

Fitosteroli koprive (*Urtica dioica* L.)

Robić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:745308>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Katarina Robić

7082/N

FITOSTEROLI KOPRIVE (*URTICA DIOICA* L.)

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma (HRZZ PlantBioPower, IP-01-2018-4924)

Mentor: doc.dr.sc. Maja Repajić

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Fitosteroli koprive (*Urtica dioica* L.)

Katarina Robić, 0058206702

Sažetak: Kopriva sadrži niz biološki aktivnih komponenti u svim dijelovima biljke, čineći ju poželjnom sirovinom za mnoge industrije (farmakološka, prehrambena). Korijen koprive sadrži fitosterole te se zbog povoljnih učinaka koristi kao diuretik i kod problema s prostatom (benigna hiperplazija prostate). Razni čimbenici kao što su klima, tlo, vrijeme branja i dr. utječu na kemijski sastav koprive, stoga je cilj ovoga istraživanja bio izolirati sterole iz uzoraka korijena koprive ubranih na više lokacija u RH te uz primjenu plinske kromatografije (GC-FID, GC-MS) odrediti njihov sastav i koncentracije u uzorcima. Udio ukupnih sterola u uzorcima kretao se od 0,66-0,97 g kg⁻¹ te su se uzorci međusobno razlikovali u udjelu ukupnih sterola obzirom na lokaciju staništa. Također, u svim uzorcima su identificirani sljedeći steroli: kampesterol, kampestanol, stigmasterol, β-sitosterol, Δ⁵-avenasterol, lanosterol, cikloartenol, 24-metilen cikloartenol, etilkolestenol i citrostadienol. Najzastupljeniji sterol u svim uzorcima bio je β-sitosterol, prosječne vrijednosti 79,25 %.

Ključne riječi: β-sitosterol, fitosteroli, korijen, stanište, *Urtica dioica* L.

Rad sadrži: 30 stranica, 9 slika, 5 tablica, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Maja Repajić

Datum obrane: 10. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Phytosterols of stinging nettle (*Urtica dioica* L.)

Katarina Robić, 0058206702

Abstract: Stinging nettle contains a large number of biologically active compounds in all parts of the plant, therefore being a desirable raw material for applications in different industries (pharmacological, food). Nettle root is a source of phytosterols and due to its positive effects is recommended as a diuretic and for the treatment of benign prostatic hyperplasia. Different factors affect the chemical composition of stinging nettle such as climate, soil, harvest time, etc. Therefore, the aim of this study was to isolate the sterols from roots of stinging nettle collected from different parts of Croatia and to determine the composition of sterols as well as their content by gas chromatography (GC-FID, GC-MS). Total sterols content was determined in the range of 0,66-0,97 g kg⁻¹ and samples differentiated in total sterols content upon habitat location. Furthermore, following sterols were isolated from all samples: campesterol, campestanol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, lanosterol, cycloartenol, 24-methylene cycloartenol, ethylcholestenol and citrostadienol. The most abundant sterol in all samples was β -sitosterol, in average content of 79,25%.

Keywords: β -sitosterol, habitat, phytosterols, root, *Urtica dioica* L.

Thesis contains: 30 pages, 9 figures, 5 tables, 38 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Maja Repajić, Assistant Professor

Defence date: July 10th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KOPRIVA	2
2.1.1. Kemijski sastav koprive	3
2.2. FITOSTEROLI	4
2.2.1. Fitosteroli korijena koprive	8
2.2.2. Pozitivni učinci fitosterola korijena koprive	9
2.2.3. Utjecaj okolišnih uvjeta na udio fitosterola korijena koprive	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Rizomi koprive	11
3.1.2. Kemikalije i standardi	12
3.2. METODE RADA	14
3.2.1. Određivanje udjela i sastava sterola	14
3.2.2. Statistička obrada	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH STEROLA	20
4.2. ODREĐIVANJE SASTAVA STEROLA	22
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA	27

1. UVOD

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je dvodomna biljna vrsta velike iskoristivosti i vrlo cijenjena s primjenom u farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji te u ekološkoj poljoprivredi u obliku gnojiva ili insekticida. U narodnoj medicini se koristila za liječenje različitih bolesti kao što su reumatoidni artritis, osteoartritis, infekcije urinarnog trakta, dijabetes, te kao diuretik, antiastmatik, hipoglikemik, antiaterosklerotik i stimulans rasta kose. Također, u različitim dijelovima svijeta koristi se kao dio prehrane zbog svoje hranjive vrijednosti (sadrži vitamine, minerale, flavone, aminokiseline, tanine).

Različiti dijelovi koprive sadrže značajne količine bioaktivnih molekula za koje su dokazani povoljni farmakološki učinci: antidijabetičko, protuupalno, anti-kancerogeno, hepatoprotektivno, anti-oksidativno, anti-mikrobno, anti-mutageno i imunostimulativno djelovanje.

Korijen koprive je izvor vrijednih fitonutrijenata poput sterola, sterolnih glikozida i oleanolne kiseline, a zbog povoljnog učinka koristi se kod benigne hiperplazije prostate i problema s mokrenjem. Udio i sastav sterola korijena koprive može značajno varirati obzirom na okolišne uvjete rasta (tlo, klima, gnojidba i dr.).

Stoga je cilj ovoga istraživanja bio odrediti primjenom plinske kromatografije (GC-FID, GC-MS) udio i sastav sterola korijena samonikle koprive ubrane s različitih lokacija na području Republike Hrvatske.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA

Urtica dioica L. je zeljasta samonikla biljka, koja pripada u carstvo *Plantae*, odjeljak *Magnoliophyta*, razred *Magnoliopsida*, red *Rosales*, porodicu *Urticaceae*, rod *Urtica* i vrsta *Urtica dioica* L.

Ime roda dolazi od latinske riječi "urere" što znači peći, a ime vrste, "dioica" znači dvodomno, zato što se muški cvjetovi nalaze na jednoj, a ženski na drugoj biljci (Semalty i sur., 2017).

Toplak Galle (2001) navodi kako u Republici Hrvatskoj osim *Urtice dioice* L. koja se još naziva i obična kopriva ili velika kopriva, nalazimo i ove tri vrste koprive: *Urtica urens* L. (mala kopriva), *Urtica caudata* i *Urtica pilulifera*.

Urtica dioica L. je zeljasta biljka čija stabljika može narasti do 2 m visine, nazubljeni listovi nalaze se na maloj peteljci, u parovima jedni nasuprot drugih i prekriveni su dlačicama (slike 1 i 2). Te dlačice, prisutne na listovima i stabljici, u dodiru s kožom izazivaju osjećaj žarenja jer sadrže mravlju kiselinu (koja se nalazi u otrovu mrava i pčela) histamin, acetilkolin i serotonin. Cvjetovi su mali, gusto zbijeni, s četiri zeleno-bijele latice. Korijen je velik i žute je boje (Kregiel i sur., 2018). Rasprostranjena je na područjima s blagom klimom i često smatrana korovom zbog njenog brzog rasta i široke rasprostranjenosti te je se može pronaći uz ceste, kuće, potoke, na livadama i u šumama. Cvjeta od svibnja do rujna (Otles i Yalcin, 2012).



Slika 1. *Urtica dioica* L. na prirodnom staništu
(vlastita fotografija)



Slika 2. *Urtica dioica* L.
(vlastita fotografija)

2.1.1. Kemijski sastav koprive

Kregiel i sur. (2018) navode kako postoje brojni čimbenici koji utječu na kemijski sastav koprive, kao što su klima, tlo, raznovrsnost, genotip, vegetativni stadij, vrijeme berbe, prerada i skladištenje.

Listovi koprive sadrže terpenoide, karotenoide (uključujući β -karoten, neoksantin, violaksantin, lutein i likopen), masne kiseline od kojih prevladavaju palmitinska, *cis*-9,12-linolenska i α -linolenska kiselina, esencijalne amino kiseline, vitamine, ugljikohidrate, tanine, izolektine, polisaharide, sterole i minerale, od kojih je najvažnije željezo.

Listovi također sadrže klorofil, otprilike $4,8 \text{ mg g}^{-1}$ suhe tvari, čija koncentracija zapravo ovisi o klimi i okolišnim čimbenicima. U istraživanju koje su proveli Kukrić i sur. (2012) dobiveni su rezultati da više klorofila i karotenoida sadrže one koprive koje su rasle u hladu. Također, navode da količine klorofila i karotenoida se razlikuju u lišću različite starosti te da je koncentracija klorofila viša kod mladog lišća koje raste te pada kako list stari. Svježiji listovi sadrže visoke koncentracije vitamina A, C, D, E, F, K i P i vitamine B kompleksa te značajne količine esencijalnih amino kiselina: treonina, valina, izoleucina, leucina, fenilalanina i lizina, te manje koncentracije histidina i metionina (Rutto i sur., 2013). Fenolni i polifenolni spojevi iz samoniklog jestivog bilja imaju veliki značaj zbog važnosti i uloge kod liječenja kroničnih i degenerativnih bolesti (Del Rio i sur., 2013).

U istraživanju koje su proveli Pinelli i sur. (2008) HPLC analizom svježih listova i stabljika koprive identificirani su sljedeći fenolni spojevi: derivati hidroksicimetnih kiselina (klorogenska kiselina i 2-*O*-kafeoil-malna kiselina), flavonoidi (rutin, kvercetin *p*-kumaroil-glukozid, kemferol 3-*O*-glukozid, kemferol 3-*O*-rutinozid, izoramnetin 3-*O*-rutinozid) i antocijanini [peonidin 3-*O*-rutinozid, rozinidin 3-*O*-rutinozid, peonidin 3-*O*-(6''-*O*-*p*-kumaroilglukozid)].

Glavne komponente eteričnih ulja koprive su: karvakrol (38,2 %), karvon (9 %), naftalen (8,9 %), (E)-anetol (4,7 %), heksahidrofarnezil aceton (2,9 %), (E)-geranil aceton (2,9 %), (E)- β -jonon (2,8 %) i fitol (2,7 %) (Gül i sur., 2012).

Otles i Yalcin (2012) navode kako korijen koprive sadrži 18 fenolnih spojeva i 8 različitih lignana. Neki od tih fenolnih spojeva su ferulinska, galna, elaginska, fumarna, klorogenska, kafeinska, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina te narginin, miricetin, rutin, katehin, izoramnetin, kemferol i kvercetin. U korijenu se nalaze još i lignani (sekoizolaricirezinol, 9,90-bisacetil-neo-olivil i njihovi glukozidi), fitosteroli (β -sitosterol), polisaharidi, izolektini, kumarini (skopoletin), jednostavni fenoli (*p*-hidroksi-benzaldehid), triterpenske kiseline i monoterpenoidi.

Od minerala i elemenata u tragovima u korijenu se nalaze magnezij, cink, mangan i bakar (Semalty i sur., 2017).

Nadalje, u korijenu se također nalazi biološki aktivna molekula, rijetki lecitin, *U. dioica* aglutinin (UDA) koji je u *in vitro* uvjetima pokazao anti-proliferacijska svojstva u humanim cervikalnim HeLa kancerogenim stanicama i na humanim epidermoidnim A431 kancerogenim stanicama (Esposito i sur., 2019).

2.2. FITOSTEROLI

Fitosteroli (biljni steroli) se ubrajaju u skupinu steroida kojima je zajednički tetraciklički prstenasti sustav koji se sastoji od tri šesteročlana i jednoga peteročlanoga prstena. Sa svojim kemijskim sastavom svrstavaju se u visokomolekularne cikličke alkohole (Pine, 1994).

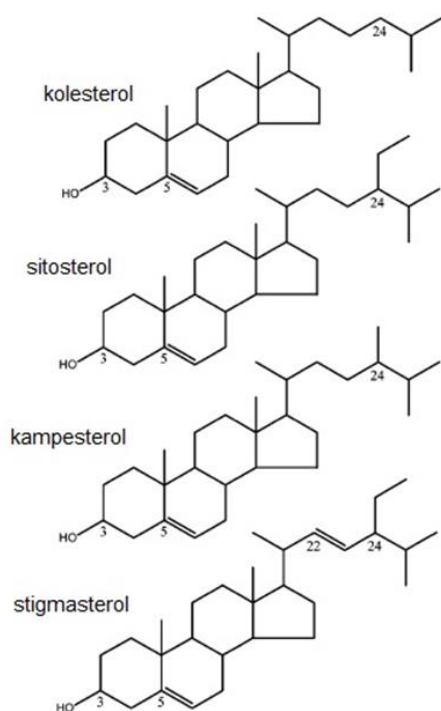
Dio su velike skupine izoprenoida i esencijalne strukturalne komponente membrana biljaka te kao slobodni fitosteroli imaju istu ulogu stabilizacije fosfolipidnog sloja membrana kao kolesterol u životinjskim membranama. Biljne membrane sadrže vrlo malo ili uopće ne sadrže kolesterol, već više vrsta fitosterola koji se od kolesterola strukturno razlikuju. Strukture kolesterola i fitosterola su slične, jedina razlika je adicija metilne ili etilne skupine na bočni lanac odnosno na C₂₄. Većina

fitosterola sadrži 28 ili 29 ugljikovih atoma i jednu do dvije dvostruke veze između atoma ugljika (Moreau i sur., 2002).

Biosinteza biljnih sterola kreće od acetatnih jedinica preko sinteze mevalonata, C5-izoprena, nastavlja se sintezom skvalena i brojnih reakcija intermedijera koje dovode do ciklizacije skvalena u cikloartenol. Proces biosinteze uključuje reakcije oksidativne demetilacije, metilacije, dehidrogenacije i izomerizacije dvostruke veze.

Steroli se u biljkama nalaze u slobodnom obliku spojeni s višim masnim kiselinama (esterificirana forma) kao sterolni glikozidi (heksoza na C₃ položaju) i acilirani sterolni glikozidi (ugljikohidratni derivati sterola koji na C₃ položaju imaju heksozu s masnom kiselinom na 6-OH položaju heksoznog kostura) (Valitova i sur., 2016).

Fitosteroli se dijele u dvije skupine: sterole ili Δ^5 -sterole koji imaju dvostruku vezu u sterolnom prstenu na poziciji C₅ i na stanole koji u svojoj strukturi nemaju dvostruku vezu u sterolnom prstenu već su 5 α -zasićeni derivati biljnih sterola nastali njihovom hidrogenacijom, odnosno 5 α -redukcijom zasićene veze. U hrani su najprisutniji sitosterol (24-etilkolesterol), kampesterol (24-metilkolesterol) i stigmasterol (Δ^{22} -24-etilkolesterol) (Ostlund, 2002) (slika 3).



Slika 3. Kolesterol i najprisutniji Δ^5 - fitosteroli (sitosterol, kampesterol i stigmasterol) (Ostlund, 2002)

Fitosteroli se razlikuju od kolesterola u strukturi bočnog lanca, dok su fitostanoli 5 α zasićeni derivati fitosterola. Te naizgled male razlike u strukturi čine kolesterol, fitosterole i fitostanole različite u njihovoj funkcionalnosti i metabolizmu.

Ljudski organizam ne može sam sintetizirati fitosterole kao što sintetizira kolesterol, pa ih je potrebno unijeti u organizam putem hrane. Glavni izvori fitosterola su biljna ulja (palmino ulje, sojino, suncokretovo, maslinovo), margarin, orašasti plodovi, mahunarke, žitarice, kruh i povrće, dok se manja količina unosi voćem (Gylling i Simonen, 2015). Tablice 1 i 2 prikazuju udjele sterola i stanola u određenim vrstama biljnih ulja i namirnica.

Piironen i sur. (2000) navode kako je istraženo preko 250 različitih sterola i njihovih spojeva u raznom biljnom materijalu te da se sitosterol ističe kao najvažniji i najprisutniji, dok su brakasterol, kampesterol, stigmasterol i avenasterol prisutni u manjim količinama. Navode kako su najbogatiji izvori sitostanola i kampestanola (5 α zasićenih sterola) žitarice, pšenica i raž.

Tablica 1. Udio biljnih sterola i stanola u biljnim uljima (g kg⁻¹) (Piironen i Lampi, 2004)

Biljna ulja	Biljni steroli	Biljni stanoli
Suncokretovo ulje	2,63-3,76	0,04
Maslinovo ulje	1,44-1,62	0,0035-0,007
Palmino ulje	0,69-0,79	0,02-0,12
Sojino ulje	2,03-4,44	0,07

Tablica 2. Udio biljnih sterola i stanola u namirnicama (mg kg⁻¹) (Piironen i Lampi, 2004)

Namirnica	Biljni steroli	Biljni stanoli
Žitarice		
Pšenica	447-830	151-171
Ječam	720-801	17-19
Zob	350-611	8-9
Raž	707-1134	122-220
Kukuruz	662-1780	0
Orašasti plodovi		
Bademi	138-1430	0
Kikiriki	551-1269	0
Voće		
Malina	274	2
Naranča	228-240	nisu detektirani
Banana	116-161	nisu detektirani
Jabuka	130-183	0-8
Avokado	752	5
Povrće		
Brokula	367-390	0-18
Cvjetača	310-400	0,6
Zelena salata	85-174	5
Rajčica	47-74	2,8-8

Kod biljaka steroli imaju važnu ulogu u biofiziološkoj funkciji membrana (permeabilnosti i aktivnosti integralnih proteina membrane). Uz strukturnu funkciju, vrlo je važna i regulatorna funkcija. Fitosteroli su prekursori biljnih hormona, brasinosteroida, koji reguliraju rast biljke i njezin razvoj. Također, direktno su uključeni u transdukciju transmembranskog signala u stanice formirajući specifične mikrodomene u membranama (Valitova i sur., 2016).

U istraživanju koje su proveli Gylling i sur. (2014) dokazano je kako konzumacija fitosterola i fitostanola u količini od 2 g dan⁻¹ značajno smanjuje koncentraciju LDL kolesterola za 8-10 %. Do

smanjenja dolazi tako što zamjenjuju kolesterol iz miješanih micela u tankom crijevu i tako djelomično umanjuju njegovu apsorpciju.

Učinak fitosterola/stanola na LDL kolesterol je najviše istražen, ali neka istraživanja pokazuju da mogu reducirati i razinu triglicerida u krvi kod dnevnog unosa od 1,5-2 g dan⁻¹ za 6-20 %, dok utjecaj na HDL nije zabilježen (Sialvera i sur., 2012).

Mazalin Protulipac (2016) navodi kako fitosteroli i fitostanoli utječu i na aterosklerotiski proces smanjenjem kolesterola u krvi, ali i pleiotropnom anti-aterogenom aktivnošću. Fitosteroli i fitostanoli smanjuju arterijsku akumulaciju kod miševa, zamoraca i zečeva te pokazuju i protuupalni učinak.

Biljni steroli/stanoli smanjuju dostupnost intestinalnog kolesterola koji ulazi u cirkulaciju i njihov učinak može biti koristan kod bolesnika visokog kardiovaskularnog rizika liječenih statinima.

2.2.1. Fitosteroli korijena koprive

Assaf i sur. (2020) navode kako je iz korijena koprive izolirano 8 sterola: kampesterol, 24R-etil-5 α -kolestane-3 β ,6 α -diol, 7 β -hidroksi-sitosterol, β -sitosterol, 7 α -hidroksi sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozid, 7 β -hidroksi sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozid, 6'-O-palmitoil-sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozid i β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozid.

Također, Kopyt'Ko i sur. (2012) ističu kako su u korijenu koprive izolirani β -sitosterol (0,03-0,06 %), β -sitosterol-3-O-D-glukozid (0,03-0,05%), (6'-palmitoil)sitosterol-3-O- β -D-glukozid (~0,003 %), 7- β -hidroksisitosterol (0,001 %), stigmasterol, kampesterol, stigmast4-en-3-on, daukosterol, i sterolni derivati.

Plinskom kromatografijom utvrđeno je da je β -sitosterol u koncentracijama između 67,8-75,2 % najzastupljeniji sterol, dok se ukupne koncentracije ostalih izoliranih sterola (kampesterol, stigmasterol, Δ^7 -avenasterol i Δ^7 -stigmastenol) kreću između 14,3 i 32,2 % od ukupnog udjela sterola koji su u ispitivanim koncentratima koprive bili u rasponu 3,2-6,05 % (Kovacheva i sur., 1990).

Semalty i sur. (2017) navode kako se uz prethodno spomenute fitosterole, u korijenu koprive nalazi i hekogenin.

Hornik i sur. (2013) su HPLC-NMR metodom iz korijena koprive izolirali kampesterol (6 %), β -sitosterol (81 %) i sitostanol (12 %) te još jedan nepoznati spoj (1 %), koji nije mogao biti

identificiran zbog niske koncentracije. S druge strane, ekstrakcijom superkričnim CO₂ iz osušenih rizoma koprive dobiveno je 0,63 mg g⁻¹ β-sitosterola (Sajfrtová i sur., 2005).

Müller i Bracher (2015) su GC-IT/MS analizom lijekova za tretiranje simptoma donjeg urinarnog trakta dostupnih na tržištu identificirali cikloartenol u proizvodima ekstrakta sabol palme, koji su također kao ostale sastojke sadržavali bučine koštice, ulje koprive i laneno ulje.

2.2.2. Pozitivni učinci fitosterola korijena koprive

U istraživanju provedenom od Hirano i sur. (1994) prikazano je kako Δ⁵-steroli iz korijena koprive (stigmast-4-en-3-on, stigmasterol i kampesterol) inhibiraju aktivnost Na⁺,K⁺-ATPaze u stanicama benigne hiperplazije prostate. Kampesterol je pokazao inhibitornu aktivnost (4-23 %) prema enzimu pri koncentracijama od 10⁻⁷-10⁻⁴ M.

Kod testosteronom izazvane benigne hiperplazije prostate, koristeći ekstrakte korijena koprive dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti 5α-reduktaze i smanjenja hiperplazije prostate. Mjerenja veličine prostate, tjedni volumen urina, serumske razine testosterona i histološka mjerenja vode ka zaključku da *U. dioica* može biti efektivan lijek za kontroliranje benigne hiperplazije prostate. Pozitivni učinci se pripisuju dvama biokemijskim markerima, β-sitosterolu i skopoletinu (Nahata i Dixit, 2012).

Durak i sur. (2004) ističu da neki steroli i hidroksi masne kiseline, iako prisutni u niskim koncentracijama u ekstraktima korijena koprive, mogu inhibirati aromatazu, ključni enzim u metabolizmu steroidnih hormona, koji ima ulogu prevođenja androgena u estrogene. Rezultati provedenog kliničkog ispitivanja pokazali su kako β-sitosterol značajno olakšava simptome i tok urina (Berges i sur., 1995).

2.2.3. Utjecaj okolišnih uvjeta na udio fitosterola korijena koprive

Razna istraživanja su pokazala kako nutritivna vrijednost koprive kao i njezin kemijski sastav ovisi o vrsti tla na kojemu raste, klimatskim uvjetima (vlaga, temperatura, osunčanost), gnojidbi, količini onečišćenja, i dr. (Radman i sur., 2015).

Kopriva preferira tlo bogato nutrijentima i osvjetljena staništa, vruću i umjerenu klimu, te su najviši ukupni udjeli fenolnih spojeva i antioksidativne aktivnosti nadzemnih dijelova koprive i

korijena koprive pronađeni upravo na mjestima koje zadovoljavaju takve povoljne uvjete (Otlés i Yalcin, 2012).

Muški primjerci biljke su karakterizirani većim brojem i masom rizoma, dok kemijske analize pokazuju kako ukupan udio dušika, proteina i pepela su blago povišeni u ženskih vrsta, a muške biljke sadrže više vlakana. Udio polifenolnih kiselina je bio značajno viši u muškim biljkama, dok je sastav sterola bio viši u ženskih biljaka (Węglarz i Rosłon, 2000).

Količine glikozida sterola u listovima koprive su se povećavale sa zrelošću biljke, dok je najviša koncentracija slobodnih sterola bila nakon berbe u svibnju (Nencu i sur., 2014).

Istraživanje koje su proveli Vlahakis i Hazebroek (2000) prikazuje kako postoji utjecaj genetičkih faktora, lokacije rasta i temperature na akumulaciju fitosterola. Ističu da je kod sojinog ulja udio ukupnih sterola bio viši na višim temperaturama uzgoja te da se sastav sterola također značajno mijenjao porastom temperature. Udio kampesterola je bio viši, dok je stigmasterola i β -sitosterola bilo manje. Omjer β -sitosterola/stigmasterola je povećan u biljnim tkivima izloženim nižim temperaturama. Povišeni omjeri β -sitosterola/stigmasterola mogu poboljšati preživljavanje u hladnim uvjetima smanjenjem gubitka vode tijekom hladnog perioda. To znači da prilagodbe sastavnica membrane u odgovoru na hladne uvjete mogu imati važnost u temperaturnoj regulaciji biosinteze fitosterola u uljaricama.

Klijanje sjemenki duhana, graška, uljane repice povećava aktivnost enzima povezanih s akumulacijom sterola te se kod klijanja sjemenja duhana koncentracije stigmasterola udvostručuju. Varijacije u koncentracijama stigmasterola i njegovih prekursora su vidljive u razvojnim fazama sjemenja, ali i u razvojnim fazama cijele biljke. Također, nadzemni dijelovi repe sadrže visoke koncentracije kolesterola, međutim zabilježen je pad kolesterola i rast koncentracije sitosterola u kasnijim fazama razvoja. Stigmasterol ima ulogu kod odgovora na okolišni stres, gdje kod izlaganja patogenim bakterijama dolazi do stimulacije biosinteze stigmasterola (Aboobucker i Suza, 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Rizomi koprive

U ovom istraživanju korišteni su uzorci rizoma koprive (*Urtica dioica* L.) sakupljeni u listopadu 2019. godine s različitih područja Republike Hrvatske (tablica 3). Nakon ubiranja, svježi uzorci rizoma koprive dopremljeni su u laboratorij te su skladišteni pri temperaturi od -18 °C do liofilizacije. Prije postupka liofilizacije, uzorci rizoma koprive su zamrznuti na temperaturu od -80 °C, a liofilizacija je provedena pri -55 °C/24 h. Osušeni rizomi koprive (slika 4) su neposredno prije analize usitnjeni u električnom mlincu.

Tablica 3. Popis uzoraka rizoma koprive sakupljenih s različitih lokacija RH

UZORAK	PODRUČJE	LOKACIJA
1	Ozalj i okolica	Sela Žakanjska
2		Sopčić Vrh
3		Žakanje
4	Zagreb	Gračani
5		Vrapče
6	Žumberak	Koretići
7	Lika	Čovići
8	Ogulin	Ogulin



Slika 4. Liofilizirani uzorci rizoma koprive
(vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije i standardi

1. Heksan, p.a.
2. Otopina standarda α -kolestanola ($c=1 \text{ mg L}^{-1}$)
(Priprema: Odvaži se 0,1 g α -kolestanola i nadopuni do 100 mL acetonom)
3. Otopina standarda kolesterola ($c=1 \text{ mg L}^{-1}$)
(Priprema: odvaži se 0,1 g i nadopuni do 100 mL acetonom)
4. Interni standard α -kolestanol
[Priprema: $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ u 96 %-tnom etanolu (v/v)]
5. Kalijev hidroksid KOH ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$)
(Priprema: 3 g KOH otopiti u 5 mL destilirane vode i razrijediti etanolom do 100 mL)
6. Etanol, 96 % (v/v)
7. Razvijajući reagens (TLC) – heksan/dietil eter (1:1, v/v)
(Priprema: pomiješati otopinu heksana i otopinu dietil etera u omjeru 1:1)
8. Aceton, p.a.
9. Aluminijski oksid (0,063 mm – 0,200 mm; udio vode 0 %)
10. Dietil-eter, p.a.
11. Metanol, p.a.
12. Sililirajući reagens
[Priprema: piridin, heksametildisilazan i trimetilklorosilan pomiješaju se u omjeru 5:2:1 (v/v)]
13. Destilirana voda

3.1.3 Aparatura i pribor:

1. Liofilizator (Alpha 1-4 LSCPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
2. Električni mlinac (GT, Tefal, Francuska)
3. Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern, Njemačka)
4. Uređaj za centrifugiranje (Rotina 380, Hettich Zentrifugen, Njemačka)
5. Rotavapor (BÜCHI Flawil, Švicarska)
6. Tresilica (LLG-Vortex UniTEXER, Meckenheim, Njemačka)
7. Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex, Ettenheim, Njemačka)
8. Sušionik (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
9. Uređaj za plinsku kromatografiju, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD)

- Maseni detektor tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
- Kapilarna kolona Agilent DB-17MS (30m x 0,32 mm x 0,25 μ m)
- Računalo

1. Plastične Falcon epruvete (50 mL)
2. Menzure (50 mL, 100 mL)
3. Metalna žličica
4. Plastična žličica
5. Laboratorijske čaše (50 mL, 100 mL)
6. Odmjerne tikvice (100 mL)
7. Stakleni lijevci
8. Stakleni štapić
9. Tikvice s ravnim dnom (50 mL)
10. Tikvice s okruglim dnom (50 mL)
11. Mikropipete Eppendorf (100 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L)
12. Nastavci za mikropipete Eppendorf
13. Metalni tronožac
14. Azbestna mrežica
15. Plinski plamenik
16. Povratno hladilo
17. Metalne hvataljke
18. Kolone za kromatografiju sa sinterom na dnu
19. Razvijajuće kadice za TLC
20. Metalna špatula
21. Staklena bočica sa raspršivačem
22. Vijale s insertom
23. Ravnalo
24. Grafitna olovka
25. Silikagel ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) (Silikagel F254)
26. Spremnik s dušikom
27. Staklene kuglice za vrenje

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje udjela i sastava sterola

Za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima lipidnog ekstrakta iz rizoma koprive korištena je metoda HRN EN ISO 12228:2004.

Metoda se temelji na dodatku unutarnjeg standarda α -kolestanola lipidnom ekstraktu rizoma koprive te podvrgavanju saponifikaciji s etanolnom otopinom KOH. Neosapunjiva frakcija se ekstrahira s otapalom dietil-eterom na koloni ispunjenoj aluminijevim oksidom koji zadržava anione masnih kiselina, a propušta negliceridne komponente. Pomoću tankoslojne kromatografije na bazičnom silikagelu se iz neosapunjive frakcije izdvaja fitosterolna frakcija. Dobivena fitosterolna frakcija se prevodi u trimetilsililestere te analizira plinskom kromatografijom s masenim detektorom.

Konvencionalna ekstrakcija izmućkivanjem

Odvaže se $5 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ usitnjenog osušenog uzorka rizoma koprive u plastične falkonice od 50 mL. Doda se 40 mL heksana i stavi na tresilicu 30 min pri sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije uzorak se centrifugira 10 min pri $5000 \text{ okretaja min}^{-1}$. Nakon centrifugiranja, supernatant se profiltrira kroz filter papir u prethodno izvaganu tikvicu s okruglim dnom. U preostali talog doda se još 40 mL heksana i postupak ekstrakcije se ponovi još jednom. Sakupljeni ekstrakti se spoje te se upare na rotavaporu pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$ gotovo do suhoga. Nakon uparavanja, lipidni ekstrakt se propuše strujom dušika kako bi se uklonili eventualni ostaci otapala.

Priprema neosapunjive frakcije

U tikvicu s okruglim dnom u kojoj je dobiveni lipidni ekstrakt rizoma koprive, doda se 1 mL prethodno napravljenog α -kolestanola ($c=1 \text{ mg L}^{-1}$) i 5 mL KOH ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Pomoću ultrazvučne kupelji otopi se masna frakcija zaostala po stijenkama tikvice. Dodaju se dvije do tri kuglice za vrenje i tikvica se spoji na povratno zračno hladilo. Zagrijava se plamenikom preko azbestne mrežice do vrenja (slika 5). Pusti se da polagano vrije neprekidno 15 min te se nakon

toga tikvica odvoji od zračnog hladila. Pipetom se doda 5 mL etanola i pusti da se sadržaj u potpunosti ohladi.



Slika 5. Priprema neosapunjive frakcije (vlastita fotografija)

Priprema kolone za kromatografiju na stupcu

Kolona za kromatografiju je dugačka 25 cm, unutarnjeg promjera 1,5 cm sa sinterom na dnu. Kolona se pričvrsti na metalni stalak, stavi se malo vate na dno te se doda etanola toliko da je malo iznad sloja vate. Pomoću staklenog štapića vata se pažljivo utisne što više uz sinter i istisne se zaostali zrak iz vate. Odvaži se 10 g aluminijevog oksida te se uz 20 mL etanola kvantitativno prenese u kolonu za kromatografiju. Kolona se lagano lupka po stijenkama kako bi se zaostali zrak ispustio i kako ne bi došlo do pojave pukotina u stupcu aluminijeva oksida. Višak etanola se ispusti iz kolone tako da nivo etanola bude 0,5 cm iznad nivoa aluminijevog oksida.

Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu

Potpuno ohlađeni uzorak neosapunjive frakcije pipetom se prenese u pripremljenu kolonu za kromatografiju s aluminijevim oksidom (slika 6). Eluat se sakuplja u tikvicu s okruglim dnom od

50 mL, a eluiranje traje dok otopina ne dosegne vrh sloja aluminijevog oksida. Nakon što je ohlađeni uzorak propušten kroz kolonu, pipetom se doda 5 mL etanola i nastavi se proces eluiranja. Tikvica u kojoj se prethodno nalazio uzorak ispere se s 10 mL dietil-etera te se prenese u kolonu. Nakon što dietil-eter dosegne vrh aluminijevog oksida, menzurom se u kolonu dodaje još dva puta po 10 mL dietil-etera, čime se završava proces eluiranja. Dobiveni eluat se otparava do suhoga na rotavaporu pri temperaturi od 40 °C.

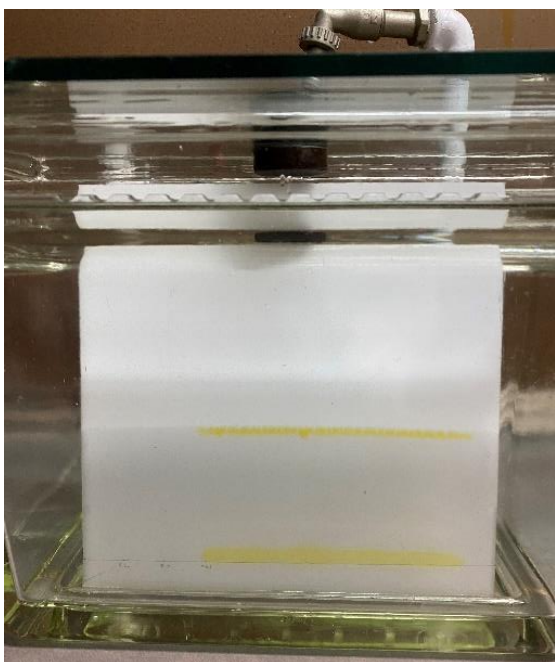


Slika 6. Ekstrakcija neosapunjive frakcije (vlastita fotografija)

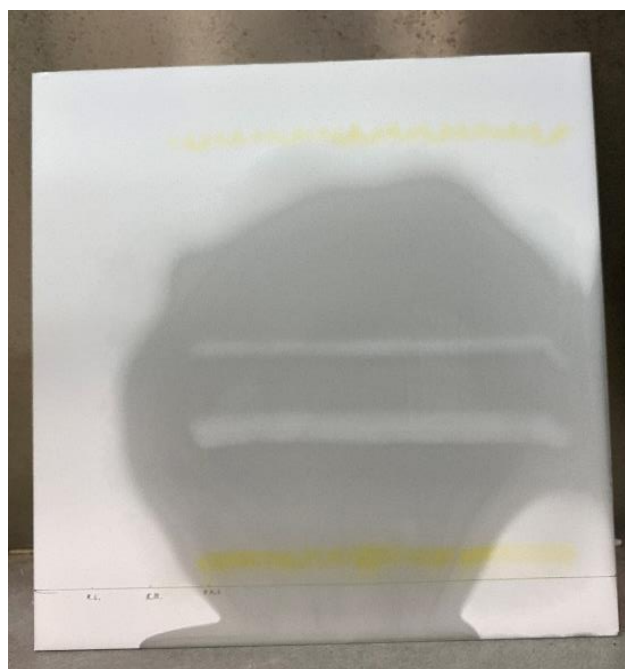
Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom

U tikvicu sa suhim uzorkom neosapunjive frakcije doda se 2 mL dietil-etera te se nanese na prethodno označenu ploču sa silikagelom u ravnoj liniji 2 cm od donjeg ruba. Ploča sa silikagelom (veličine 20x20, debljine 0,25 mm) označi se olovkom 2 cm od donjeg ruba te po 2 cm od lijevog ruba za svaki standard i uzorak. Kako bi nakon razvitka kromatograma mogli identificirati dobivene sterole, nanese se 2-3 μ L referentne otopine α -kolestanola i kolesterola. Nakon označavanja ploče i nanošenja uzorka, ploča sa silikagelom se postavlja u kadnicu za razvijanje koja sadrži 100 mL otopine heksana i dietil-etera (1:1) te se zatvori poklopcem (slika 7). Kromatogram se razvija u digestoru pri sobnoj temperaturi do trenutka kada linija otapala ne dosegne visinu 1 cm od

gornjeg ruba ploče (otprilike 1,5 h). Nakon toga, ploča se izvadi iz kadice i ostavi da se osuši u digestoru. Nakon sušenja, ravnomjerno se popraska metanolom. Zone sterola se označe par milimetara ispod i iznad vidljivog traga (slika 8) te se nakon sušenja metalnom špatulicom sastruže silikagel unutar označenih rubova i kvantitativno prebaci u lijevak s filter papirom. Doda se 0,5 mL 96 %-tnog etanola te se fitosterolna frakcija sakuplja ispiranjem tri puta s po 5 mL dietil-etera u tikvicu od 50 mL s okruglim dnom. Sadržaj tikvice se upari na rotavaporu pri temperaturi 40 °C do suhoga. U tikvicu sa sterolnom frakcijom se doda 1 mL dietil-etera te se prenese u prethodno izvaganu epruvetu. Tikvica u kojoj je bila sterolna frakcija ispere se s 0,5 mL dietil-etera i sadržaj se također prebaci u epruvetu koja se propuše strujom dušika. Dobiveni suhi ostatak predstavlja sterolnu frakciju.



Slika 7. Razvijanje kromatograma u kadici (vlastita fotografija)



Slika 8. Ploča s trakom sterola (vlastita fotografija)

Derivatizacija

Pripremi se reagens za sililiranje koji je mješavina piridina, heksametildisilazana i trimetilklorsilana u omjeru 5:2:1 (v:v:v). U epruvetu koja sadrži sterolnu frakciju doda se 100 µL pripremljenog

reagensa sa sililiranje, epruveta se zatvori, protrese na Vortexu kako bi se steroli u potpunosti otopili te se 15 min stavi na temperaturu od 105 °C. Nakon sušenja, epruveta se hladi u eksikatoru. Potpuno ohlađen sadržaj se centrifugira 7 min pri 7000 okretaja min⁻¹. Bistri supernatant se odvoji od taloga i prebaci u vijale od 2 mL s insertom od 100 µL.

Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom

Pripremljeni uzorak sterola analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD). Kromatograf je opremljen sa sustavom za injektiranje uzorka i plameno-ionizacijskim te masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector koji je preko kanala spojen na računalo s instaliranim 4880 softverom (Unicam 4880 Chromatography Data System). U tablici 4 prikazani su uvjeti analize.

Tablica 4. Uvjeti rada plinskog kromatografa

Kapilarna kolona	DB-17 (Agilent) 30 m x 0,32 mm, debljina filma 0,25 µm
Količina injektiranog uzorka	1,0 µL
Temperatura injektora	290 °C
Temperaturni program kolone	180 °C do 270 °C/porast od 6 °C min ⁻¹ 270 °C/30 min
Plin nosioc	helij
Protok plina nosioca	1,5 mL min ⁻¹ split 13,3:1
Temperatura detektora	250 °C
Stacionarna faza	(50 %-fenil)-metilpolisiloksan
Trajanje analize	45 min

Identifikacija sterola

Identifikacija sterola u pripremljenim uzorcima provodi se usporedbom retencijskih vremena izdvojenih sterola s retencijskim vremenima komercijalno dostupnih standardnih smjesa sterola analiziranih pod jednakim uvjetima te usporedbom masenih spektara u bazi podataka NIST 2005, ver. 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD, SAD).

Kvantifikacija sterola

Kvantitativni sastav sterola određuje se metodom normalizacije površine ispod pikova. Udio ukupnih fitosterola izražava se u mg kg⁻¹ i izračunava se prema formuli [1]:

$$\text{Ukupni steroli (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\sum A_s \cdot 1000}{A_\alpha \cdot m} \quad [1]$$

gdje je: A_s - površina svakog pojedinačnog pika sterola

A_α - površina ispod pika α -kolestanola

m - masa uzorka ulja (g)

Udio pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola i izračunat je prema formuli [2]:

$$\% \text{ od ukupnih sterola} = \frac{A \cdot 100 \%}{\sum A_i} \quad [2]$$

gdje je: A - površina ispod pika određenog sterola (mg kg⁻¹)

A_i - površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola

Rezultati udjela ukupnih sterola izraženi su u g kg⁻¹, a udio pojedinačnih sterola kao % udjela ukupnih sterola te su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dvaju mjerenja.

3.2.2. Statistička obrada

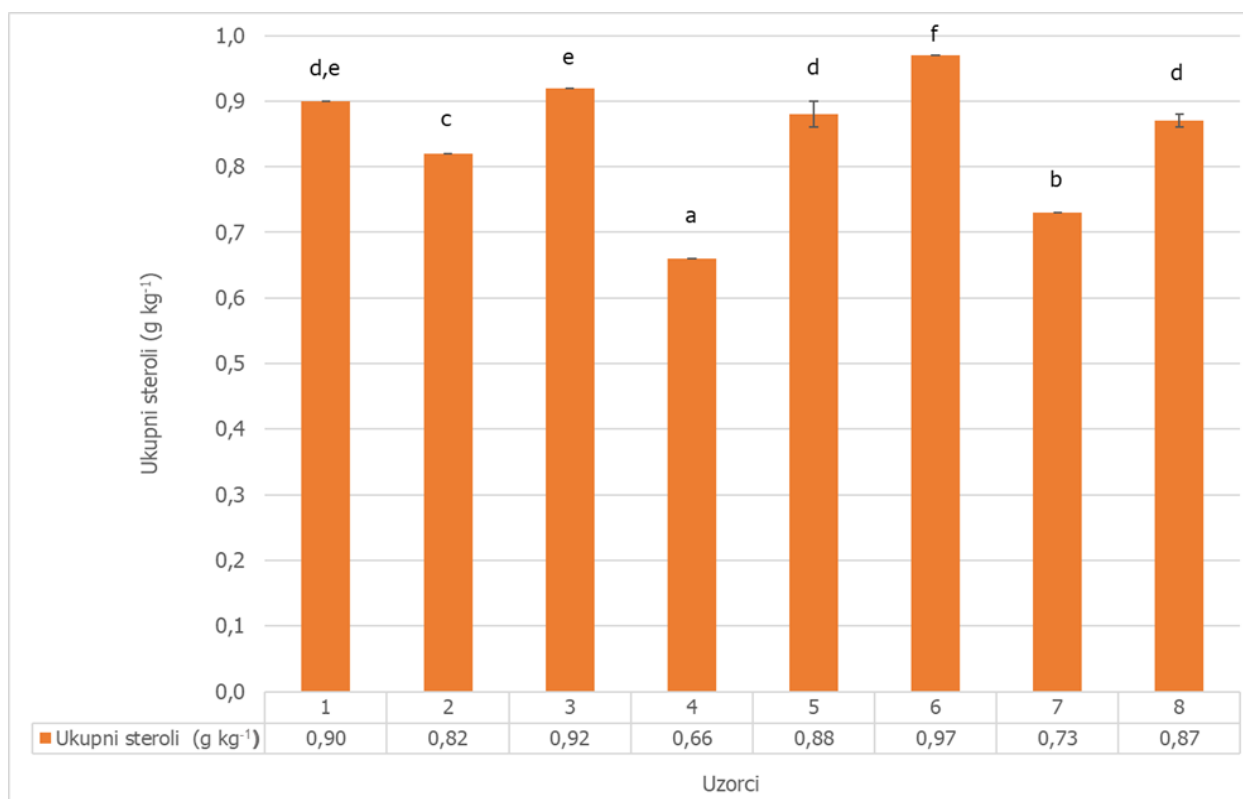
Za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Za usporedbu uzoraka provedena je jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA), pri čemu su nezavisne varijable bile lokacije staništa, a kao zavisne varijable promatrane su udjeli ukupnih (g kg⁻¹) i pojedinačnih (%) sterola. Statistički značajna razlika u svim provedenim testovima razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju je provedena izolacija sterola iz rizoma samonikle koprive sakupljenih s različitih lokacija Republike Hrvatske. Cilj istraživanja bio je primjenom plinske kromatografije (GC-FID, GC-MS) odrediti udio i sastav sterola u uzorcima korijena koprive.

4.1. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH STEROLA

Primjenom plinske kromatografije (GC-FID, GC-MS) određen je udio ukupnih sterola (g kg^{-1}) u osam uzoraka korijena samonikle koprive sakupljenih na različitim lokacijama RH (tablica 3). Dobiveni rezultati statistički su obrađeni, a rezultati statističke analize utjecaja lokacije staništa na udio ukupnih sterola u korijenu koprive prikazan je na slici 9. Može se primijetiti da su se uzorci statistički značajno ($p \leq 0,05$) razlikovali u udjelu ukupnih sterola.



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Srednje vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Slika 9. Udio ukupnih sterola u rizomu samonikle koprive s različitih lokacija na području RH

Prosječna vrijednost ukupnih sterola u svim uzorcima iznosila je $0,84 \text{ g kg}^{-1}$. Najviša koncentracija određena je u uzorku 6 ($0,97 \text{ g kg}^{-1}$), dok je najniža koncentracija od $0,66 \text{ g kg}^{-1}$ određena u uzorku 4. Nadalje, vidljivo je kako se uzorci 1, 5 i 8 (uz. $1 \text{ } 0,90 \text{ g kg}^{-1}$, uz. $5 \text{ } 0,88 \text{ g kg}^{-1}$, uz. $8 \text{ } 0,87 \text{ g kg}^{-1}$) međusobno nisu statistički značajno razlikovali u koncentraciji ukupnih sterola, kao i uzorci 1 i 3 (uz. $1 \text{ } 0,90 \text{ g kg}^{-1}$, uz. $3 \text{ } 0,92 \text{ g kg}^{-1}$).

U istraživanju koje su proveli Tadić i sur. (2016) u ekstraktima koprive dobivenih ekstrakcijom sa superkritičnim CO_2 te analizom GC-MS metodom dobivene su sterolne komponente u iznosu od 6,7 % gdje je β -sitosterol bio najprisutniji sterol. Međutim, teško je usporediti rezultate njihovog istraživanja s rezultatima dobivenim u ovom radu budući da u njihovom radu nije jasno definirano koji dio koprive se koristio za analizu te su sterolne komponente izražene kao ukupni postotak u odnosu na sastav cijele biljke. Također, na isti način su izraženi ukupni steroli koje su Kovacheva i sur. (1990) plinskom kromatografijom odredili u koncentratu koprive, a iznose od 3,23-6,05 %. Nadalje, Kopyt'Ko i sur. (2012) su iz korijena koprive izolirali sterole i njihove derivate čiji udio iznosi 0,064-0,174 %.

Chaurasia i Wichtl (1987) su kromatografskim metodama iz korijena koprive izolirali 6 sterolnih komponenti povezanih sa sitosterolom, te je njihova masa bila 85 mg. Dobivena koncentracija sterolnih komponenti je $0,02 \text{ g kg}^{-1}$ što je znatno niže od rezultata dobivenih ovim istraživanjem. Međutim, potrebno je napomenuti da se radi o sterolnim derivatima koji su manje prisutni u korijenu koprive.

Piironen i sur. (2000) ističu da se raspon ukupnih sterola u 13 komercijalno dostupnih biljnih sirovih ulja kreće od $1,29\text{-}15,57 \text{ g kg}^{-1}$, što su puno više vrijednosti od onih dobivenih u ovom istraživanju. Takva razlika u udjelu ukupnih sterola je razumljiva, obzirom da biljna ulja sadrže znatno više udjele sterola u odnosu na korijen koprive.

Nadalje, isti autori navode kako se u sirovom palminom ulju nalazi $0,71\text{-}1,17 \text{ g kg}^{-1}$ sterola, u rafiniranom $0,49\text{-}0,61 \text{ g kg}^{-1}$, dok se u ekstra djevičanskom maslinovom ulju nalazi $1,44\text{-}1,50 \text{ g kg}^{-1}$ ukupnih sterola. Uspoređujući navedene rezultate s rezultatima ovog istraživanja, može se primijetiti da korijen koprive sadrži višu koncentraciju ukupnih sterola od rafiniranog palminog ulja.

Također, autori navode još i da udio ukupnih sterola u raži iznosi 1100 mg kg^{-1} , pšenici 760 mg kg^{-1} , ječmu 830 mg kg^{-1} i zobi 520 mg kg^{-1} , gdje se može zaključiti kako korijen koprive i neke žitarice sadrže približno jednake udjele ukupnih sterola ili su čak i nešto više vrijednosti u korijenu koprive u odnosu na zob.

4.2. ODREĐIVANJE SASTAVA STEROLA

Uz određivanje udjela ukupnih sterola, u svim uzorcima rizoma samonikle koprive s različitim lokacija RH GC-FID/GC-MS analizom ispitan je i sastav sterola, gdje su identificirani sljedeći steroli: kampesterol, kampestanol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ 5-avenasterol, lanosterol, cikloartenol, 24-metilen cikloartenol, etilkolestenol i citrostadienol (tablica 5). Rezultati prikazuju udio (%) pojedinih sterola u ukupnom udjelu sterola (g kg^{-1}) (slika 9) u analiziranim uzorcima. Iz rezultata je vidljivo da su svi identificirani steroli bili prisutni u svim ispitivanim uzorcima, ali su se uzorci međusobno statistički značajno ($p \leq 0,05$) razlikovali u udjelima pojedinih sterola (tablica 5).

Tablica 5. Sastav sterola u rizomu samonikle koprive s različitih lokacija na području RH

Uzorak	Kampesterol (%)	Kampestanol (%)	Stigmasterol (%)	β -sitosterol (%)	$\Delta 5$ -avenasterol (%)	Lanosterol (%)	Cikloartenol (%)	24-metilen cikloartenol (%)	Etilkolestenol (%)	Citrostadienol (%)
1	12,47 \pm 0,02 ^g	0,86 \pm 0,00 ^c	3,62 \pm 0,01 ^f	74,65 \pm 0,04 ^a	0,73 \pm 0,00 ^{a,b}	0,93 \pm 0,02 ^b	1,82 \pm 0,01 ^e	1,09 \pm 0,02 ^f	0,64 \pm 0,01 ^{a,b}	3,20 \pm 0,01 ^d
2	12,17 \pm 0,02 ^f	0,52 \pm 0,00 ^a	2,14 \pm 0,00 ^d	79,71 \pm 0,04 ^{b,c}	0,59 \pm 0,02 ^{a,b}	0,58 \pm 0,02 ^{a,b}	0,82 \pm 0,02 ^b	0,33 \pm 0,02 ^c	0,34 \pm 0,00 ^a	2,79 \pm 0,01 ^c
3	9,78 \pm 0,01 ^b	0,67 \pm 0,00 ^b	1,71 \pm 0,00 ^{b,c}	80,15 \pm 0,08 ^{c,d}	0,35 \pm 0,02 ^a	0,66 \pm 0,02 ^{a,b}	1,21 \pm 0,02 ^d	0,55 \pm 0,01 ^d	0,63 \pm 0,03 ^{a,b}	4,28 \pm 0,01 ^f
4	11,38 \pm 0,01 ^e	0,86 \pm 0,01 ^c	1,79 \pm 0,01 ^c	81,68 \pm 0,01 ^e	0,39 \pm 0,00 ^a	0,69 \pm 0,00 ^{a,b}	0,15 \pm 0,00 ^a	0,11 \pm 0,01 ^a	0,38 \pm 0,01 ^a	2,58 \pm 0,01 ^b
5	9,79 \pm 0,16 ^b	0,56 \pm 0,01 ^a	2,54 \pm 0,04 ^e	79,30 \pm 1,15 ^{b,c}	0,64 \pm 0,33 ^{a,b}	0,55 \pm 0,46 ^{a,b}	1,19 \pm 0,04 ^d	0,12 \pm 0,00 ^a	2,17 \pm 1,27 ^b	3,13 \pm 0,03 ^d
6	10,44 \pm 0,03 ^c	0,88 \pm 0,00 ^c	1,19 \pm 0,00 ^a	78,31 \pm 0,11 ^{b,c}	0,89 \pm 0,00 ^b	0,76 \pm 0,01 ^{a,b}	2,32 \pm 0,01 ^f	1,03 \pm 0,00 ^e	0,62 \pm 0,04 ^{a,b}	3,55 \pm 0,05 ^e
7	8,75 \pm 0,04 ^a	5,25 \pm 0,03 ^e	2,53 \pm 0,01 ^e	79,74 \pm 0,03 ^{b,c}	0,36 \pm 0,01 ^a	0,83 \pm 0,01 ^{a,b}	1,18 \pm 0,00 ^d	0,27 \pm 0,00 ^b	1,06 \pm 0,00 ^{a,b}	0,03 \pm 0,01 ^a
8	10,92 \pm 0,04 ^d	3,23 \pm 0,00 ^d	1,61 \pm 0,11 ^b	80,48 \pm 0,19 ^{c,d}	0,62 \pm 0,00 ^{a,b}	0,28 \pm 0,00 ^a	1,01 \pm 0,00 ^c	0,31 \pm 0,00 ^c	1,45 \pm 0,03 ^{a,b}	0,09 \pm 0,02 ^a
Prosječna vrijednost	10,71	1,61	2,14	79,25	0,57	0,66	1,21	0,48	0,91	2,46

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Najzastupljeniji sterol u svim uzorcima bio je β -sitosterol (prosječna vrijednost 79,25 %), slijedili su ga kampesterol (prosječna vrijednost 10,71 %), citrostadienol (prosječna vrijednost 2,46 %) i stigmasterol (prosječna vrijednost 2,14 %). Također, steroli zastupljeni u udjelu >1 % bili su kampestanol i cikloartenol (kampestanol=prosječna vrijednost 1,61 %, cikloartenol=prosječna vrijednost 1,21 %) dok su prosječne vrijednosti udjela ostalih sterola zabilježene u vrijednostima <1 %. Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima, koji navode da su β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol najprisutniji biljni steroli (Ostlund, 2002).

Također, dobiveni rezultati koji prikazuju β -sitosterol kao najzastupljenij sterol u rizomu koprive (tablica 5) su u skladu s istraživanjem Kopyt'Ko i sur. (2012) koji navode jednake rezultate.

Kao najzastupljenijeg sterola u svim uzorcima, udio β -sitosterol se kretao u rasponu od 74,65 % (uzorak 1) do 81,68 % (uzorak 4). Zanimljivo je da iako uzorak 4 ima najnižu koncentraciju ukupnih sterola (slika 9), β -sitosterol evidentno čini najviši udio prisutnih sterola. Uspoređujući ostale uzorke međusobno, nema statistički značajne razlike u udjelima β -sitosterola između sljedećih uzoraka: 2, 5, 6 i 7, te između 3 i 8 (tablica 5). U istraživanju koje su proveli Kovacheva i sur. (1990) plinskom kromatografijom je određen udio β -sitosterola u neosapunjivim koncentratima koprive u rasponu od 67,8 do 75,2 %. Uspoređujući njihove rezultate s rezultatima ovog rada, udio β -sitosterola je nešto viši za većinu uzoraka analiziranih u ovom radu u odnosu na vrijednosti koje Kovacheva i sur. (1990) navode. No, treba napomenuti kako oni nisu naveli detaljnije podatke o korištenim uzorcima koncentrata koprive.

Nadalje, Hornik i sur. (2013) su HPLC-NMR metodom iz korijena koprive izolirali 81 % β -sitosterola. Iz tablice 5 je vidljivo da samo uzorak 4 sadrži približnu vrijednost β -sitosterola (81,68 %).

Kao što je prethodno navedeno, kampesterol je sljedeći sterol po zastupljenosti u svim uzorcima i njegov udio kretao se u rasponu od 8,75 (uzorak 7) do 12,47 % (uzorak 1). Može se primijetiti da su najviše vrijednosti kampesterola određene u uzorcima s dvije lokacije staništa s područja Ozlja i okolice (uzorci 1 i 2), ali i da se vrijednosti udjela kampesterola međusobno znatno razlikuju u svim uzorcima, što se može pripisati utjecaju lokacije staništa. Dobiveni rezultati se slažu s onima dobivenim u istraživanju koje su proveli Tadić i sur. (2016), gdje se po zastupljenosti u ekstraktu koprive, kampesterol nalazi iza najzastupljenijeg β -sitosterola. Također, Hornik i sur. (2013) su u svome radu naveli da korijen koprive sadrži 6 % kampesterola, što je znatno niže od rezultata dobivenih u ovom istraživanju.

Udjeli citrostadienola u svim uzorcima također bilježe značajne razlike (tablica 5). Najviša vrijednost citrostadienola karakterizira uzorak 3 i iznosi 4,28 %, a najniže vrijednosti su određene u uzorcima s područja Like i Ogulina (uzorak 7=0,03 %, uzorak 8=0,09 %). Vrijednosti udjela citrostadienola u ostalim uzorcima kretao se od 2,58 do 3,55 %.

Stigmasterol je u uzorcima prisutan u rasponu od 1,19 – 3,62 %, dok se udjeli kampestanola kreću od 0,52 do 5,25 %. I kod udjela kampestanola se može primijetiti određena karakteristika lokacije staništa, budući da uzorci s područja Like i Ogulina, koji su imali najniže određen udio citrostadienola, bilježe najviše udjele kampestanola (uzorak 7=5,25 %, uzorak 8=3,23 %).

Udio cikloartenola se kretao od 0,15 do 2,32 %, s međusobno značajnim razlikama među uzorcima obzirom na lokaciju staništa, dok je udio etilkolestenola s najvišom vrijednosti od 2,17 % određen u uzorku 5, a najnižom u uzorku 2 (0,34 %). Ovdje se ponovno primjećuje zajednička karakteristika lokacija Like i Ogulina, koje karakterizira približno podjednaki udio etilkolestenola (uzorak 7=1,06 %, uzorak 8=1,45 %).

Lanosterol, Δ 5-avenasterol i 24-metilen cikloartenol su određeni u najnižim prosječnim vrijednostima (lanosterol=0,66 %, Δ 5-avenasterol=0,57 %, 24-metilen cikloartenol=0,48 %). Lanosterol je prisutan u približno jednakim udjelima u svim uzorcima, izuzev uzorka 8, kojeg karakterizira njegov najniži udio (0,28 %).

Određeno grupiranje uzoraka prisutno je i u udjelu Δ 5-avenasterola, gdje uzorci 3, 4 i 7 bilježe njegov udio ~0,36 %, a ostali uzorci dvostruko pa i trostruko više udjele (0,59 – 0,89 %).

I u udjelu 24-metilen cikloartenola postoje značajnije razlike među uzorcima. Za većinu uzoraka njegov udio određen je u vrijednostima <0,55 %, dok je samo kod dva uzorka njegov udio bio >1 % (uzorak 1=1,09 %, uzorak 6=1,03 %).

Treba napomenuti da u dostupnoj literaturi postoji vrlo malo podataka o sterolima koprive, a posebice o sterolima iz rizoma koprive. Stoga je rezultate koji se odnose na udio i sastav ostalih identificiranih sterola (izuzev β -sitosterola i kampesterola) bilo teško usporediti s postojećom dostupnom literaturom.

Upravo zbog malo dostupnih podataka o sastavu i udjelu sterola u rizomima koprive ovaj rad predstavlja vrijedne rezultate budući da pregledom dostupne literature do sada nije identificiran i kvantificiran broj sterola u rizomima koprive kao u ovom radu.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja i provedene statističke obrade može se zaključiti:

- 1.** Postoji statistički značajan utjecaj lokacije staništa na udio ukupnih sterola u korijenu samonikle koprive sakupljene na području Republike Hrvatske.
- 2.** Najviša koncentracija ukupnih sterola određena je u uzorku s područja Žumberka i iznosi $0,97 \text{ g kg}^{-1}$, a najniža koncentracija od $0,66 \text{ g kg}^{-1}$ određena je u uzorku s područja Zagreba.
- 3.** GC-FID/GC-MS analizom ispitan je profil sterola te su identificirani sljedeći steroli: kampesterol, kampestanol, stigmasterol, β -sitosterol, $\Delta 5$ -avenasterol, lanosterol, cikloartenol, 24-metilen cikloartenol, etilkolestenol i citrostadienol. Identificirani steroli se nalaze u svim analiziranim uzorcima, ali se njihovi udjeli u pojedinim uzorcima statistički značajno razlikuju.
- 4.** Najzastupljeniji sterol u svim uzorcima je bio β -sitosterol, zastupljen u prosječnom udjelu 79,25 %. Slijede kampesterol (prosječna vrijednost udjela 10,71 %), citrostadienol, (prosječna vrijednost udjela 2,46 %) i stigmasterol (prosječna vrijednost udjela 2,14 %).
- 5.** Najviši udio β -sitosterola određen je u uzorku s područja Zagreba (81,68 %), a najviše vrijednosti kampesterola su određene u uzorcima s područja Ozlja i okolice (12,47 i 12,17 %). Također, uzorci s područja Like i Ogulina bilježe najviše udjele kampestanola (5,25 i 3,23 %) i približno podjednake udjele etilkolestenola (1,06 i 1,45 %).

6. LITERATURA

1. Aboobucker, S. I., Suza, W. P. (2019) Why do plants convert sitosterol to stigmasterol? *Frontiers in Plant Science*, **10**, 354.
2. Assaf, H. K., Nafady, A. M., Allam, A. E., Hamed, A. N., Kamel, M. S. (2020) Phytochemistry and biological activity of family "Urticaceae": a review. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, **3(3)**: 150-176.
3. Berges, R. R., Windeler, J., Trampisch, H. J., Senge, T. H., β -Sitosterol Study Group. (1995) Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. *The Lancet*, **345(8964)**: 1529-1532.
4. Chaurasia, N., Wichtl, M. (1987) Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *Journal of Natural Products*, **50(5)**: 881-885.
5. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18(14)**: 1818-1892.
6. Durak, I., Biri, H., Devrim, E., Sözen, S., Avcı, A. (2004) Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **3(9)**: 855-857.
7. Esposito, S., Bianco, A., Russo, R., Di Maro, A., Isernia, C., Pedone, P. V. (2019) Therapeutic perspectives of molecules from *Urtica dioica* extracts for cancer treatment. *Molecules*, **24(15)**, 2753.
8. Gül, S., Demirci, B., Başer, K. H. C., Akpulat, H. A., Aksu, P. (2012) Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **88(5)**: 666-671.
9. Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H. N., Ellegård, L., Jessup, W., ... Silbernagel, G. (2014). Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, **232(2)**: 346-360.
10. Gylling, H., Simonen, P. (2015) Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients*, **7(9)**: 7965-7977.

11. Hirano, T., Homma, M., Oka, K. (1994) Effects of Stinging Nettle Root Extracts and Their Steroidal Components on the Na⁺, K⁺-ATPase of the Benign Prostatic Hyperplasia¹. *Planta medica*, **60(01)**: 30-33.
12. Horník, Š., Sajfrtová, M., Karban, J., Sýkora, J., Březinová, A., Wimmer, Z. (2013) LC-NMR technique in the analysis of phytosterols in natural extracts. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2013**: 1-7.
13. HR EN ISO 12228:2004, Životinjske i biljne masti i ulja-Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola-Metoda plinske kromatografije.
14. Kopyt'Ko, Y. F., Lapinskaya, E. S., Sokol'Skaya, T. A. (2012) Application, chemical composition, and standardization of nettle raw material and related drugs. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **45(10)**: 622-631.
15. Kovacheva, E., Ganchev, G., Neicheva, A., Ivanova, I., Konoushlieva, M., Andreev, V. (1990) Gas chromatographic determination of sterols in fat-soluble concentrates obtained from plant materials. *Journal of Chromatography A*, **509(1)**: 79-84.
16. Kregiel, D., Pawlikowska, E., Antolak, H. (2018) *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, **23(7)**, 1664.
17. Kukrić, Z. Z., Topalić-Trivunović, L. N., Kukavica, B. M., Matoš, S. B., Pavičić, S. S., Boroja, M. M., Savić, A. V. (2012) Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, **(43)**: 257-272.
18. Mazalin Protulipac, J. (2016) *Utjecaj fitosterola na omjer debljina intime i medije karotidnih i femoralnih arterija te metaboličke pokazatelje u bolesnika s metaboličkim sindromom [Phytosterol effects on carotid and femoral IMT and metabolic parameters in patients with metabolic syndrome]* (Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu).
19. Moreau, R. A., Whitaker, B. D., Hicks, K. B. (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, **41(6)**: 457-500.
20. Müller, C., Bracher, F. (2015) Determination by GC-IT/MS of phytosterols in herbal medicinal products for the treatment of lower urinary tract symptoms and food products marketed in Europe. *Planta Medica*, **81(07)**: 613-620.
21. Nahata, A., Dixit, V. K. (2012) Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia*, **44**: 396-409.

22. Nencu, I., Gird, C. E., Duțu, L. E., Costea, T., Popescu, M. L. (2014) Seasonal variation of lipophylic compounds of *Urtica dioica* l. leaves. *Revista Farmaceutică a Moldovei*, **(3-4)**, 73.
23. Ostlund Jr, R. E. (2002) Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, **22(1)**: 533-549.
24. Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *The Scientific World Journal*, **2012**:1-12.
25. Piironen, V., Lampi, A. M. (2004). Occurrence and levels of phytosterols in foods. Marcel Dekker: New York, NY, USA., str. 1-32.
26. Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., Lampi, A. M. (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80(7)**: 939-966.
27. Pine, S.H. (1994) Organska kemija, 3. promij. Izd. (prijevod I. Bregovec i V. Rapić), Školska knjiga, Zagreb, str. 873-876.
28. Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., Romani, A. (2008) Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(19)**: 9127-9132.
29. Radman, S., Žutić, I., Fabek, S., Žlabur, J. Š., Benko, B., Toth, N., Čoga, L. (2015) Influence of nitrogen fertilization on chemical composition of cultivated nettle. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **27(12)**: 889-896.
30. Rutto, L. K., Xu, Y., Ramirez, E., Brandt, M. (2013) Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International Journal of Food Science*, **2013**: 1-9.
31. Sajfrtová, M., Sovová, H., Opletal, L., Bártlová, M. (2005) Near-critical extraction of β -sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. *The Journal of Supercritical Fluids*, **35(2)**: 111-118.
32. Semalty, M., Adhikari, L., Semwal, D., Chauhan, A., Mishra, A., Kotiyal, R., Semalty, A. (2017) A Comprehensive Review on Phytochemistry and Pharmacological Effects of Stinging Nettle (*Urtica dioica*). *Current Traditional Medicine*, **3(3)**: 156-167.
33. Sialvera, T. E., Pounis, G. D., Koutelidakis, A. E., Richter, D. J., Yfanti, G., Kapsokefalou, M., ... Zampelas, A. (2012) Phytosterols supplementation decreases plasma small and

- dense LDL levels in metabolic syndrome patients on a westernized type diet. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **22(10)**: 843-848.
34. Tadić, V. M., Ivana, A. A., Stanković, M., Maksimović, S. (2016) Analysis of Supercritical Carbon (IV) Oxide Extracts From Selected Plants. *Supercritical Fluid Applications*, **19**.
35. Toplak Galle K. (2001) Hrvatsko Ljekovito Bilje, 1.izd., Mozaik knjiga, Zagreb. str. 242 - 243.
36. Valitova, J. N., Sulkarnayeva, A. G., Minibayeva, F. V. (2016) Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow)*, **81(8)**: 819-834.
37. Vlahakis, C., Hazebroek, J. (2000) Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **77(1)**: 49-53.
38. Węglarz, Z., Rosłon, W. (2000) Developmental and chemical differentiation of male and female underground organs of nettle (*Urtica dioica* L.). *Herba Polonica*, **46(4)**: 324-331.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Katarina Robić

ime i prezime studenta