorescencije, detektori indeksa loma i fluorescencijski detektori (Lutteroti, 2012).



**Slika 10.** Shema HPLC uređaja (Lutteroti, 2012).

Prilikom analize polarnih i lipofilnih grupa molekule lijeka, na koloni obrnutih faza najduže će se zadržati lipofilan spoj dok će se najpolarniji sastojak smjese eluirati prvi. Zadržavanje tvari i selektivnost se podešavaju variranjem sastava mobilne faze. Kod izokratne HPLC radi se s jednim otapalom stalnog sastava. Ukoliko ne dolazi do željenog odjeljivanja, primjenjuje se gradijentna HPLC kod koje se sastav mobilne faze stalno mijenja čime se postiže brže i bolje odjeljivanje (Lutteroti, 2012).

HPLC se koristi za odjeljivanja i određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Važna je primjena HPLC u ispitivanjima hrane, tla, zraka na prisustvo i sadržaj štetnih tvari poput pesticida, polikloriranih bifenila ili policikličkih aromatskih ugljikovodika. HPLC se primjenjuje i za odjeljivanje alkana, lipida, steroida, šećera i lipofilnih vitamina (Luterotti, 2012).

## 1.5 GRANIČNE VRIJEDNOSTI UTVRĐIVANJA

Granične vrijednosti utvrđivanja su analitičke značajke postupka validacije. Prema regulatornim zahtjevima Dobre proizvođačke prakse (Good manufacturing praxis, GMP) i Dobre laboratorijske prakse (Good laboratory praxis, GLP) postupci validacije analitičkih postupaka su obavezni. Validacijom se utvrđuje i dokumentira prikladnost ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. I validacija analitičkog postupka jamči da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti valjani rezultati. Granica dokazivanja (engl. Limit of detection, LOD) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (engl. Limit of quantitation, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku i moguće ju je odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. LOD i LOQ se određuju razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma (LOD=3:1 ili 2:1; LOQ=10:1), ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca

$$LOD = \frac{3,3 * \sigma}{a} \quad \text{i} \quad LOQ = \frac{10 * \sigma}{a}$$

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca, ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je  $a$  nagib kalibracijskog pravca. Granice dokazivanja i određivanja se ispituju mjerenjem apsorbancije slijepog uzorka. Iz pripadajućeg standardnog odstupanja izmjerenih apsorbancija slijepog uzorka te nagiba pravca dobivenog regresijskom analizom izračuna se LOD i LOQ (Nigović i sur., 2014).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Brojne studije upućuju da veći unos voća i povrća u prehrani može smanjiti rizik od mnogih kroničnih bolesti zahvaljujući sadržaju polifenola. Biljne vrste koje su se ispitivale u ovom istraživanju, prikupljene su na području južne Dalmacije te se već godinama nalaze na tržnicama pod nazivom 'mišancija' ili 'divlje zelje'. Postale su dio prehrambene baštine dalmatinskog podneblja i od pamtivyjeka se pridaje važna uloga njihove konzumacije u sveobuhvatnom očuvanju ljudskog zdravlja.

U ovom radu ispitivao se sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida u 12 ekstrakata tih biljnih vrsta. S obzirom da se zahvaljujući polifenolima može smanjiti rizik od brojnih kroničnih bolesti, istražen je potencijal primjene navedenog tradicionalnog bilja u prevenciji i ublažavanju simptoma raznih bolesti.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1 Biljni materijal

U ovom radu ispitivano je 12 suhih ekstrakata biljaka, zbirnog imena "mišancija", koje su bile kupljene na tržnici Kvaternikov trg u Zagrebu, a prikupljene na području južne Dalmacije. Identitet biljnih vrsta je ispitan na Zavodu za farmakognoziju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Zovko Končić te je utvrđeno da se u smjesi nalaze: *Allium ampeloprasum*, *Beta vulgaris*, *Daucus carota*, *Foeniculum vulgare*, *Papaver rhoeas*, neutvrđene vrste roda *Sonchus* spp. i *Crepis* spp. te dvije neidentificirane biljke.

Svaka biljka je pojedinačno izvagana i naknadno osušena. Suhe komponente su ponovno izvagane, a iz razlike masa se dobio postotak vlažnosti. Suhe sastavnice su se usitnile u električnom mlinu kako bi se dobile fine, sitne čestice podobne za ekstrakciju. Etanol i voda su korišteni kao otapala u ekstrakciji.

Postupak ekstrakcije: 1 dio droge (5g) : 10 dijelova 96% etanola (50 ml). Uzorci su stavljeni 30 min. na ultrazvučnu kupelj i zatim filtrirani. Postupak je ponovljen s ostatkom materijala pokuljenim s filter papira. Korištena otapala: 96% etanol (25,0 ml), 50% etanol (37,5 ml), voda (50,0 ml). Nakon isparavanja etanola, uzorci su ponovo izvagani te potom liofilizirani.

**Tablica 1. Broj uzoraka i identifikacija biljaka.**

| Uzorak | Identifikacija             |
|--------|----------------------------|
| 1      | Neidentificiran            |
| 2      | Neidentificiran            |
| 3      | <i>Allium ampeloprasum</i> |
| 4      | <i>Sonchus</i> spp.        |
| 5      | <i>Beta vulgaris</i>       |
| 6      | <i>Sonchus</i> spp.        |
| 7      | <i>Daucus carota</i>       |
| 8      | <i>Sonchus</i> spp.        |
| 9      | <i>Sonchus</i> spp.        |
| 10     | <i>Crepis</i> spp.         |
| 11     | <i>Foeniculum vulgare</i>  |
| 12     | <i>Papaver rhoeas</i>      |

### 3.1.2 Kemikalije

Za izradu mobilnih faza korišteni su metanol, mravlja kiselina i voda za HPLC. Metanol (J.T. Baker, SAD), mravlja kiselina (Scharlau, Španjolska), etanol 96% (GRAM – MOL d.o.o., Hrvatska). Za hidrolizu biljnih ekstrakata korištena je klorovodična kiselina 37% (Carlo Erba, Francuska) i voda za HPLC. Za kvalitativnu analizu ekstrakata korišteni su standardi: klorogenske, ferulične, sinapične, protokatehnične, vanilinske, p-kumarne, siringične, ružmarinske, kavene, trans-cimetne, elagične, galne kiseline te rutina, krizina, baikaleina, kemferola, katehin hidrata, kvercitrin hidrata, naringenina, kvercetin-3 $\beta$ -glukozida (izokvercitrin), apigenina, arbutina, fisetina, hesperitina, galangina i luteolina (Sigma-Aldrich, SAD). Sve korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće (*p.a.*).

### 3.1.3 Instrumenti

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: centrifuga (Tehtnica železniki, Slovenija), precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital 10P, Bandelin electronic, Njemačka), rotavapor (Büchi, Njemačka), HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, USA), DAD detektor (Agilent Technologies 1260 Infinity), magnetska mješalica (Wisd Laboratory Instruments, Witeg Njemačka).

## **3.2. METODE ISPITIVANJA**

### **3.2.1 Izrada standardnih otopina**

U radu su se koristili gotovi standardi protokatehnične, vanilinske, ružmarinske, galne, klorogenske, p-kumarne i ferulične kiseline te rutina, krizina, baikaleina, kemferola, luteolina, hesperetina, fisetina, katehin hidrata, naringenina, kvercitrin hidrata, apigenina, izokvercitrina, galangina, arbutina te siringične, trans-cimetne, elagične i sinapične i kavene kiseline. Izrađene standardne otopine pripremljene su otapanjem 1 mg standarda u 5 ml metanola za HPLC, čime je dobivena koncentracija od 0,2 mg/ml. Neposredno prije analiziranja, približno 1 ml pripremljenih otopina standarda je profiltriran u vialu pomoću filtra za HPLC, a ostatak se sve do ponovne uporabe čuvao u hladnjaku na 4 °C.

### **3.2.2 Priprema uzoraka za analizu**

Za pripremu nehidroliziranih uzoraka, odvagnuto je 20 mg svakog etanolnog uzorka iz Tablice 1. i premješteno u odmjerne tikvice od 10 ml. Svim uzorcima se dodalo malo metanola za HPLC, a potom su se i potpuno otopili na ultrazvučnoj kupelji na sobnoj temperaturi. Odmjerne tikvice su se potom nadopunile do oznake 96%-tnim etanolom kako bi se otopine uzoraka izbistrile.

Iz svakog uzorka se potom uzelo otprilike 1-1,5 ml pomoću igle te injektiralo, pomoću filtera papira (promjera pora 0,45 μm), u vialu. Uzorci su se prenijeli u HPLC te se provela analiza.

Za pripremu hidroliziranih uzoraka, iz gore navedenih, pripremljenih nehidroliziranih uzoraka, uzelo se po 1 ml otopine pomoću automatske pipete i premjestilo u epruvetu za centrifugu. Potom se u svaku epruvetu dodalo još 400 μl pripremljene 6M HCl (iz vode i 37%-tne HCl). Epruvete su se zatvorile čepom na kojem je obilježen broj uzorka i uronile su se u vodenu kupelj na 2 h kako bi uzorci hidrolizirali.

Nakon grijanja na vodenoj kupelji, otopine su se pomoću filtera papira profiltrirale u odmjerne tikvice od 5 ml i nadopunile metanolom za HPLC do oznake. Dio otopine svakog hidroliziranog ostatka (otprilike 1 ml) je profiltriran kroz filter (promjera pora 0,45 μm) u vialu te su se uzorci prenijeli u HPLC uređaj.

### **3.2.3 HPLC analiza**

HPLC analiza nehidroliziranih i hidroliziranih uzoraka provedena je na HPLC-u s DAD detektorom. Separacija je provedena na Zorbax C18 koloni (250 mm x 4,6 mm sa veličinom

čestica od 5  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, USA). Za mobilnu fazu A korištena je smjesa vode za HPLC, metanola i mravlje kiseline (93:5:2), a za mobilnu fazu B smjesa vode za HPLC, metanola i mravlje kiseline (3:95:2). Elucija sastavnica provedena je pri brzini protoka od 1,0 ml/min, a aplicirani volumen iznosio je 100  $\mu\text{l}$  za nehidrolizirane uzorke (izuzev uzoraka pod brojem 6 i 7 za koje se uzelo 10  $\mu\text{l}$ ) i 100  $\mu\text{l}$  za hidrolizirane uzorke. Separacija se provodila na temperaturi od 40 °C primjenom metode gradijenta sljedećim rasporedom: 0 min 20% B, 10 min 40% B, 35 min 50% B, 45 min 80% B, 50 min 20% B. Ovi uvjeti bili su održavani 10 minuta i zatim vraćeni na početne unutar 3 minute. Kromatogrami uzoraka i standarada promatrani su na sljedećim valnim duljinama: 270 nm, 290 nm, 320 nm i 373 nm. Kvantifikacija kromatografskih pikova izvršena je na valnim duljinama na kojima pojedine sastavnice pokazuju najveću apsorpciju UV zračenja. Tako su na valnoj duljini 270 nm kvantificirane trans-cimetna, elagična, galna i protokatehuična kiselina te kvercitrin hidrat, izokvercitrin, galangin, katehin hidrat, baikalein, krizin i rutin. Na valnoj duljini 290 nm kvantificirani su naringenin, arbutin, hesperetin, luteolin, sirinđična i vanilinska kiselina. Na valnoj duljini 320 nm kvantificirane su fenolne kiseline poput kavene, sinapične, ferulične, p-kumarne, ružmarinske, klorogenske kiseline te apigenina, dok na 373 nm su se kvantificirale kemferol i fisetin.

Komponente nehidroliziranih i hidroliziranih uzoraka ekstrakata identificirane su uspoređivanjem njihovih vremena zadržavanja s retencijskim vremenima standarada fenolnih kiselina (ferulična, sinapična, p-kumarna, ružmarinska, kavena, klorogenska, elagična, trans-cimetna, vanilinska, sirinđična, galna, protokatehuična), te retencijskim vremenima standarada flavonoidnih aglikona (fisetin, katehin hidrat, naringenin, apigenin, galangin, hesperetin, baikalein, luteolin, kemferol, krizin, kvercitrin hidrat) i flavonoidnih glikozida rutina, arbutina i izokvercitrina. Njihova prisutnost je dodatno potvrđena uspoređivanjem UV-spektara pripadajućih kromatografskih pikova u uzorku i pikova čistih standarada. Kvantifikacija ispitivanih sastavnica provedena je pomoću baždarnih pravaca standarada te je izražena u mg standarda na 1 g uzorka.

### **3.2.4 Baždarni dijagrami i kvantifikacija**

Baždarni dijagrami su dobiveni apliciranjem određenih volumena otopina standarada istom metodom na HPLC-u. Za standarde ferulične, klorogenske, ružmarinske kiseline, luteolina i krizina, aplicirani volumeni su iznosili 2, 4, 6, 8 i 10  $\mu\text{l}$ . Volumeni otopine standarda rutina su iznosili 1, 3, 5, 7 i 9  $\mu\text{l}$ , a za otopinu standarda sirinđične kiseline, 10, 20, 30, 40 i 50  $\mu\text{l}$ . Za standard kavene kiseline, aplicirani volumeni su iznosili 3, 6, 10, 15, 20 i 30

μl. Konstruirani su baždarni pravci koji pokazuju ovisnost površine ispod krivulje (AUC) o masi standarda. Iz jednadžbe dobivenog pravca izračunata je masa standarda koja odgovara dobivenoj površini ispod krivulje te je prema sljedećoj formuli izračunat maseni udio standarda u uzorku (mg/g):

$$w(\text{mg/g}) = m_1 \times V_1 / m_2 \times V_2$$

$V_1$  - volumen priređene otopine uzorka u μL

$V_2$  - volumen injektiranja u μL

$m_1$  - masa standarda

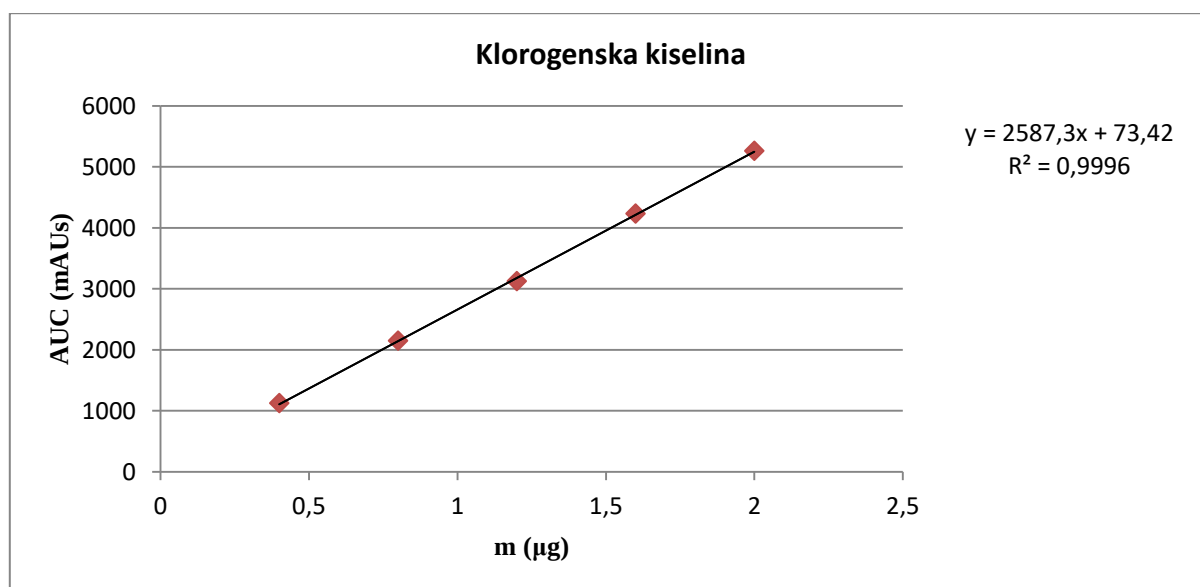
$m_2$  - odvaga uzorka u mg

## 4. REZULTATI

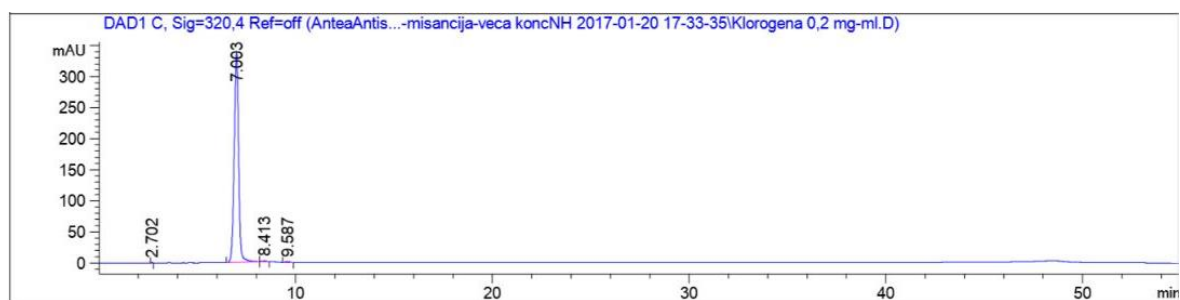
### 4.1 BAŽDARNI PRAVCI STANDARADA

#### 4.1.1 Klorogenska kiselina

Izrađen je baždarni pravac za klorogensku kiselinu (Graf 1) koja pokazuje retencijsko vrijeme od 7,003 minuta na valnoj duljini  $\lambda=320$  nm (Slika 11). Regresijskom analizom određena je jednačba baždarnog pravca:  $y = 2587,3x + 73,42$ , gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu klorogenske kiseline u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednačbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,04 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,11 \mu\text{g/ml}$ .



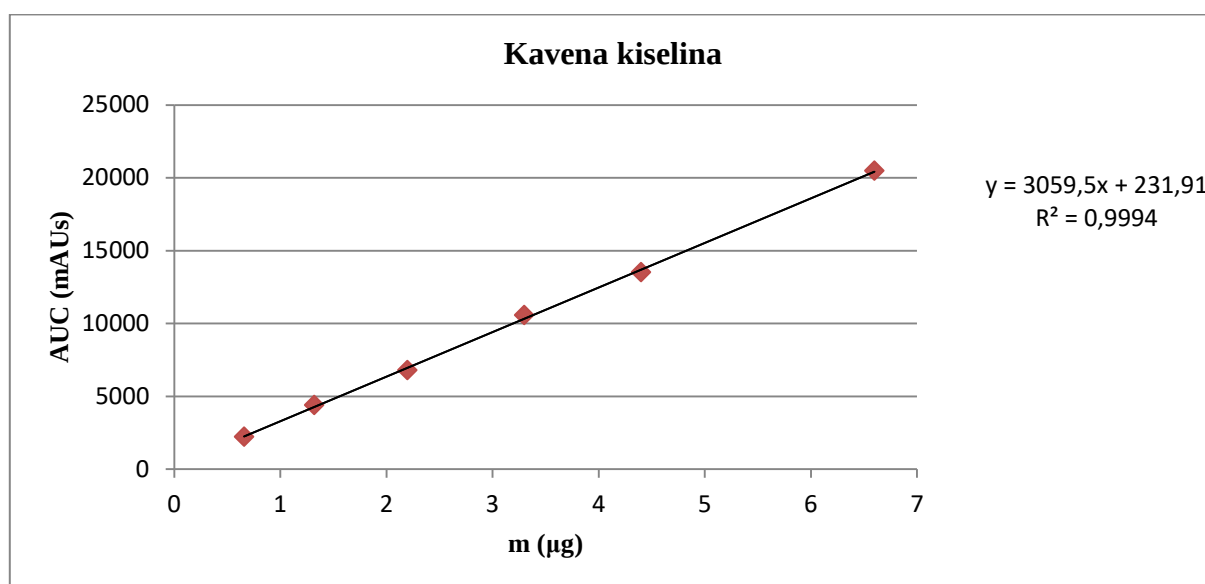
Graf 1. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi klorogenske kiseline.



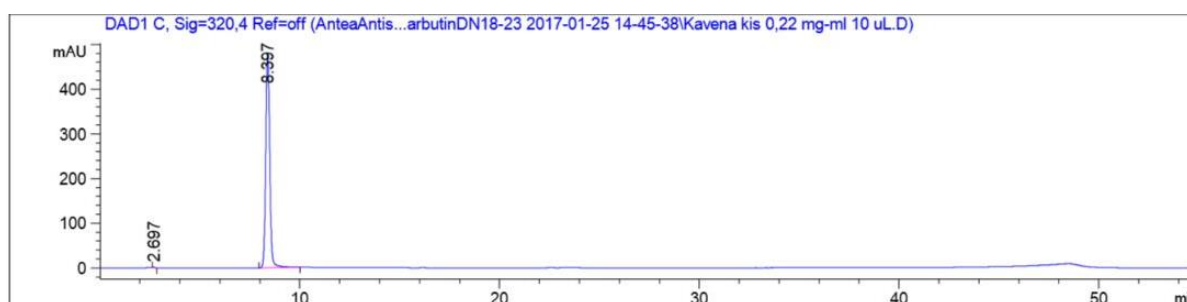
Slika 11. Kromatogram standarda klorogenske kiseline.

#### 4.1.2 Kavena kiselina

Izrađen je baždarni pravac za kavenu kiselinu (Graf 2) koja pokazuje retencijsko vrijeme u od 8,397 minuta na valnoj duljini  $\lambda=320$  nm (Slika 12). Regresijskom analizom određena je jednačba baždarnog pravca:  $y = 3059,5x + 231,91$ , gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu kavene kiseline u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednačbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,04 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,12 \mu\text{g/ml}$ .



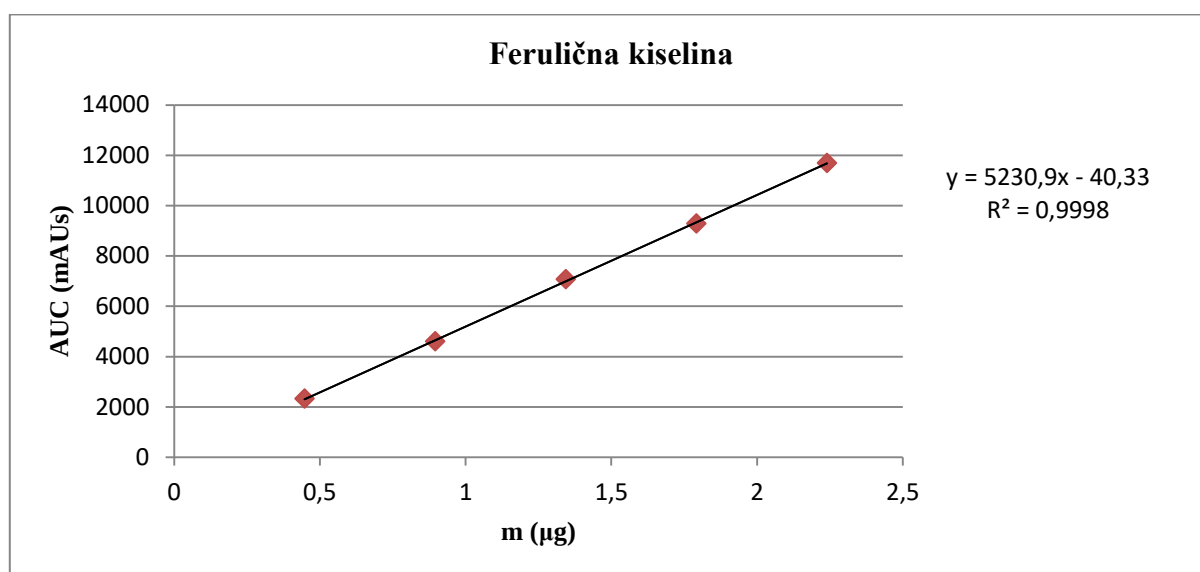
Graf 2. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi kavene kiseline.



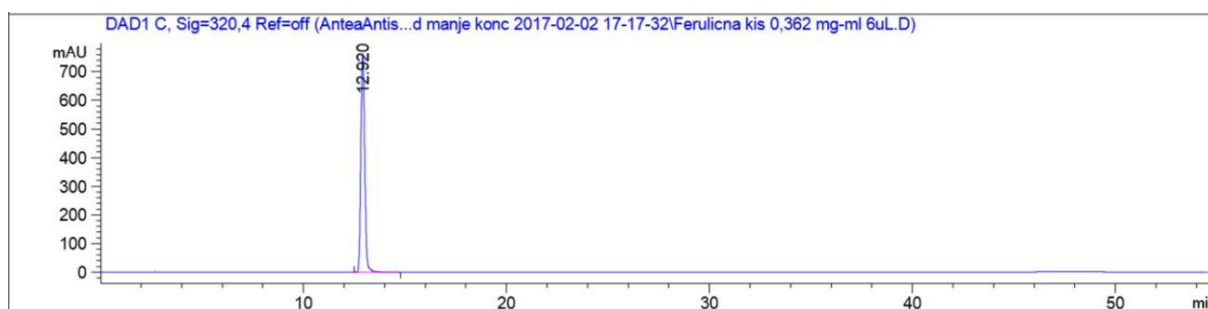
Slika 12. Kromatogram standarda kavene kiseline.

### 4.1.3 Ferulična kiselina

Izrađen je baždarni pravac za feruličnu kiselinu (Graf 3) koja pokazuje retencijsko vrijeme od 12,920 minuta na valnoj duljini  $\lambda=320$  nm (Slika 13). Regresijskom analizom određena je jednačba baždarnog pravca:  $y = 5230,9x - 40,33$  gdje  $y$  predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a  $x$  masu ferulične kiseline u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednačbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,03 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,08 \mu\text{g/ml}$ .



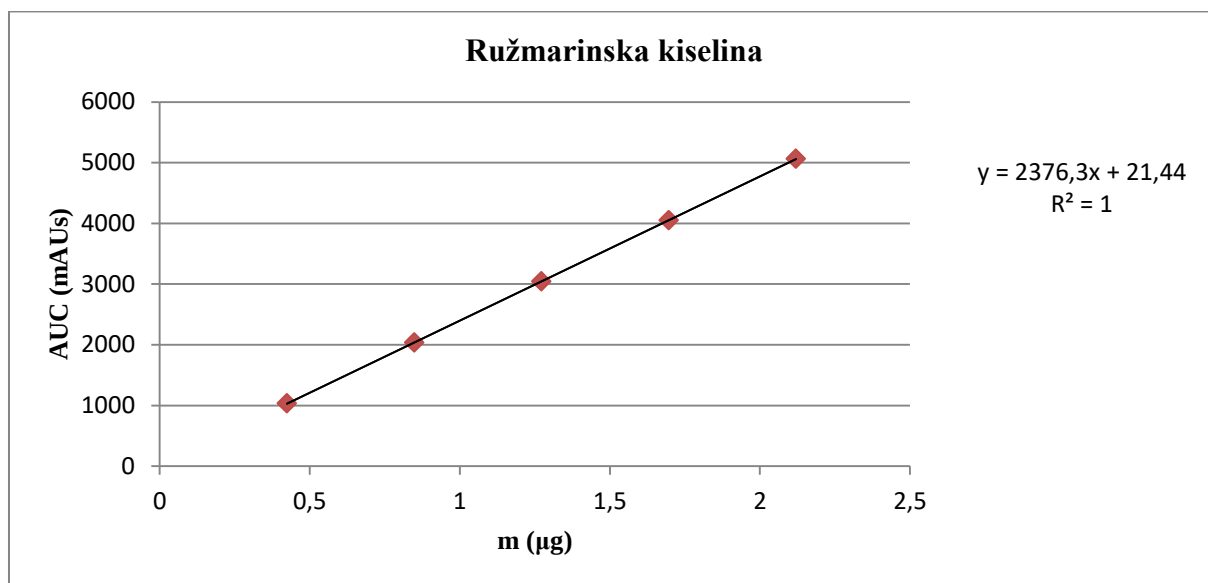
Graf 3. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi ferulične kiseline



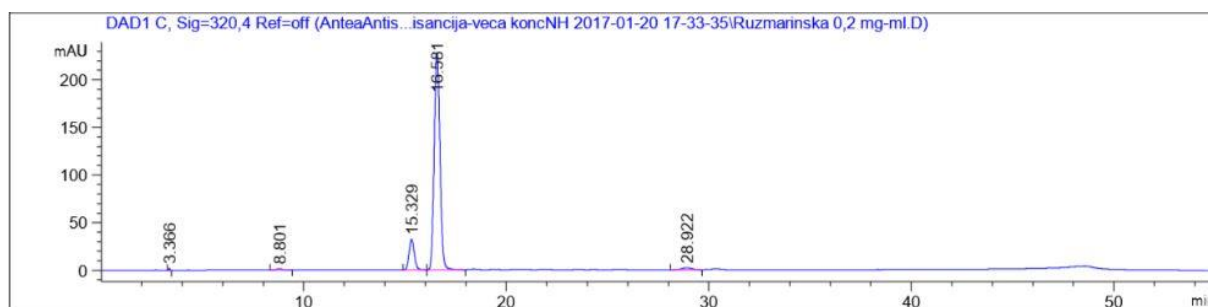
Slika 13. Kromatogram standarda ferulične kiseline.

#### 4.1.4 Ružmarinska kiselina

Izrađen je baždarni pravac za ružmarinsku kiselinu (Graf 4) koja pokazuje retencijsko vrijeme od 16,581 minuta na valnoj duljini  $\lambda=320$  nm (Slika 14). Regresijskom analizom određena je jednadžba baždarnog pravca:  $y = 2376,3x + 21,44$ , gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu ružmarinske kiseline u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednadžbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,003 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,01 \mu\text{g/ml}$ .



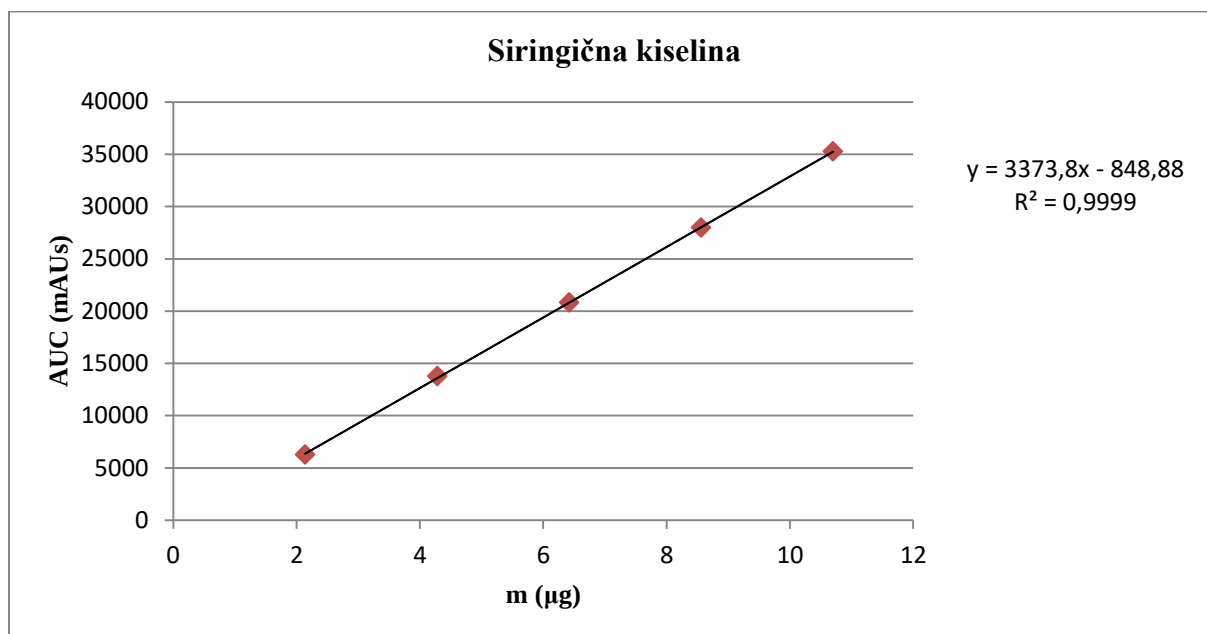
Graf 4. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi ružmarinske kiseline.



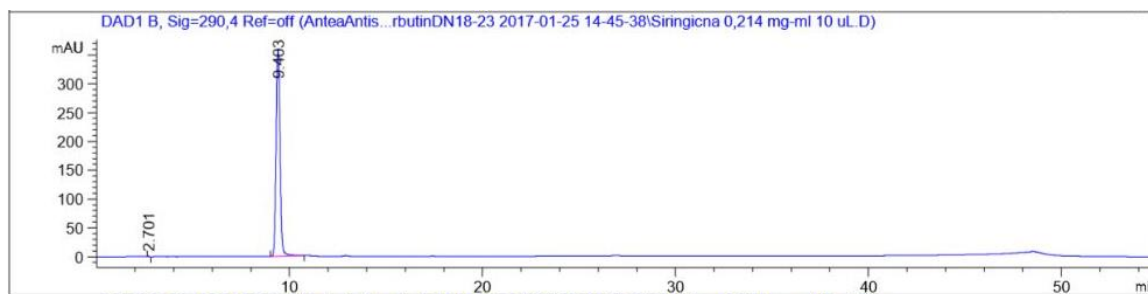
Slika 14. Kromatogram standarda ružmarinske kiseline.

#### 4.1.5 Siringična kiselina

Izrađen je baždarni pravac za siringičnu kiselinu (Graf 5) koja pokazuje retencijsko vrijeme od 9,403 minute na valnoj duljini  $\lambda=290$  nm (Slika 15). Regresijskom analizom određena je jednadžba baždarnog pravca:  $y = 3373,8x - 848,88$ , gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu siringične kiseline u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednadžbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,019 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,059 \mu\text{g/ml}$ .



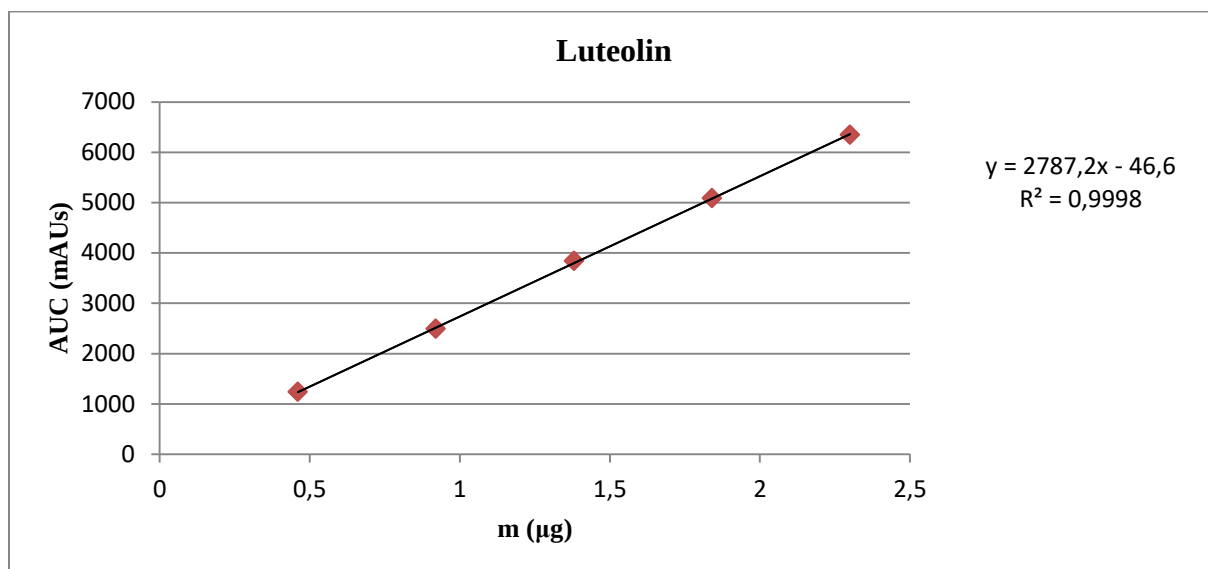
Graf 5. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi siringične kiseline.



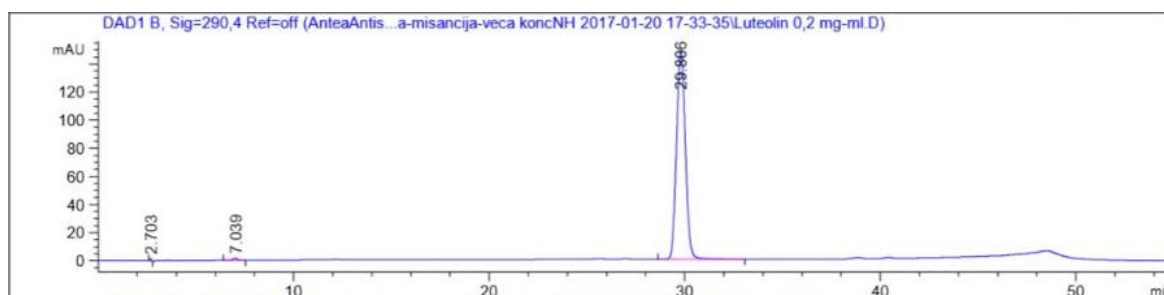
Slika 15. Kromatogram standarda siringične kiseline.

#### 4.1.6 Luteolin

Izrađen je baždarni pravac za luteolin (Graf 6) koji pokazuje retencijsko vrijeme od 29,806 minuta na valnoj duljini  $\lambda=290$  nm (Slika 16). Regresijskom analizom određena je jednačba baždarnog pravca:  $y = 2787,2x - 46,6$ , gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu luteolina u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednačbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,025 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,077 \mu\text{g/ml}$ .



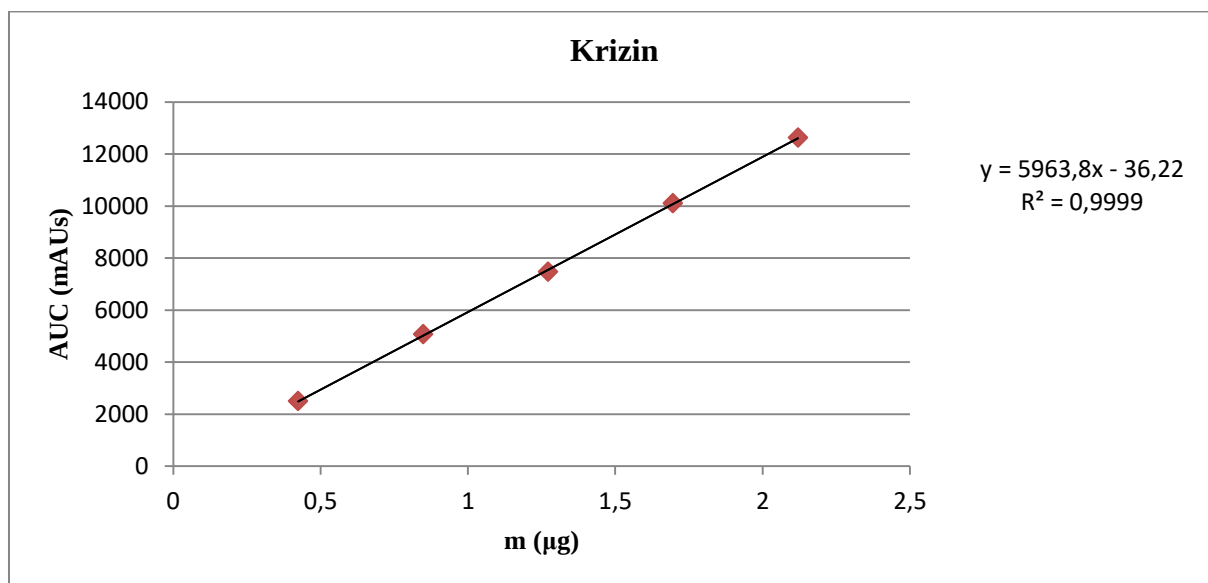
Graf 6. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi luteolina.



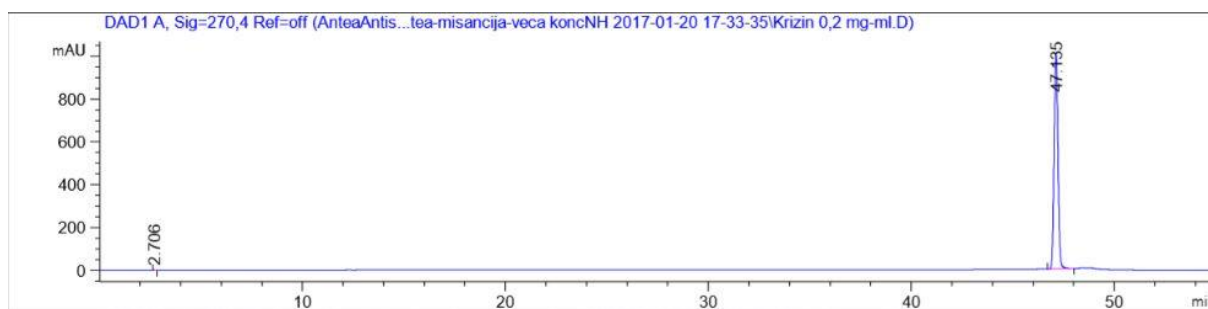
Slika 16. Kromatogram standarda luteolina.

#### 4.1.7 Krizin

Izrađen je baždarni pravac za krizin (Graf 7) koji pokazuje retencijsko vrijeme od 47,153 minute na valnoj duljini  $\lambda=270$  nm (Slika 17). Regresijskom analizom određena je jednadžba baždarnog pravca:  $y = 5963,8x - 36,22$ , gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu krizina u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednadžbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,022 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,066 \mu\text{g/ml}$ .



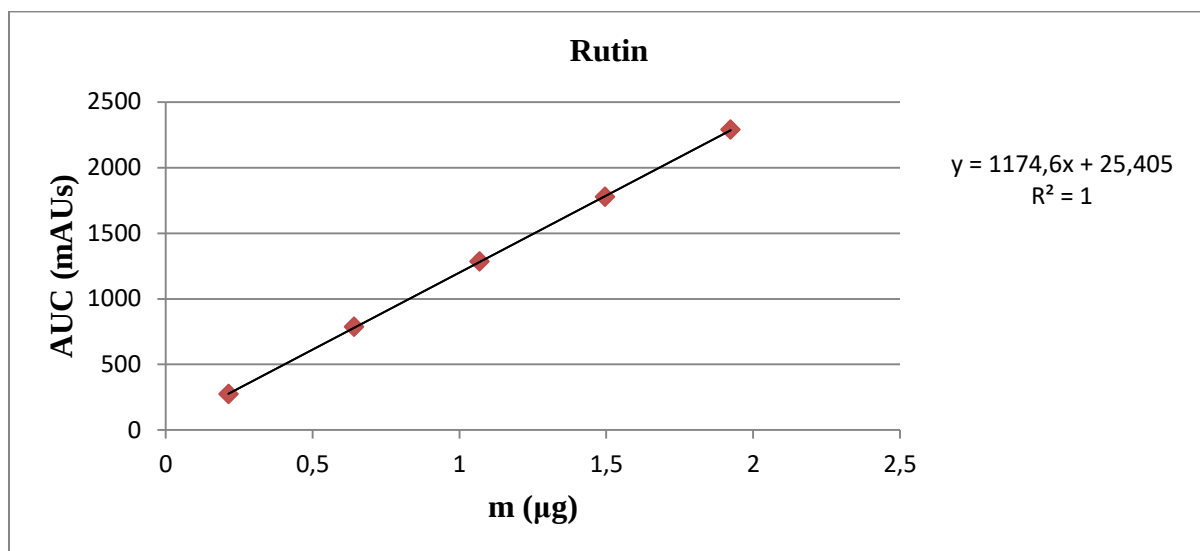
Graf 7. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi krizina



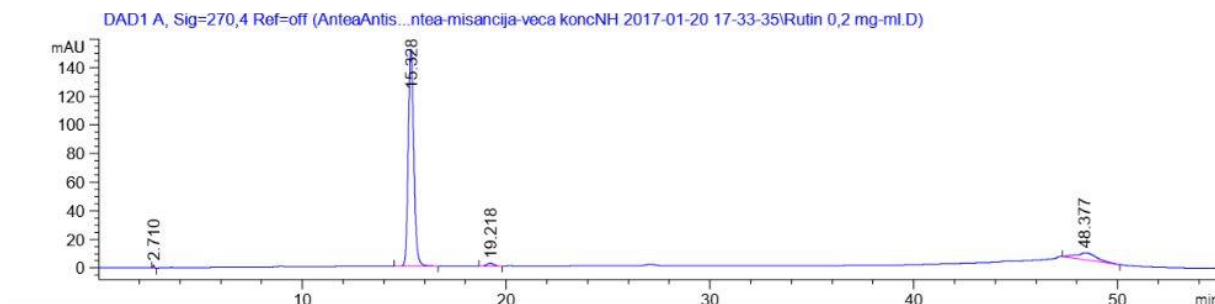
Slika 17. Kromatogram standarda krizina.

#### 4.1.8 Rutin

Izrađen je baždarni pravac za rutin (Graf 8) koji pokazuje retencijsko vrijeme od 15,328 minuta na valnoj duljini  $\lambda=270$  nm (Slika 18). Regresijskom analizom određena je jednadžba baždarnog pravca:  $y = 1174,6 + 25,405$  gdje y predstavlja površinu ispod kromatografskog pika, a x masu rutina u  $\mu\text{g}$ . Limiti detekcije i određivanja izračunati su na temelju prethodno navedenih jednadžbi te su dobivene sljedeće vrijednosti: LOD iznosi  $0,013 \mu\text{g/ml}$ , a LOQ iznosi  $0,039 \mu\text{g/ml}$ .



Graf 8. Baždarni pravac ovisnosti površine ispod krivulje o masi rutina.



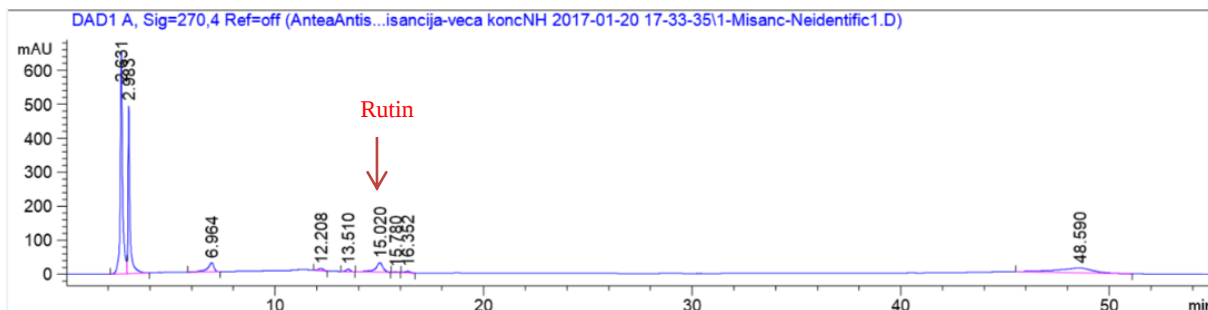
Slika 18. Kromatogram standarda rutina

## 4.2 KVANTITATIVNA ANALIZA POLIFENOLA U UZORCIMA

### 4.2.1 Uzorak 1

HPLC analiza Uzorka 1 te usporedba dobivenog kromatograma (Slike 19 i 20) sa kromatogramima standarada (Slike 11, 13, 14 i 18.)

i usporedba UV spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u uzorku bile prisutne klorogenska, ferulična, ružmarinska kiselina i rutin. Klorogenska kiselina je bila prisutna u količini od 3,91 mg/g uzorka, ferulična u količini od 0,44 mg/g, a ružmarinska kiselina u količini od 0,76 mg/g uzorka. Rutin je bio prisutan u količini od 2,87 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.

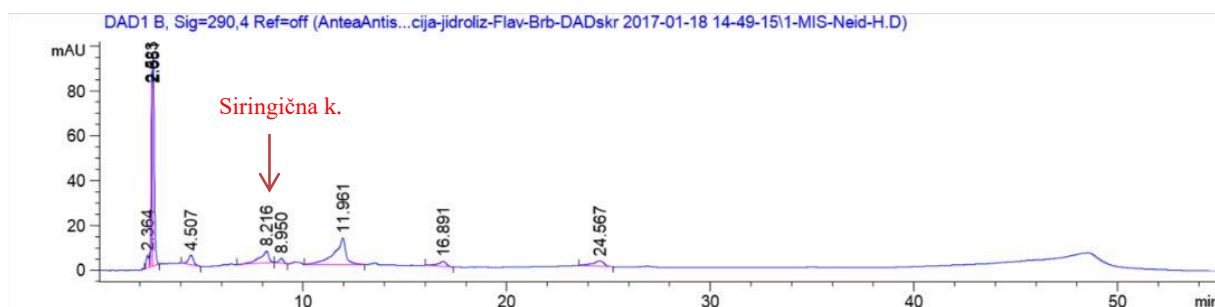


Slika 19. Kromatogram Uzorka 1 (270 nm).

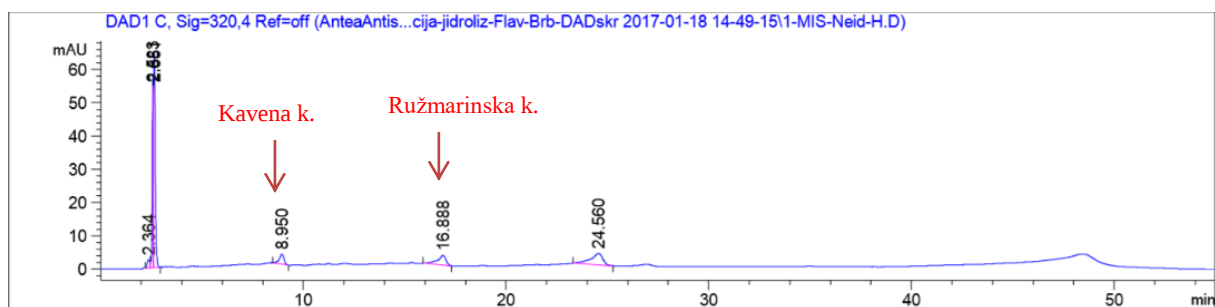


Slika 20. Kromatogram Uzorka 1 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 1 u mišanciji te usporedba dobivenog kromatograma (Slike 21 i 22) s kromatogramom standarada (Slike 12, 14 i 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u uzorku prisutne fenolne kiseline, odnosno, kavena, ružmarinska i siringična kiselina. Kavena kiselina je prisutna u količini od 1,53 mg/g uzorka, ružmarinska u količini od 0,69 mg/g, dok siringična ima u količini od 7,80 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 21. Kromatogram Uzorka 1 nakon hidrolize (290 nm).

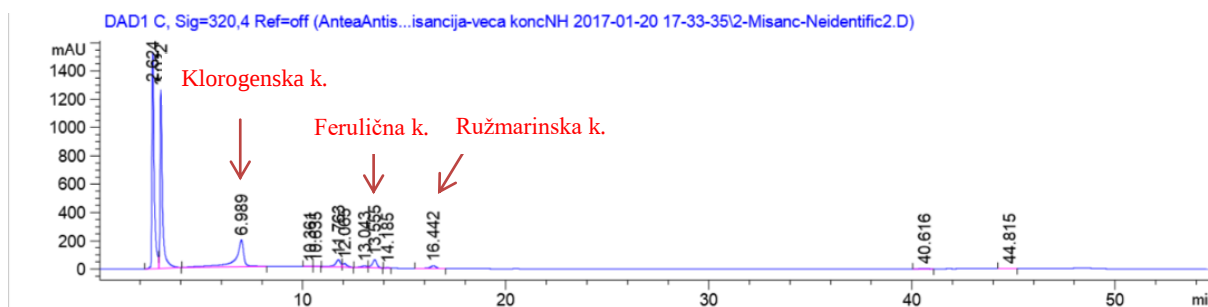


Slika 22. Kromatogram Uzorka 1 nakon hidrolize (320 nm).

U Uzorku 1 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehnična, vanilinska, p-kumarna, galna kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin te krizin.

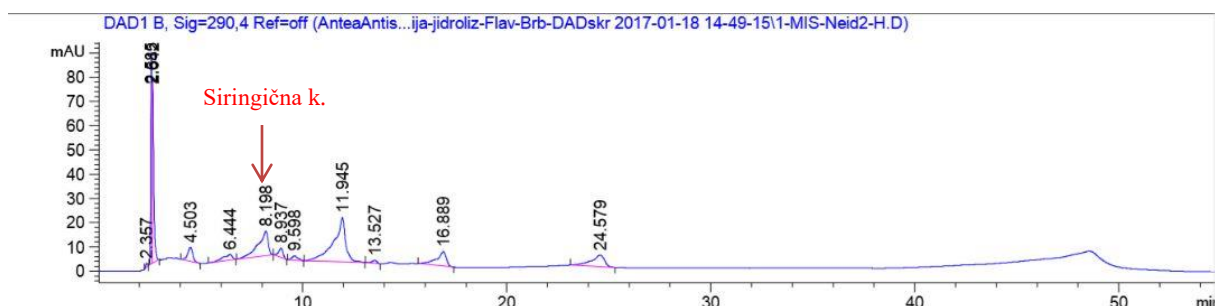
#### 4.2.2 Uzorak 2

HPLC analiza Uzorka 2 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 23) sa kromatogramima standarada (Slike 11, 13, 14) i usporedba UV spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u uzorku bile prisutne klorogenska, ferulična i ružmarinska kiselina. Klorogenska kiselina je bila prisutna u količini od 7,23 mg/g, ferulična u količini od 0,62 mg/g, a ružmarinske kiseline je bilo 0,58 mg/g. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.

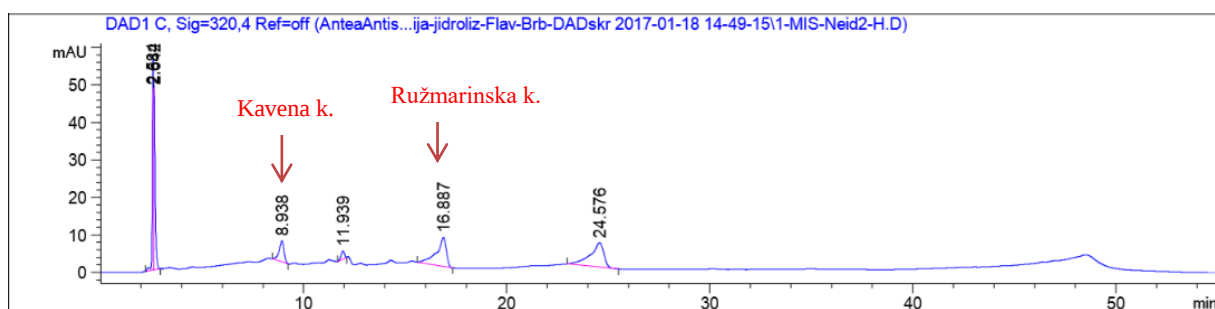


Slika 23. Kromatogram Uzorka 2 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 2 te usporedba dobivenog kromatograma (Slike 24, 25) s kromatogramom standarada (12, 14, 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo kavene, ružmarinske i siringične kiseline. Kavene kiseline je bilo prisutno 0,8 mg/g uzorka, ružmarinske 1,77 mg/g, dok je siringične kiseline bilo prisutno 6,34 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 24. Kromatogram Uzorka 2 nakon hidrolize (290 nm).

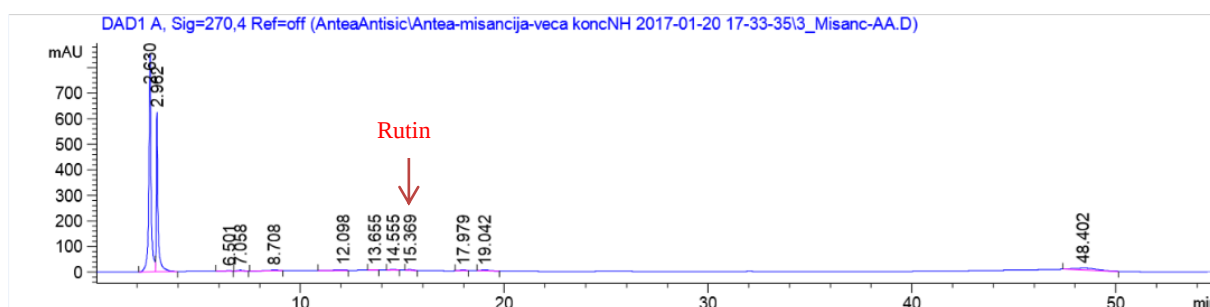


Slika 25. Kromatogram Uzorka 2 nakon hidrolize (320 nm).

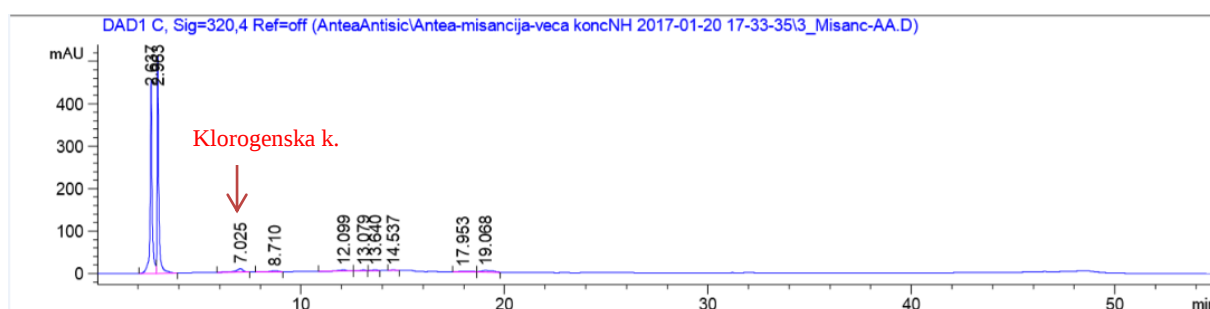
U Uzorku 2 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehnična, vanilinska, p-kumarna, galna kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, krizin te rutin.

### 4.2.3 Uzorak 3

HPLC analiza Uzorka 3 te usporedba dobivenog kromatograma (Slike 26 i 27) sa kromatogramima standarada (Slike 11 i 18) i usporedba UV spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je da su u uzorku bile prisutne klorogenska kiselina i rutin. Klorogenske kiseline je bilo u prisutnosti od 0,22 mg/g, dok je rutina bilo u količini od 0,03 mg/g uzorka. Iznos klorogenske kiseline ulazi u granice LOD-a i LOQ-a, dok je navedeni iznos za rutin ne ulazi u granice za LOQ.

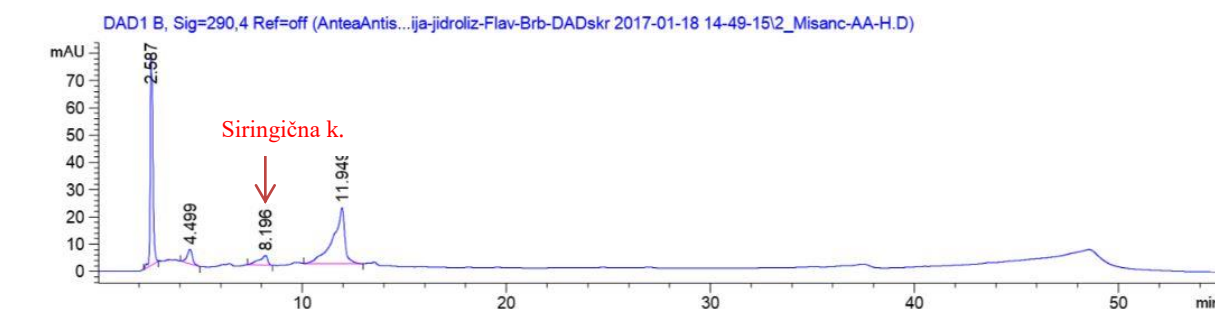


Slika 26. Kromatogram Uzorka 3 (270 nm).



Slika 27. Kromatogram Uzorka 3 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 3 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 28) s kromatogramom standarada (Slika 15) i usporedba UV spektara pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo siringične kiseline u količini od 6,95 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOQ-a.

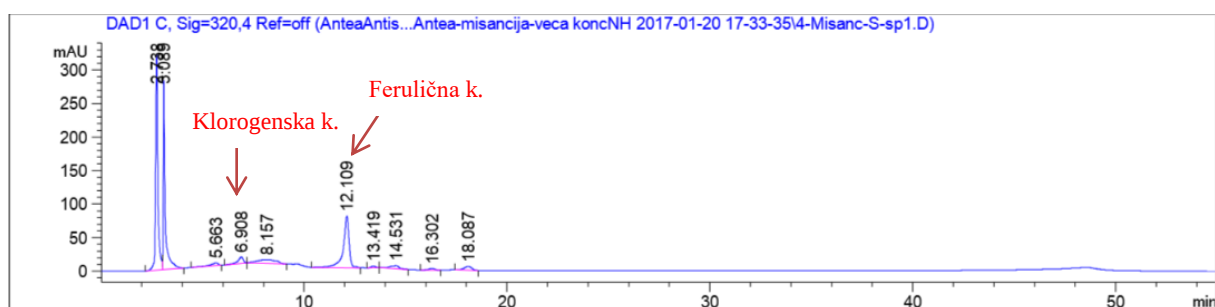


Slika 28. Kromatogram Uzorka 3 nakon hidrolize (290 nm).

U Uzorku 3 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehnična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena, ferulična, ružmarinska kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin te krizin.

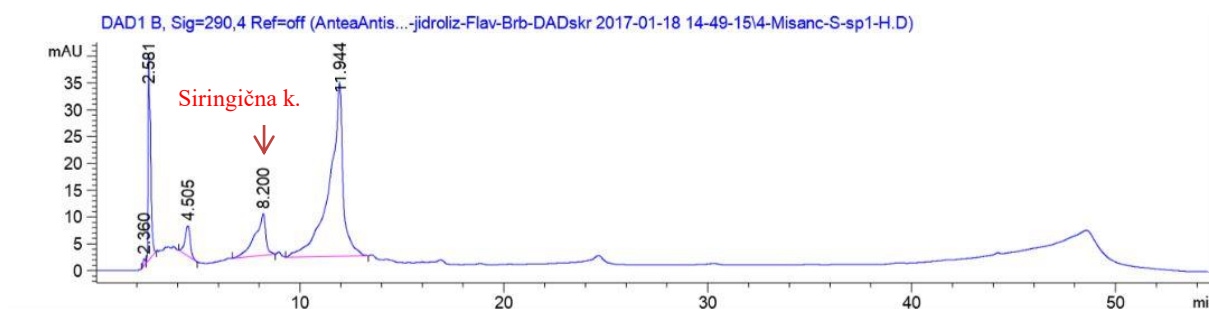
#### 4.2.4 Uzorak 4

HPLC analiza Uzorka 4 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 29) s kromatogramom standarada (Slike 11, 13) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo fenolnih kiseline i to klorogenske i ferulične kiseline. Klorogenska kiselina je bila u količini od 0,18 mg/g, dok je ferulične kiseline bilo u količini od 1,52 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 29. Kromatogram Uzorka 4 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 4 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 30) s kromatogramom standarada (Slika 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo siringične kiseline i to u količini od 8,43 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOQ-a.

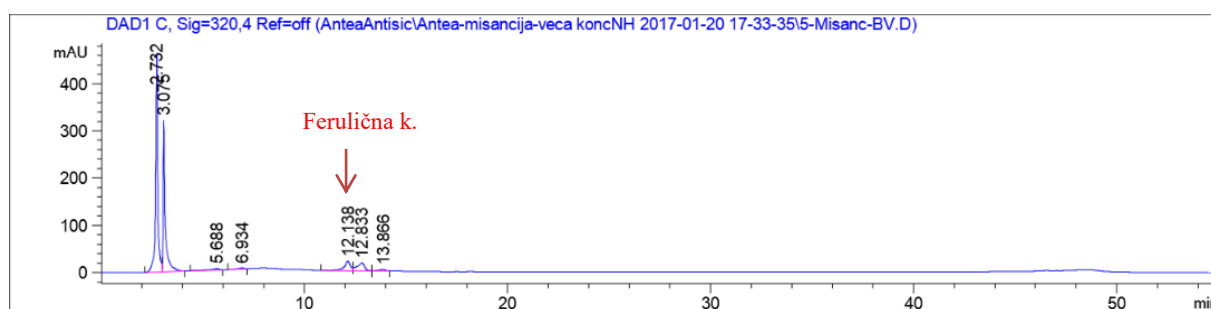


Slika 30. Kromatogram Uzorka 4 nakon hidrolize (290 nm).

U Uzorku 4 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehuična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena, ružmarinska kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, rutin te krizin.

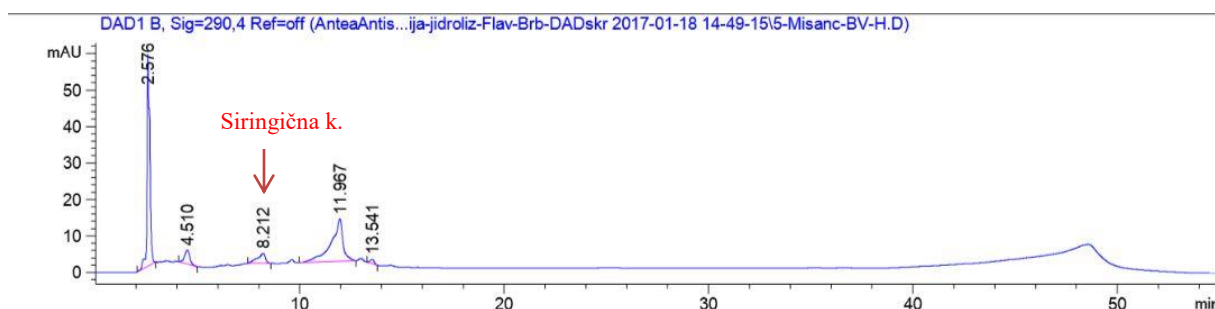
#### 4.2.5 Uzorak 5

HPLC analiza Uzorka 5 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 31) s kromatogramom standarada (Slika 13) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo ferulične kiseline u količini od 0,43 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 31. Kromatogram Uzorka 5 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 5 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 32) s kromatogramom standarada (Slika 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutnost siringične kiseline u količini od 6,50 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOQ-a.

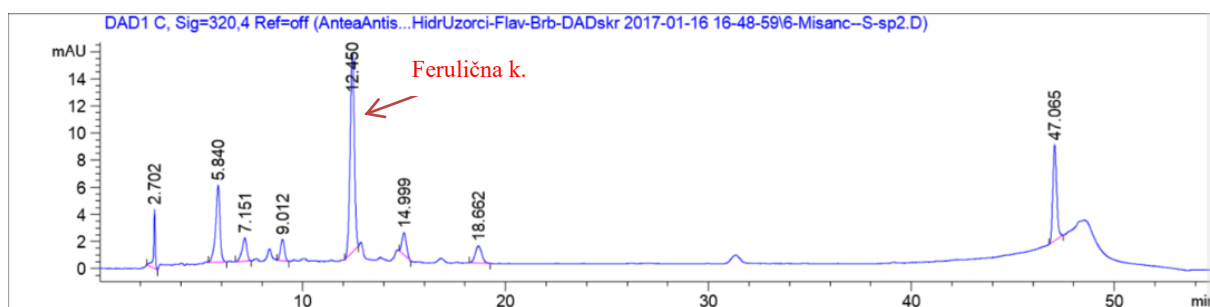


Slika 32. Kromatogram Uzorka 5 nakon hidrolize (290 nm).

U Uzorku 5 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehuična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena, klorogenska, ružmarinska kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, rutin te krizin.

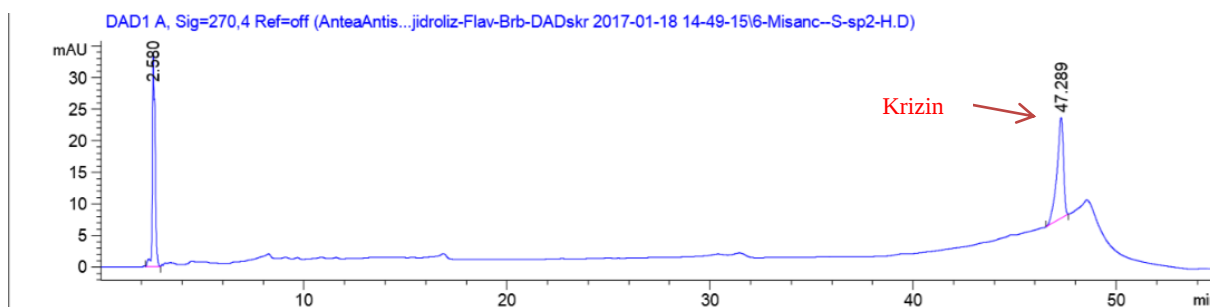
#### 4.2.6 Uzorak 6

HPLC analiza Uzorka 6 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 33) s kromatogramom standarada (Slika 13) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo ferulične kiseline u količini od 1,84 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOD-a i LOQ-a.

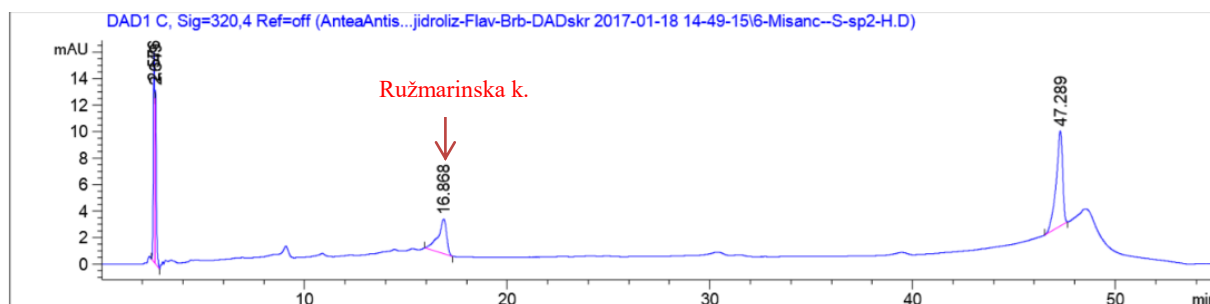


Slika 33. Kromatogram Uzorka 6 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 6 i usporedba dobivenog kromatograma (Slika 34 i 35) s kromatogramom standarada (Slike 14 i 17) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo krizina i ružmarinske kiseline. Krizin je bio prisutan u količini od 3,48 mg/g uzorka, dok je ružmarinske kiseline bilo 0,97 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 34. Kromatogram Uzorka 6 nakon hidrolize (270 nm).



Slika 35. Kromatogram Uzorka 6 nakon hidrolize (320 nm).

U Uzorku 6 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehnična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena, klorogenska, siringična kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin te rutin.

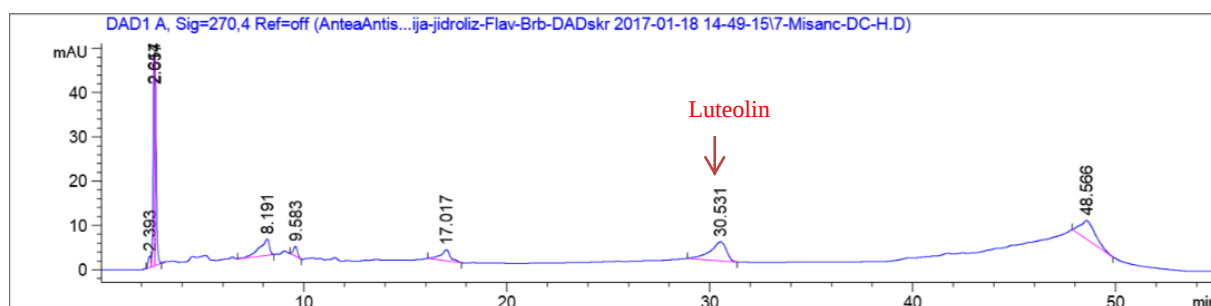
#### 4.2.7 Uzorak 7

HPLC analiza Uzorka 7 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 36) s kromatogramom standarada (Slika 11) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo klorogenske kiseline i to 34,69 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOD-a i LOQ-a.

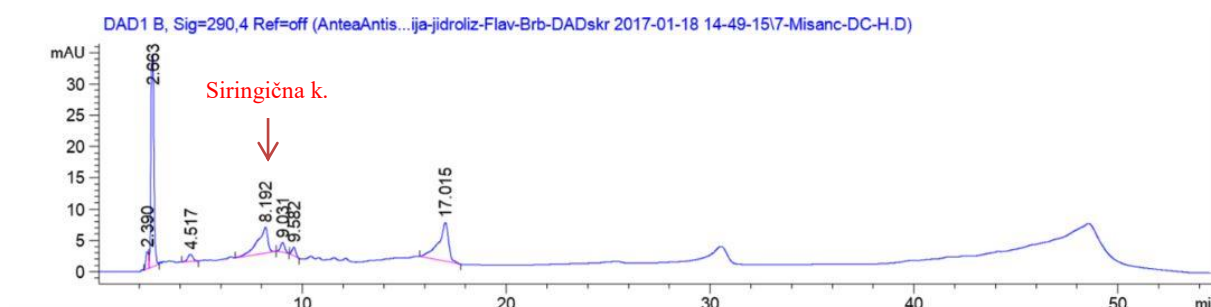


Slika 36. Kromatogram Uzorka 7 (320 nm).

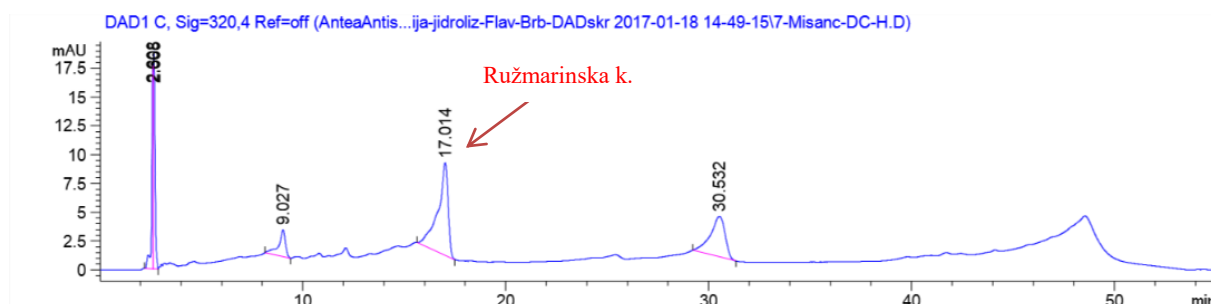
HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 7 te usporedba dobivenog kromatograma (Slike 37, 38 i 39) s kromatogramom standarada (Slike 14, 15, 16) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo luteolina, sirinjične i ružmarinske kiseline. Luteolin je bio prisutan u količini od 3,01 mg/g, sirinjična u količini od 10,09 mg/g, dok je ružmarinske kiseline bilo prisutno 2,83 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 37. Kromatogram Uzorka 7 nakon hidrolize (270 nm).



Slika 38. Kromatogram Uzorka 7 nakon hidrolize (290 nm).



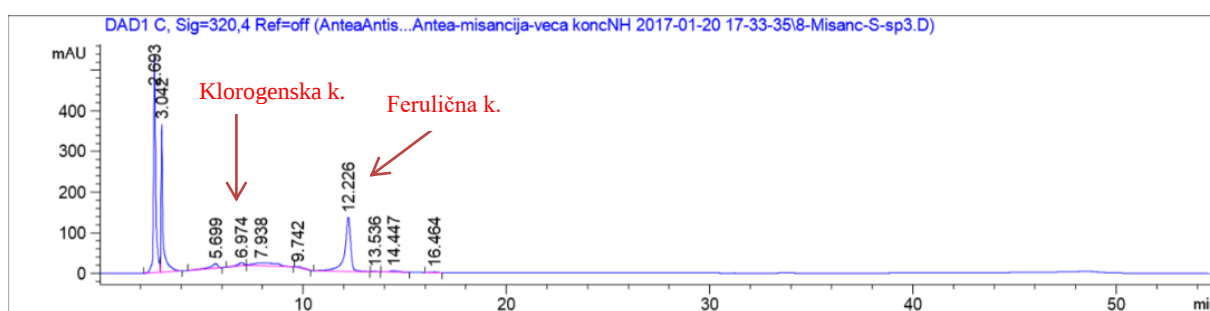
Slika 39. Kromatogram Uzorka 7 nakon hidrolize (320 nm).

U Uzorku 7 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehuična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena, ferulična kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin,

kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, rutin te krizin.

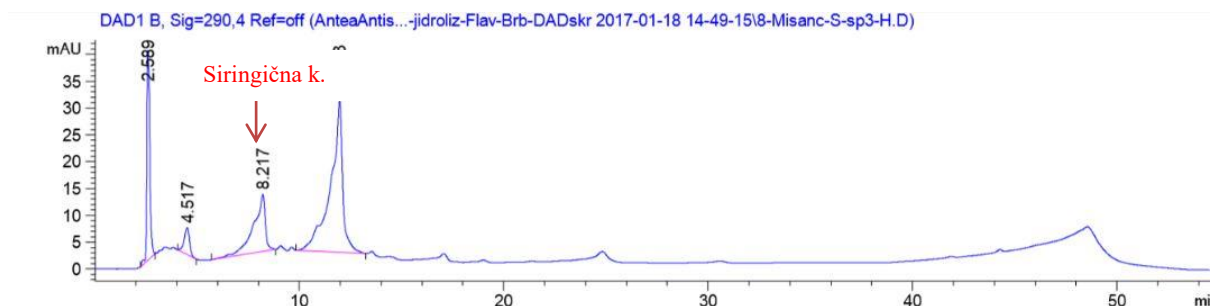
#### 4.2.8 Uzorak 8

HPLC analiza Uzorka 8 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 40) s kromatogramom standarada (Slike 11 i 13) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo klorogenske i ferulične kiseline. Klorogenske je bilo 0,11 mg/g, dok je ferulične kiseline bilo prisutno 2,63 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 40. Kromatogram Uzorka 8 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 8 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 41) s kromatogramom standarada (Slika 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo siringične kiseline u količini od 9,54 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOQ-a.



Slika 41. Kromatogram Uzorka 8 nakon hidrolize (290 nm).

U Uzorku 8 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehuična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena, ružmarinska kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin,

kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, rutin te krizin.

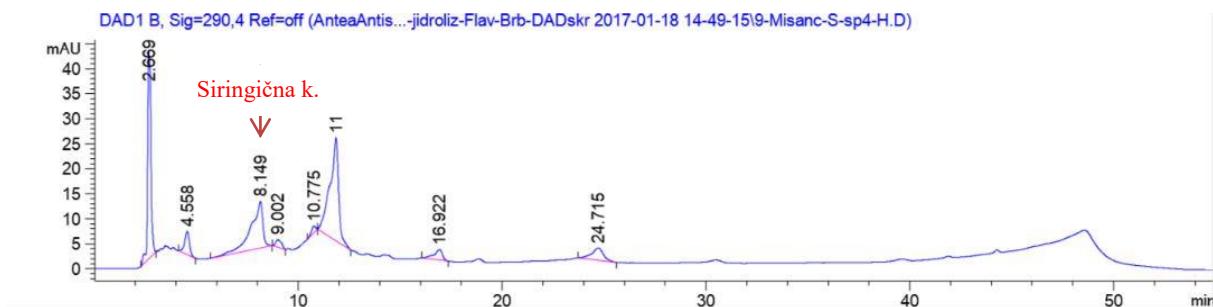
#### 4.2.9 Uzorak 9

HPLC analiza Uzorka 9 (Slika 42) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarada (Slike 11, 13, 14) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo fenolnih kiselina i to: klorogenske, ferulične i ružmarinske kiseline. Klorogenska kiselina se nalazila u količini od 0,71 mg/g, ferulična u količini 5,07 mg/g, a ružmarinske kiseline je bilo prisutno 0,13 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 42. Kromatogram Uzorka 9 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 9 (Slika 43) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarada (Slika 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo siringične kiseline u količini od 9,37 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOQ-a.



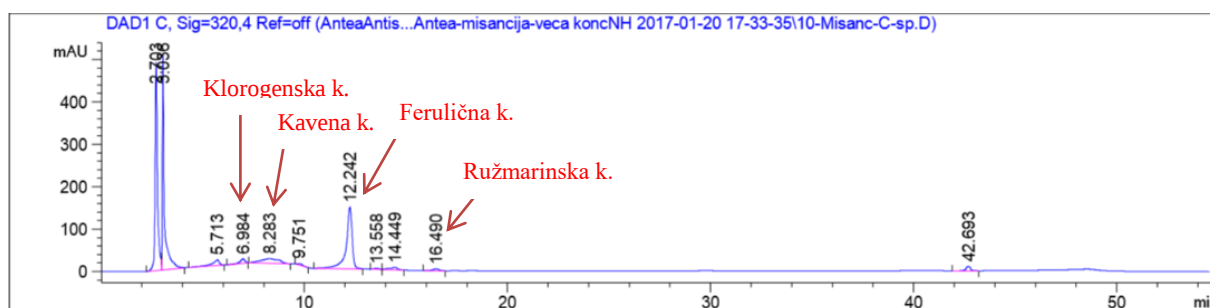
Slika 43. Kromatogram Uzorka 9 nakon hidrolize (290 nm).

U Uzorku 9 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehuična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin

hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, rutin te krizin.

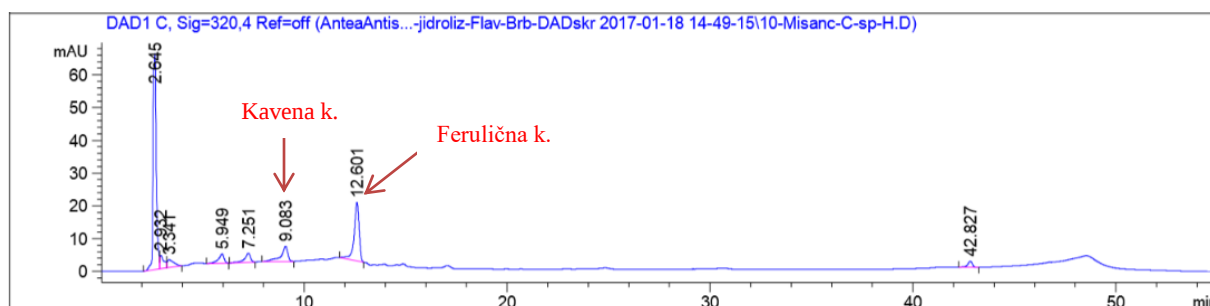
#### 4.2.10 Uzorak 10

HPLC analiza Uzorka 10 (Slika 44), te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarada (Slike 11, 12, 13, 14) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo fenolnih kiselina: klorogenske, kavene, ferulične i ružmarinske kiseline. Klorogenske kiseline je bilo 0,18 mg/g, kavene 0,66 mg/g, dok je ferulična kiselina bila prisutna u količini od 2,59 mg/g, a ružmarinska u količini od 0,13 mg/g uzorka. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 44. Kromatogram Uzorka 10 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 10 (Slika 45) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarada (Slike 12 i 13) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo kavene i ferulične kiseline. Kavena kiselina se nalazila u količini od 0,17 mg/g, dok je ferulične kiseline bilo 0,29 mg/g. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.

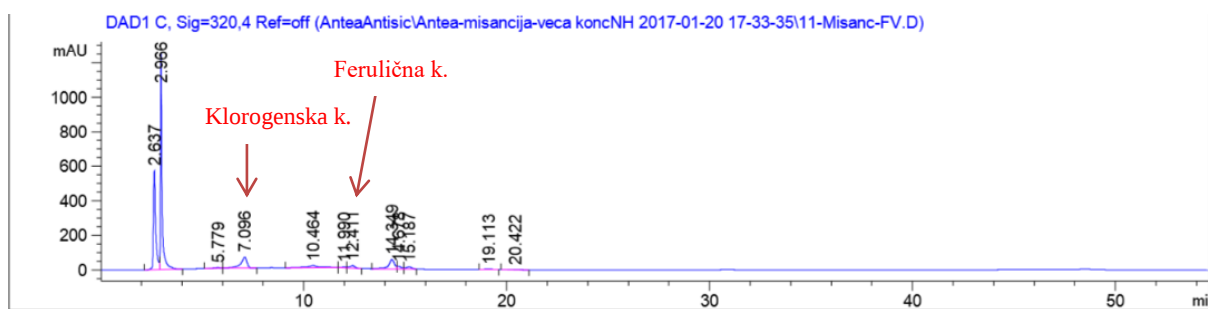


Slika 45. Kromatogram Uzorka 10 nakon hidrolize (320 nm).

U Uzorku 10 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehnična, vanilinska, p-kumarna, galna, siringična kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, rutin te krizin.

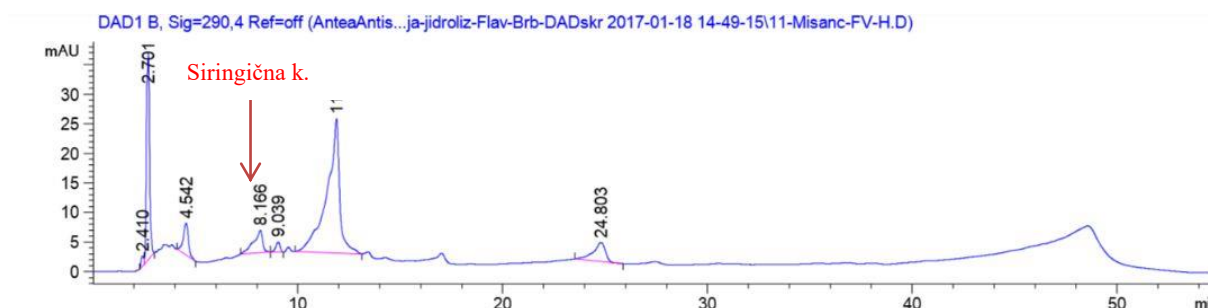
#### 4.2.11 Uzorak 11

HPLC analiza Uzorka 11 te usporedba dobivenog kromatograma (Slika 46) s kromatogramom standarada (Slike 11 i 13) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo klorogenske i ferulične fenolne kiseline. Klorogenske kiseline je bilo u količini od 2,22 mg/g, a ferulične kiseline 0,24 mg/g. Navedeni iznosi ulaze u granice LOD-a i LOQ-a.



Slika 46. Kromatogram Uzorka 11 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 11 (Slika 47) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarada (Slika 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo siringične kiseline u količini od 6,39 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOQ-a.

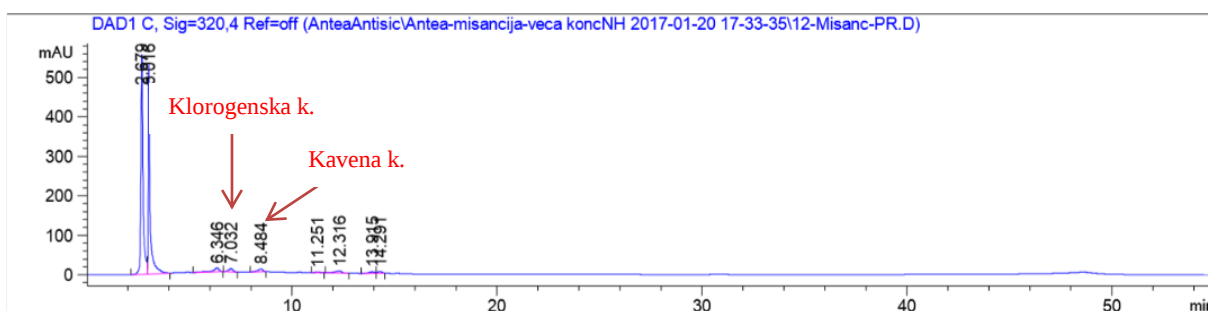


Slika 47. Kromatogram Uzorka 11 nakon hidrolize (290 nm).

U Uzorku 11 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehnična, vanilinska, p-kumarna, galna, kavena, ružmarinska kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, rutin te krizin.

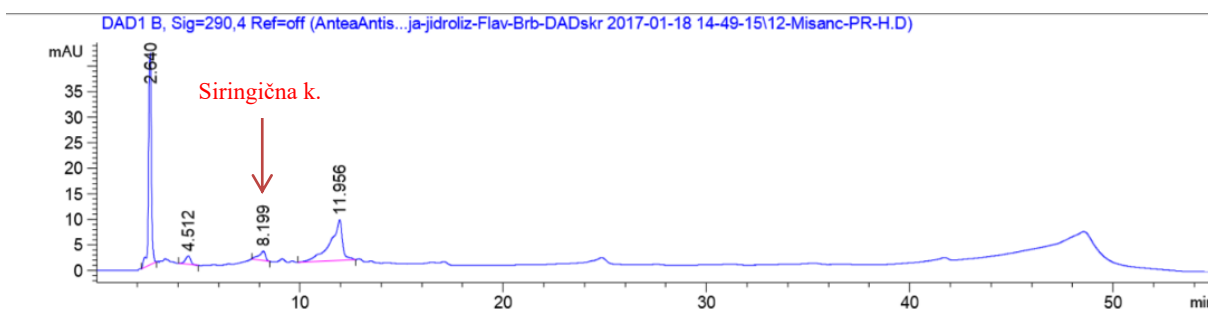
#### 4.2.12 Uzorak 12

HPLC analiza Uzorka 12 (Slika 48), te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarada (Slike 11 i 12) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo klorogenske i kavene kiseline. Klorogenska kiselina se nalazila u količini od 0,10 mg/g, a kavene kiseline je bilo 0,17 mg/g uzorka. Navedeni iznos za klorogensku kiselinu ne ulazi u granicu za LOQ, dok iznos za kavenu kiselinu se nalazi unutar granica LOD-a i LOQ-a.



Slika 48. Kromatogram Uzorka 12 (320 nm).

HPLC analiza hidroliziranog Uzorka 12 (Slika 49) te usporedba dobivenog kromatograma s kromatogramom standarada (Slika 15) i usporedba UV spektra pripadajućih kromatografskih pikova, pokazala je prisutstvo siringične kiseline u količini od 6,55 mg/g uzorka. Navedeni iznos ulazi u granice LOQ-a.



Slika 49. Kromatogram Uzorka 12 nakon hidrolize (290 nm).

U Uzorku 12 nisu pronađene trans-cimetna, elagična, sinapična, protokatehnična, vanilinska, p-kumarna, galna, ferulična, ružmarinska kiselina, kao ni katehin hidrat, naringenin, kvercitrin hidrat, izokvercitrin, apigenin, galangin, arbutin, fisetin, hesperitin, kemferol, baikalein, luteolin, rutin te krizin.

## 5. RASPRAVA

Analizom dobivenih rezultata može se uočiti da je hidroliza ekstrakata bila potpuna, jer u nehidroliziranim uzorcima nije pronađen niti jedan flavonoidni aglikon. Međutim, kvercetin, koji je aglikon rutina, nije bio pronađen u hidroliziranom Uzorku 1 niti u Uzorku 3, gdje je bio prisutan rutin. Pretpostavlja se da je razlog odsutnosti kvercetina oksidacijska razgradnja pri visokim temperaturama korištenim prilikom hidrolize. Uočava se prisutnost kavena kiselina u hidroliziranim ekstraktima poput Uzorka 1, Uzorka 2 te Uzorka 10 u kojima su, prije hidrolize, bile prisutne klorogenska ili ružmarinska kiselina, koje su esteri kavena kiselina. Prisutnost kavena kiselina nije potvrđena u hidroliziranim ekstraktima Uzorka 3, Uzorka 4, Uzorka 6, Uzorka 7, Uzorka 8, Uzorka 9 i Uzorka 12. Time se može pretpostaviti da je pri uvjetima hidrolize došlo do njene razgradnje. U Uzorku 1, Uzorku 2, Uzorku 6 i Uzorku 7, nakon hidrolize, nađena je i ružmarinska kiselina što može ukazivati na nepotpunu hidrolizu uzorka.

Mnoge studije povezuju konzumaciju klorogenske kiselina (CGA) sa širokim rasponom zdravstvenih dobrobiti poput neuroprotektivnog, kardioprotektivnog, kemopreventivnog djelovanja, protuupalne aktivnosti, gubitka tjelesne mase, smanjenjem krvnog tlaka, hipoglikemijskog, anksiolitičkog i antihiperalgezijskog učinka. Klorogenska kiselina je potentan antioksidans, prisutan u određenoj hrani i piću. Raznim istraživanjima implicira se da primjena CGA ima antihipertenzivan učinak. Metaboliti CGA-e djeluju na reaktivne kisikove specije, smanjujući oksidativni stres, čime poboljšavaju endotelnu funkciju i bioraspoloživost NO u arterijama. Rezultat je redukcija krvnog tlaka (Zhao i sur., 2012). Ingestijom CGA, smanjuje se NADPH-ovisna produkcija superoksidnih aniona u aorti što govori o inhibitornom djelovanju CGA na aktivnost vaskularne NADPH oksidaze. Značajno je poboljšana acetilkolin-inducirana vazodilatacija endotela aorte. Rezultat je atenuacija endotelne disfunkcije, vaskularne hipertrofije i hipertenzije kod spontano-hipertenzivnih štakora (Suzuki i sur., 2006). O antihipertenzivnom učinku CGA-e govori i provedeno kliničko istraživanje na 203 osobe pri čemu je pokazana značajna korelacija između povećanog udjela CGA-e i smanjenja krvnog tlaka (Yamaguchi i sur., 2008). Klorogenskoj kiselini pripisuje se djelovanje slično metforminu jer stimulira unos glukoze u inzulin-osjetljive i rezistentne adipocite poput roziglitazona, a za razliku od inzulina i tiazolidindiona, ne dovodi do povećanja mase. Također, promatranjem vrijednosti glukoze OGTT-om, primjećeno je da se prethodnom ingestijom CGA smanjuje pik glukoze u plazmi, najvjerojatnije radi smanjenja intestinalne apsorpcije glukoze, čime se reducira rizik razvoja

DMT2 (Meng i sur., 2013). U ispitivanju na štakorima, klorogenska kiselina je dovela do značajnog sniženja plazmatskih koncentracija kolesterola i triglicerida za 44% i 58%, kao i jetrenih triglicerida za 24%, dok značajnijih razlika, u koncentracijama triglicerida u adipocitima, nema. Također, u *in vitro* ispitivanjima, CGA dovodi do smanjenja razine LDL-kolesterola i malondialdehida. Klorogenska kiselina je također pokazala u brojnim istraživanjima povoljan učinak, inhibirajući lipidnu apsorpciju, transformaciju te inhibirajući intestinalnu apsorpciju kolesterola, međutim, većina navedenih ispitivanja su provedena na životinjama, zbog čega bi se učinkovitost primjene CGA kao hipolipemika, trebala još preispitati i u kliničkim istraživanjima kako bi se procijenile njene terapijske mogućnosti (Meng i sur., 2013). Osim tih učinaka primjećeni su još također i protuupalni te neuroprotektivni učinci CGA (Shin i sur., 2015, Heitman i Ingram, 2017).

Kvercetin i kavena kiselina (CA), te njezini derivati, poput klorogenske kiseline, ispitivani su u liječenju hipertenzije preko renin-angiotenzin-aldosteron sustava (RAAS) u usporedbi sa standardnim farmakološkim ACE-inhibitorom, kaptoprilom. Rezultat je pokazao malu inhibitornu učinkovitost CA-e i njenih derivata na navedene mete u odnosu na kaptopril koji se pokazao naj snažnijim inhibitorom RAAS-a. Međutim, za razliku od kaptoprila, toksikološka analiza na humanim fibroblastima potvrdila je netoksično djelovanje kavena kiseline i njenih derivata čime se ostavlja prostora za dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti procijenio njezin terapijski potencijal (Bhullar i sur., 2014). Provedena je klinička studija na 103 pacijenta sa primarnom trombocitopenijom ( $PLT > 10 \times 10^9/L$ ) i ispitivala se učinkovitost primjene CA-e u liječenju. Povećan broj trombocita je ostvaren u 51% ispitanika. U 103 ispitanika, zabilježena su 2 slučaja prolaznih nuspojava i to blaga mučnina te povišena vrijednost jetrenih enzima. Rezultat analize je pokazao da je CA učinkovita u pacijenata s primarnom trombocitopenijom (Qin i sur., 2015). Kavena kiselina je pokazala antidijabetički učinak na animalnom modelu. Provedeno je također i istraživanje na humanim endotelnim stanicama kojim se pokazalo da CA suprimira nekoliko aspekata endotelne disfunkcije uzrokovane povišenom glukozom i to preko modulacije unutarstaničnog redox potencijala. Takvo otkriće upućuje da su fiziološke koncentracije CA, dostupne konzumacijom prikladne hrane, sposobne prevenirati endotelne disfunkcije uzrokovane upalima i oksidativnim stresom koji je induciran povišenom koncentracijom glukoze (Fratantonio i sur., 2017). Spominje se i nekolicina istraživanja CA-e u liječenju tumora, no njena uloga je tu više suportivna, omogućavajući bolji profil i bioraspoloživost standardne terapije (Lee i sur., 2016).

Topička primjena antioksidativnih lijekova predstavlja uspješan način zaštite kože od UV-posredovanog oksidativnog oštećenja. Takvi lijekovi omogućavaju koži zadovoljavajuću

zaštitu samo ukoliko su permeabilni kroz stratum corneum te time doprinose do dubljih kožnih slojeva. Ferulična, i u nižem postotku kavena kiselina, imaju svojstvo permeabilnosti kroz stratum corneum. Ferulična kiselina (FA), radi veće lipofilnosti, bolje prolazi kroz stratum corneum od kavene kiseline. Na temelju tih saznanja, provedeno je *in vivo* istraživanje o djelovanju ferulične i kavene kiseline na redukciju UVB-induciranog eritema. Obje kiseline, koje su bile otopljene u zasićenim vodenim otopinama uspjele su postići značajnu zaštitu kože od UVB-induciranog eritema (Saija i sur., 2000). Tijekom proteklih nekoliko godina, nekoliko je studija pokazalo da FA djeluje kao snažan antioksidans koji poboljšava stanični odgovor na stres putem regulacije citoprotektivnog sustava, poput hem oksigenaze-1, proteina toplinskog šoka (HSP-70), izvanstaničnim signalom-regulirane kinaze 1/2 i protoonkogeni Akt. Nadalje, pokazalo se da FA inhibira ekspresiju i / ili aktivnost citotoksičnih enzima, uključujući dušik-oksidi sintazu, kaspaze i ciklooksigenazu-2. Na temelju tih dokaza, FA je predložen kao potencijalni lijek za mnoge bolesti, uključujući Alzheimerovu bolest (Estrada i sur., 2016), rak (Zhang i sur., 2016) i šećernu bolest, gdje se pokazalo na animalnim modelima da snižuje razinu glukoze te potom značajno povišuje razinu inzulina u krvi (Pandey i Rizvi, 2009). Ferulična kiselina i njeni derivati su komponente koje se s vremenom sve više primjenjuju u dermatološkim preparatima za solarnu zaštitu radi sprječavanja, UV-zračenjem uzrokovanog, oštećenja kože (Di domenico i sur., 2009). Međutim, unatoč velikom izobilju prekliničkih istraživanja, samo nekoliko studija je provedeno na ljudima, od kojih je većina koristila hranu koja sadrži FA. Stoga treba provesti dodatna klinička ispitivanja kako bi se mogla dokumentirati efikasnost ovog načina primjene. Potrebni su novi napori i resursi u kliničkim istraživanjima za kompletnu evaluaciju terapijskog potencijala FA u kroničnim bolestima (Mancuso i Santangelo., 2014).

Siringična kiselina (SA) inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu koja probavlja ugljikohidrate do jednostavnih šećera i tako pridonosi održavanju normalne razine šećera u krvi. *In vivo* eksperimentima na štakorima, SA-i se pridaje potencijalna primjena u liječenju dijabetesa radi moduliranja glikemijskog statusa smanjenjem glukoze u plazmi, a potom i povećanjem koncentracije inzulina i C-peptida (Muthukumaran i sur., 2013). Siringična kiselina također pokazuje neuroprotektivno i antioksidacijsko djelovanje te utječe na biokemijske i histopatološke parametre ishemijske ozljede leđne moždine kod štakora te time svoju potencijalnu primjenu mogla naći u profilaksi kod ishemijskih ozljeda leđne moždine (Tokmak i sur., 2015).

Ružmarinska kiselina (RA) pokazuje antioksidacijski učinak i stabilizira stanične membrane te pritom prevenira kemijski uzrokovana oštećenja stanica i stanične DNA (Pérez-

Fons i sur., 2010. Sevgi i sur., 2015), poput oštećenja DNA uzrokovana doksorubicinom i 1,2 dimetilhidrazinom (Furtado i sur.,2010., Furtado i sur.,2015). Pripisuje joj se i antibaktericidni učinak na sojeve poput *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Enterococcus faecali* te se time razmatra njena potencijalna primjena u liječenju infekcija uzrokovanih rezistentnim mikroorganizmima (Abedni i sur., 2013). Poput ferulične i kavene kiseline, također sudjeluje u zaštiti kože od UV-zračenja time što smanjuje oštećenja u humanim keratinocitima uzrokovana UVB zračenjem (Vostálová i sur., 2010). Često se spominje i njena potencijalna protektivna uloga kod raznih neuroloških oboljenja, poput poboljšanja kognitivnih sposobnosti miševa (Park i sur., 2010), zaštitne uloge na neurone prilikom moždanog udara (Fallarini i sur., 2009.) te prevencije razvoja inducirane Alzheimerove bolesti u transgeničnih miševa (Hamaguchi i sur., 2009). U istraživanjima se spominju učinci RA-e na prevenciju atopijskog dermatitisa i drugih upalnih stanja radi smanjivanja produkcije IFN- $\gamma$  te IL-4. Međutim, sva navedena istraživanja za RA-u su provedeni *in vitro* eksperimenti ili pak *in vivo* studije na životinjama, zbog čega bi se trebao povećati broj kliničkih studija kako bi se sa sigurnošću mogao utvrditi potpuni učinak ružmarinske kiseline (Jang i sur., 2011).

Rutin je flavonoidni glikozid poznat po različitim biološkim aktivnostima poput antialergijskog, protuupalnog, antiproliferativnog i antikancerogenog učinka. Osim toga je potentan antioksidans koji osigurava strukturni i funkcionalni integritet stanice. Mehanizam se temelji na hvatanju slobodnih kisikovih radikala, inhibiciji ksantin oksidaze i posljedično, zaustavljanju lančane reakcije oksidativnog stresa. Povećava produkciju glutaciona i ekspresiju brojnih enzima poput superoksid dismutaze i katalaze. Iz tog razloga, njegov terapijski potencijal leži u prevenciji brojnih stanja, uzrokovanih oksidativnim stresom, poput dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Također, štiti organe od oksidativnog oštećenja tijekom radijacije i kemoterapije te ublažava njihove nuspojave. Rutin i njegovi derivati posjeduju također pleiotropan protuupalni učinak. Različitim studijama prikazana je njegova značajna redukcija proupalnih markera poput COX-2 i indukcija NO-sintaze ([www.drrathresearch.org](http://www.drrathresearch.org)). Tradicionalno, rutin se kristi za poboljšanje cirkulacije. Smatra se da povećava fleksibilnost krvnih žila - arterija i kapilara. Poboljšava određena stanja, poput modrica, pauk vena i proširenih vena. Postoje naznake da rutin može pomoći u liječenju hemoroida i pridonosi oporavku od hemoroidektomije. Istraživanja na animalnim modelima pokazuju da rutin prevenira stvaranje krvnih ugrušaka te time pridonosi u snižavanju rizika određenih stanja poput: srčanog udara, plućne embolije te duboke venske tromboze. Ublažava bol kod artritisa što se temelji na istraživanju koje je je pokazalo

suprimirajući učinak rutina na oksidativni stres u ljudi sa artritisom zahvaljujući njegovim protuupalnim i antioksidativnim značajkama ([www.healthline.com](http://www.healthline.com)). U kombinaciji sa bromelainom i tripsinom, primjenjuje se za ublažavanje boli kod osteoartritisa te poboljšanja koljena u osoba s artritisom, čime se postiže učinak jednako djelotvoran kao NSAID, diklofenak. Istraživanja su pokazala da su rutin i kvercetin su sposobni reducirati rizik i osigurati značajnu zaštitu od pojave tumora. Međutim, većina studija je provedena *in vitro* ili pak na animalnim modelima iz čega je teško donijeti zaključak o učinkovitosti rutina u prevenciji, zaštiti i liječenju tumora, ali bi se svakako trebalo potaknuti daljnja istraživanja (<http://www.webmd.com>).

Luteolinu se pridaju različita biološka djelovanja, poput protuupalnog, antialergijskog i antitumorskog djelovanja, što se pripisuje njegovom antioksidativnom, odnosno pro-oksidativnom svojstvu. Takva djelovanja su međusobno povezana. Primjerice, protuupalna aktivnost je povezana sa antitumorskim djelovanjem, dok antitumorsko djelovanje je povezano sa indukcijom apoptoze te inhibicijama stanične proliferacije, metastaza i angiogeneze. Time je u raznim istraživanjima zabilježena značajna uloga luteolina u prevenciji razvoja karcinoma. Luteolin, kao prirodni polifenol, spada u skupinu fitoestrogena koji imaju svojstvo vezanja na estrogenske receptore (ER) i može se primjenjivati u hormonskoj nadomjesnoj terapiji. S druge strane, postoje studije koje govore o antiestrogenskom djelovanju luteolina radi slabe estrogenske aktivnosti koja se javlja nakon vezanja za ER. Luteolin se veže za ER tek kad je estrogen deficijentan. Takvo saznanje daje prostora za istraživanje uloge luteolina u estrogen-induciranim tumorima poput karcinoma dojke, jajnika, endometrija i prostate (Lin i sur., 2008). U jednom istraživanju na štakorima se ispitala neuroprotektivna uloga luteolina te se pokazalo da luteolin može zaštititi od kognitivnog oštećenja induciranog amiloid- $\beta$  proteinom u Alzheimerovoj bolesti tako što regulira kolinergički sustav i inhibira oksidativne ozljede. Takav rezultat sugerira potencijalnu učinkovitost luteolina u terapiji Alzheimerove bolesti, međutim, potrebno je provesti klinička istraživanja (Yu i sur., 2015). Provedena je također studija o hipoglikemijskom učinku luteolina gdje je prikazano djelovanje luteolina na smanjenje aktivnosti NF- $\kappa$ B i oslobađanje citokina. S obzirom da u stanju hiperglikemije dolazi do induciranja histona, aktivacije NF- $\kappa$ B i otpuštanja proupalnih citokina, može se zaključiti da luteolin pokazuje protuupalnu i posljedično tim, hipoglikemijsku aktivnost (Kim i sur., 2014). Također, pokazano je da suplementacija niske doze luteolina poboljšava inzulinsku rezistenciju i djeluje povoljno na pretilost (Xu i sur., 2014).

Krizin pokazuje potentan inhibitorni učinak na produkciju estrogena i ne dovodi do ekspresije aromataze. Zaključak te studije je da su polifenoli sposobni modulirati aktivnost aromataze i time sinteze estrogena te kao takvi mogu biti korisni u prevenciji/liječenju estrogen-induciranih poremećaja (Monteiro i sur., 2006). Međutim, jedna *in vivo* provedena studija govori o nemogućnosti inhibicije aromataze radi slabe apsorpcije i bioraspoloživosti flavonoida, među kojima se promatrao i krizin (Saarinen i sur., 2001). Također, brojne studije na dijabetičkim štakorima, pokazuju je da krizin, kao agonist PPAR- $\gamma$ , popravljajući miokardijalne ozljede zahvaljujući svom antioksidativnom i protuupalnom djelovanju (Rani i sur., 2016) kao i dijabetičke komplikaciju u jetri, mozgu i gušterači (Samarghandian i sur., 2016). Također je zabilježena i smanjena sinteza melanina radi suprimiranja ekspresije melanogenetskih proteina što potvrđuje inhibirajući učinak krizina na melanogenezu. Time bi, uz dodatna klinička ispitivanja, krizin bi svoju potencijalnu primjenu mogao naći kao funkcionalan kozmetički agens (Zhu i sur., 2016).

Sva ova istraživanja upućuju da postoji potencijal povoljnog djelovanja sastavnica ispitivanih u ovom radu na prevenciju, zaštitu te i liječenje organizma od brojnih današnjih bolesti. S obzirom da su u ovom radu ispitivane biljke koje se tradicionalno koriste u prehrani, može se reći da uporaba tih biljnih vrsta ima i terapijski potencijal. Međutim, većina studija provedenih na ovim sastavnicama su *in vitro* i studije na animalnim modelima, dok je jako malo kliničkih studija. Također, apsorpcija i bioraspoloživost polifenola znatno ovise o namirnici u kojoj su prisutni kao i o metaboličkoj varijabilnosti pojedinca. Stoga je nužno provesti još kliničkih studija koje bi razjasnile preventivnu/terapijsku opravdanost uporabe polifenolnih spojeva u navedenim bolestima.

## 6. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je odrediti kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola prisutnih u ekstraktima biljaka: *Allium ampeloprasum*, *Beta vulgaris*, *Daucus carota*, *Foeniculum vulgare*, *Papaver rhoeas*, u vrstama roda *Sonchus spp.* i *Crepis spp.* te dvjema neidentificiranim biljkama. Navedene biljne vrste se već godinama na Mediteranu koriste zajedno u prehrani pod nazivom "mišancija".

Ispitivanjem nehidroliziranih biljnih uzoraka, utvrđena je prisutnost flavonoidnog glikozida, rutina u divljem luku i jednoj neidentificiranoj biljnoj vrsti, a nađene su i fenolne kiseline (klorogenska, ferulična, ružmarinska i kavena kiselina). Klorogenska kiselina se nalazila u gotovo svakoj ispitivanoj biljnoj vrsti (osim u divljoj repi i jednoj vrsti kostriša), kao i ferulična kiselina (izuzev divljeg luka, divlje mrkve i divljeg maka). Ružmarinska kiselina je pronađena u jednoj vrsti kostriša, dimku te dvjema neidentificiranim biljkama, dok je kavena kiselina bila prisutna u dimku i divljem maku. Među hidroliziranim uzorcima, najzastupljenija je bila sirinđična kiselina koja se nalazila u svim ispitivanim biljnim vrstama, osim u dimku i jednoj vrsti kostriša. Kavena kiselina je pronađena u dimku i dvjema neidentificiranim vrstama, dok je ružmarinska kiselina prisutna u divljoj mrkvi, vrsti kostriša i dvjema neidentificiranim biljkama. Opaženi su i flavonoidni aglikoni, krizin u jednoj vrsti kostriša i luteolin u divljoj mrkvi.

Mehanizmi djelovanja pojedinih polifenolnih sastavnica su ispitani i dokazani u brojnim istraživanjima, te se može pretpostaviti da tradicionalna uporaba "mišancije" ima pogodne učinke na očuvanje ljudskog zdravlja zahvaljujući polifenolima. Međutim, da bi se njihova učinkovitost u terapiji pojedinih bolesti opravdala, potrebno je provesti detaljnije kliničke studije.

## 7. LITERATURA

Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Rivière C, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C, Hennebelle T. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 1-11.

Bhullar KS, Lassalle-claux G, Touaibia M, Rupasinghe HP. Antihypertensive effect of caffeic acid and its analogs through dual renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Eur J Pharmacol*, 2014, 730, 125-32.

Bystrická J, Kavalcová P, Musilová J, Vollmannová A, Töth T, Lenková M. Carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.) as source of antioxidants. *Acta agricul Slovenica*, 2015, 105, 304.

Clifford T, Howatson G, West DJ, Stevenson EJ. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients*. 2015, 7, 2801-22.

Čović D, Bojić M, Medić-Šarić M. Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farm Glas*, 2009, 693-704.

Dawid C, Dunemann F, Schwab W, Nothnagel T, Hofmann T. Bioactive C<sub>17</sub>-Polyacetylenes in Carrots (*Daucus carota* L.): Current Knowledge and Future Perspectives. *J Agric Food Chem*, 2015, 63, 9211-22.

Del rio D, Rodriguez-mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18, 1818-92.

Di domenico F, Perluigi M, Foppoli C, et al. Protective effect of ferulic acid ethyl ester against oxidative stress mediated by UVB irradiation in human epidermal melanocytes. *Free Radic Res*, 2009, 43, 365-75.

Essa MM, Akbar M, Guillemin G, The Benefits of Natural Products for Neurodegenerative Diseases, *Springer*, 2016, 232.

Estrada M, Herrera-arozamena C, Pérez C, et al. New cinnamic - N-benzylpiperidine and cinnamic - N,N-dibenzyl(N-methyl)amine hybrids as Alzheimer-directed multitarget drugs with antioxidant, cholinergic, neuroprotective and neurogenic properties. *Eur J Med Chem*, 2016, 121, 376-86.

Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoruso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in *in vitro* models of neuronal death. *Br J Pharmacol*, 2009, 157, 1072-1084.

Fratantonio D, Speciale A, Canali R, et al. Low nanomolar caffeic acid attenuates high glucose-induced endothelial dysfunction in primary human umbilical-vein endothelial cells by affecting NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways. *Biofactors*, 2017, 43, 54-62.

Furtado RA, de Araújo FR, Resende FA, Cunha WR, Tavares DC. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *J Appl Toxicol*, 2010, 30, 254–259.

Furtado RA, Oliveira BR, Silva LR, Cleto SS, Munari CC, Cunha WR, Tavares, DC. Chemopreventive effects of rosmarinic acid on rat colon carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*, 2015, 24, 106-112.

Govindaraj J, Sorimuthu Pillai S. Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protect pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin- induced diabetes rats. *Mol Cell Biochem*, 2015, 143-59.

Guarrera PM, Savo V. Perceived health properties of wild and cultivated food plants in local and popular traditions of Italy: A review. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(3), 659-80.

Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol*, 2009, 175, 2557-2565.

Heitman E, Ingram DK. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutr Neurosci*, 2017, 20, 32-39.

Jang AH, Kim TH, Kim GD, Kim JE, Kim HJ, Kim SS, Jin YH, Park YS, Park CS. Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11, 1271-1277.

Kapiszewska M, Sołtys E, Visioli F, Cierniak A, Zajac G. The protective ability of the Mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56, 183-97.

Karaismailoglu M. C. Morphological and anatomical features of cypsela of some crepis taxa (asteraceae) from turkey and their taxonomic importance, *Pak. J. Bot*, 2015, 47, 1473-1480.

Karakteristike roda *Sonchus* spp., 2008., <http://www.pfaf.org>, pristupljeno 10. 03. 2017.

Karakteristike vrste *Allium ampeloprasum*, L., 2008., <http://www.pfaf.org>, pristupljeno 10. 03. 2017.

Karakteristike vrste *Beta vulgaris*, L., 2010., <http://www.missouribotanicalgarden.org>, pristupljeno 13. 03. 2017.

Karakteristike vrste *Papaver rhoeas*, L., 2008., <http://www.pfaf.org>, pristupljeno 24. 03. 2017.

Karakteristike rutina, 2015., <https://www.drrathresearch.org> pristupljeno 31. 03. 2017.

Khan RA. Evaluation of flavonoids and diverse antioxidant activities of *Sonchus arvensis*. *Chem Cent J*, 2012, 6, 126.

Kim HJ, Lee W, Yun JM. Luteolin inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production and its epigenetic mechanism in human monocytes. *Phytother Res*, 2014, 28, 1383-1391.

Kim TH, Kim HJ, Lee SH, Kim SY. Potent inhibitory effect of *Foeniculum vulgare* Miller extract on osteoclast differentiation and ovariectomy-induced bone loss. *Int J Mol Med*. 2012, 29, 1053-9.

Kuštrak D. Farmakognozija-fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str. 253-261.

Lee J, Kim KS, Na K. Caffeic acid-coated multifunctional magnetic nanoparticles for the treatment and bimodal imaging of tumours. *J Photochem Photobiol*, 2016, 160, 210-6.

Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008, 8, 634-46.

Łuczaj Ł, Zovkokončić M, Miličević T, Dolina K, Pandža M. Wild vegetable mixes sold in the markets of Dalmatia (southern Croatia). *J Ethnobiol Ethnomed*, 2013, 9, 2.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2012, str. 204, 222-224.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.

Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol*, 2014, 65, 185-95.

Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 457-801.

Monteiro R, Azevedo I, Calhau C. Modulation of aromatase activity by diet polyphenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 2006, 54, 3535-40.

Muthukumaran J, Srinivasan S, Venkatesan RS, Ramachandran V, Muruganathan U. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. *J Acut Dis*, 2013, 304- 309.

Nigović B. i sur. Analitika lijekova-praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135, 137-138.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 270-8.

Park DH, Park SJ, Kim JM, Jung WY, Ryu JH. Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia*, 2010, 81, 644-648.

Pérez-Fons L, Garzón MT, Micol V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 161-171.

Picon PD, Picon RV, Costa AF, et al. Randomized clinical trial of a phytotherapeutic compound containing *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Sambucus nigra*, and *Cassia augustifolia* for chronic constipation. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10, 17.

Podaci o suplementima rutina, 2007., <http://www.webmd.com>, pristupljeno 31. 03. 2017.

Potencijalna zdravstvena učinkovitost rutina, 2017., <http://www.healthline.com>, pristupljeno 31. 03. 2017.

Qin P, Wei Y, Hou M, Zhao C, Shen Z. A multicenter clinical trial of caffeic acid tablet in treatment of 103 primary immune thrombocytopenia patients. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2015, 36, 103-6.

Raal A, Orav A, Arak E. Essential oil composition of *Foeniculum vulgare* Mill. fruits from pharmacies in different countries. *Nat Prod Res*, 2012, 26, 1173-8.

Rani N, Bharti S, Bhatia J, Nag TC, Ray R, Arya DS. Chrysin, a PPAR- $\gamma$  agonist improves myocardial injury in diabetic rats through inhibiting AGE-RAGE mediated oxidative stress and inflammation. *Chem Biol Interact*, 2016, 250, 59-67.

Saarinen N, Joshi SC, Ahotupa M, et al. No evidence for the *in vivo* activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 78, 231-9.

Saija A, Tomaino A, Trombetta D, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm*, 2000, 199, 39-47.

Samarghandian S, Azimi-nezhad M, Samini F, Farkhondeh T. Chrysin treatment improves diabetes and its complications in liver, brain, and pancreas in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94, 388-93.

Sansanelli S, Tassoni A. Wild food plants traditionally consumed in the area of Bologna (Emilia Romagna region, Italy). *J Ethnobiol Ethnomed*, 2014, 10, 69.

Sarris J, McIntyre E, Camfield DA. Plant-based medicines for anxiety disorders, Part 1: a review of preclinical studies. *CNS Drugs*, 2013, 27, 207-19.

Schafner W, Häfelfinger B, Ernst B. Ljekovito bilje – Kompendij. Rijeka, LEO-COMMERCE d.o.o., 2004, str. 24-25.

Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol*, 2015, 77, 12-21.

Shin HS, Satsu H, Bae MJ, et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem*, 2015, 168, 167-75.

Shin JY, Sohn J, Park KH. Chlorogenic acid decreases retinal vascular hypermeability in diabetic rat model. *J Korean Med Sci*, 2013, 608-13.

Shivashankara K.S, Acharya S.N. Bioavailability of Dietary Polyphenols and the Cardiovascular Diseases. *Open Nutraceuticals J*, 2010, 227-241.

Suzuki A, Yamamoto N, Jokura H, et al. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2006, 24, 1065-73.

Todorova T, Pesheva M, Gegan F, Chankova S. Antioxidant, antimutagenic, and anticarcinogenic effects of *Papaver rhoeas* L. extract on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Med Food*, 2015, 18, 460-7.

Tokmak M, Yuksel Y, Sehitoglu MH, et al. The Neuroprotective Effect of Syringic Acid on Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Inflammation*, 2015, 38, 1969-78.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije 1. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2008, str 18-21.

Vostálová J, Zdarilová A, Svobodová A. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302, 171-181.

Xia DZ, Yu XF, Zhu ZY, Zou ZD. Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus* spp.) in China. *Nat Prod Res*, 2011, 25, 1893-901.

Xu N, Zhang L, Dong J, et al. Low-dose diet supplement of a natural flavonoid, luteolin, ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58, 1258-68.

Yamaguchi T, Chikama A, Mori K, et al. Hydroxyhydroquinone-free coffee: a double-blind, randomized controlled dose-response study of blood pressure. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008, 18, 408-14.

Yu TX, Zhang P, Guan Y, Wang M, Zhen MQ. Protective effects of luteolin against cognitive impairment induced by infusion of A $\beta$  peptide in rats. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8, 6740-7.

Yuan Z, Zhang JP, Yang C. Study on the effects of ferulic acid on the vascular smooth muscle cell migration *in vitro*. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2012, 32, 229-33.

Zhang X, Lin D, Jiang R, Li H, Wan J, Li H. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. *Oncol Rep*. 2016, 36, 271-8.

Zhao Y, Wang J, Ballevre O, Luo H, Zhang W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens Res*, 2012, 35, 370-4.

Zhu L, Lu Y, Yu WG, Zhao X, Lu YH. Anti-photoageing and anti-melanogenesis activities of chrysin. *Pharm Biol*, 2016, 54, 2692-2700.

## 8. SAŽETAK/ SUMMARY

U ovom radu korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih kiselina i flavonoida u 12 ekstrakata biljnih vrsta koje se tradicionalno koriste u prehrani u vidu mješavine samoniklog jestivog bilja (mišancija). U ispitivanim biljnim uzorcima pronađene su brojne fenolne kiseline i flavonoidi poput klorogenske, ferulične, ružmarinske i kavene kiseline te rutina. Kako bi se odredila prisutnost pojedinih flavonoidnih aglikona i slobodnih fenolnih kiselina provedena je i kiselna hidroliza uzoraka. U hidroliziranim uzorcima prevladavale su siringična i kavena kiselina te krizin i luteolin. Prisutnost tih polifenola kojima se pripisuju brojna biološka svojstva govori o potencijalnom pozitivnom učinku konzumacije ove tradicionalne mješavine na ljudsko zdravlje.

High performance liquid chromatography (HPLC) was used for qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids in 12 extracts of the edible plant species, traditionally consumed as a mixture (mišancija). In the tested samples, numerous phenolic acids and flavonoids were found, including chlorogenic, ferulic, rosmarinic, caffeic acid and rutin. In order to detect the presence of free phenolic acids and flavonoids, acid hydrolysis was performed. It was found that syringic and caffeic acids were the most prevalent phenolic acids. Flavonoids chrisin and luteolin were also found. The presence of polyphenols, which show numerous biological activities, indicates the potential positive effect of consumption this traditional mixture on human health.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## HPLC analiza polifenola u samoniklim jestivim biljnim vrstama Dalmacije

**Antea Antišić**

### SAŽETAK

U ovom radu korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih kiselina i flavonoida u 12 ekstrakata biljnih vrsta koje se tradicionalno koriste u prehrani u vidu mješavine samoniklog jestivog bilja (mišancija). U ispitivanim biljnim uzorcima pronađene su brojne fenolne kiseline i flavonoidi poput klorogenske, ferulične, ružmarinske i kavene kiseline te rutina. Kako bi se odredila prisutnost pojedinih flavonoidnih aglikona i slobodnih fenolnih kiselina provedena je i kisela hidroliza uzoraka. U hidroliziranim uzorcima prevladavale su siringična i kavena kiselina te krizin i luteolin. Prisutnost tih polifenola kojima se pripisuju brojna biološka svojstva govori o potencijalnom pozitivnom učinku konzumacije ove tradicionalne mješavine na ljudsko zdravlje.

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

Rad sadrži: 54 stranica, 57 grafičkih prikaza, 1 tablica i 73 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku..

Ključne riječi: HPLC, mišancija, dalmatinska prehrana, polifenoli

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Živka Juričić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### HPLC analysis of polyphenols in wild edible plant species of Dalmatia

**Antea Antišić**

#### SUMMARY

High performance liquid chromatography (HPLC) was used for qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids in 12 extracts of the edible plant species, traditionally consumed as a mixture (mišancijska). In the tested samples, numerous phenolic acids and flavonoids were found, including chlorogenic, ferulic, rosmarinic, caffeic acid and rutin. In order to detect the presence of free phenolic acids and flavonoids, acid hydrolysis was performed. It was found that syringic and caffeic acids were the most prevalent phenolic acids. Flavonoids chrisin and luteolin were also found. The presence of polyphenols, which show numerous biological activities, indicates the potential positive effect of consumption this traditional mixture on human health.

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

Thesis includes: 54 pages, 57 figures, 1 table and 73 references. Original is in Croatian language.

Keywords: HPLC, mixture, Dalmatian diet, polyphenols

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Živka Juričić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.