

Karakterizacija bioaktivnog sastava dobričice (*Glechoma hederacea* L.) primjenom frakcioniranja polifenolnih spojeva

Žepić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:797422>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ivana Žepić

7652/PT

**KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNOG
SASTAVA DOBRIČICE (*Glechoma
hederacea* L.) PRIMJENOM
FRAKCIONIRANJA POLIFENOLNIH
SPOJEVA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Mentor: Prof.dr.sc. Draženka Komes

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Karakterizacija bioaktivnog sastava dobričice (*Glechoma hederacea* L.) primjenom
frakcioniranja polifenolnih spojeva
Ivana Žepić, 0058213275**

Sažetak: Dobričica (*Glechoma hederacea* L.) je ljekovita biljka s dugom tradicijom primjene u narodnoj medicini. Biološki aktivne komponente dobričice odgovorne za njezina ljekovita svojstva su polifenolni spojevi. U svrhu detaljnije karakterizacije polifenolnog sastava dobričice, cilj rada bio je primjenom postupka frakcioniranja izdvojiti i analizirati četiri frakcije: slobodni topljivi, esterificirani, glikozilirani i netopljivi vezani polifenolni spojevi. Dobivene frakcije analizirane su primjenom spektrofotometrije (udjel ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet) te HPLC-DAD (pojedinačni polifenolni spojevi) metodologije. U dobričici su polifenoli većinski prisutni kao esteri kafeinske kiseline - ružmarinska ($6,64 \text{ mg g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$) i klorogenska kiselina ($1,11 \text{ mg g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$) te kao flavonoid rutin ($1,87 \text{ mg g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$). U frakciji glikoziliranih polifenolnih spojeva identificiran je kvercetin što potvrđuje da je rutin dominantan glikozid u izvornom ekstraktu. Prisutnost sinapinske kiseline u frakciji esterificiranih polifenolnih spojeva upućuje na moguće postojanje složenijih esterificiranih konjugata. Vezani polifenolni spojevi nemaju izražen doprinos na polifenolni sastav dobričice. Najveći antioksidacijski kapacitet, prema ABTS i DPPH metodi, određen je u frakciji slobodnih topljivih polifenolnih spojeva ($80,15 \text{ } \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$ ABTS; $70,25 \text{ } \mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$ DPPH). Dobričica se može smatrati dobrim izvorom polifenola izraženog antioksidacijskog kapaciteta.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, dobričica, frakcioniranje, HPLC, polifenolni spojevi

Rad sadrži: 34 stranice, 12 slika, 2 tablice, 38 literaturnih navoda, 0 priloga

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: Prof. dr. sc. Draženka Komes

Pomoć pri izradi: Danijela Šeremet, mag.ing.

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Carbohydrates and Confectionery Products
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

**Characterization of the bioactive composition of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) using
fractionation of polyphenolic compounds**
Ivana Žepić, 0058213275

Abstract: Ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) is a medicinal plant which has been widely used in folk medicine. Biologically active compounds responsible for its medicinal properties are polyphenols. For the purpose of more detailed characterization of the polyphenolic composition of ground ivy, the aim of this study was to isolate and analyse four fractions using fractionation: free soluble, esterified, glycosylated and insoluble bound polyphenols. The obtained fractions were analysed using spectrophotometry (total polyphenol content and antioxidant capacity) and HPLC-DAD methodology (individual polyphenolic compounds). In ground ivy, polyphenols were mostly present as esters of caffeic acid – rosmarinic (6.64 mg g⁻¹_{dmb.}) and chlorogenic acid (1.11 mg g⁻¹_{dmb.}), as well as, flavonoid rutin (1.87 mg g⁻¹_{dmb.}). Quercetin was detected in glycosylated phenolic fraction confirming rutin as dominant glycoside in the initial extract. Presence of sinapic acid in esterified phenolic fraction implies possible existence of more complex esterified conjugates. Insoluble bound phenolics do not contribute significantly to the polyphenol composition of ground ivy. The highest antioxidant capacity, according to ABTS and DPPH assays, was determined in free soluble phenolic fraction (80.15 μmol Trolox-a g⁻¹_{dmb.} ABTS; 70.25 μmol Trolox-a g⁻¹_{dmb.} DPPH). Ground ivy can be considered as a relatively good source of polyphenols with a potent antioxidant capacity.

Keywords: antioxidant capacity, ground ivy, fractionation, HPLC, polyphenols

Thesis contains: 34 pages, 12 figures, 2 tables, 38 references, 0 supplements

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: Ph. D. Draženka Komes, Full Professor

Technical support and assistance: Danijela Šeremet, MSc.

Defence date:

Ovaj završni rad izrađen je u okviru projekta: „Formuliranje inkapsuliranih sustava bioaktivnih sastojaka tradicionalnih biljnih vrsta: trave ive i dobričice namijenjenih razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda“.

Sadržaj

§ 1. UVOD	1
§ 2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Ljekovite biljke	2
2.2. Polifenolni spojevi	3
2.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva	5
2.2.2. Netopljivi vezani polifenolni spojevi.....	6
2.2.3. Konjugirani topljivi polifenolni spojevi.....	7
2.3. Dobričica (<i>Glechoma hederacea</i> L.)	8
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali	10
3.2. Kemikalije	10
3.3. Uređaji i posuđe	11
3.4. Metode	12
3.4.1. Frakcioniranje i ekstrakcija polifenolnih spojeva.....	12
3.4.2. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakta i frakcija.....	17
3.4.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola	17
3.4.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	18
3.4.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	19
3.4.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti – HPLC	20
§ 4. RASPRAVA I REZULTATI	22
4.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva izdvojenih iz dobričice primjenom postupka frakcioniranja	22
4.2. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet polifenolnih frakcija dobričice	27
§ 5. ZAKLJUČCI	30
§ 6. LITERATURNI IZVORI	XXXI

§ 1. UVOD

Dobričica je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice usnača (lat. *Laminaceae*). Široko je rasprostranjena na području Azije, Europe i SAD-a, a često se nalazi i na hrvatskim travnjacima i livadama. Dobričica se od davnina priprema u obliku čaja ili svježeg soka te se koristi kao lijek u tradicionalnoj medicini. Najviše se koristila za liječenje kašlja i respiratornih tegoba, groznice i opekline. Prije popularizacije hmelja koristila se i u pivarstvu. Brojni pozitivni učinci ove biljke na zdravlje rezultat su mnogih vrijednih biološki aktivnih spojeva u njezinom sastavu. Najpoznatiji biološki aktivni spojevi u dobričici su polifenoli.

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti, koji iako nenutritivni, imaju iznimno važnu ulogu za zdravlje ljudi, ponajprije u zaštiti stanica od oksidacije slobodnih radikala. Često se nalaze u mnogim namirnicama, bilo da su prirodno prisutni ili da je određena hrana obogaćena polifenolima. Polifenoli se u prirodi nalaze u topljivom obliku, prisutni kao slobodni ili konjugirani (esterificirani ili glikozilirani), i u vezanom netopljivom obliku. U svrhu karakterizacije polifenolnog sastava pojedine sirovine/proizvoda provodi se ekstrakcija polifenolnih spojeva inovativnim ili konvencionalnim ekstrakcijskim tehnikama, a kako bi se detaljnije odredili slobodni, konjugirani i vezani polifenolni spojevi provodi se frakcijska ekstrakcija.

Cilj ovog rada je definirati polifenolni sastav dobričice primjenom postupka frakcioniranja pri čemu će se izdvojiti četiri frakcije: slobodni topljivi, esterificirani, glikozilirani i netopljivi vezani polifenolni spojevi. Karakterizacijom polifenolnih frakcija proširit će se spoznaje o polifenolnom sastavu dobričice, čime će se omogućiti šira primjena ove ljekovite biljke kao potencijalno vrijednog izvora polifenolnih spojeva s ciljem razvoja novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

§ 2. TEORIJSKI DIO

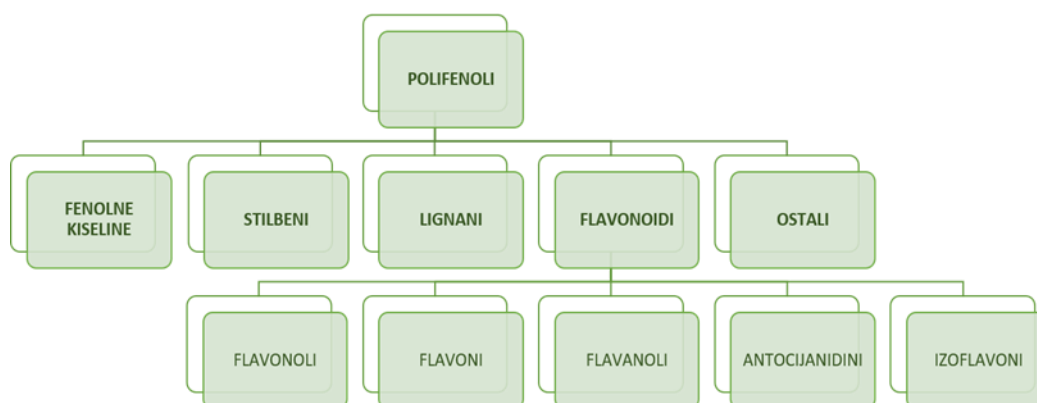
2.1. Ljekovite biljke

Republika Hrvatska prema broju biljnih vrsta po površini zauzima čak treće mjesto u Europi što je čini jednom od florom najbogatijih zemalja (Nikolić, 2001). Područje Republike Hrvatske broji 5536 biljnih vrsta i podvrsta ukupno. Najveći broj podataka o hrvatskoj flori vezan je upravo uz ljekovite biljke što i nije iznenađujuće s obzirom na dugu uporabu biljnih pripravaka u području farmacije i medicine. Nicolo Roccabonella autor je srednjovjekovnog djela *Liber de simplicibus* koji predstavlja najstariji zapis narodnih imena ljekovitih biljaka na hrvatskom jeziku s pripadajućim ilustracijama. Porodicama *Poaceae*, *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae* i *Laminaceae* pripada najveći broj korištenih biljaka na ovome području. Čak 25 % tih biljaka vezano je uz upotrebu u medicini, dok je 12 % vezano uz prehranu i 5 % uz prehrambene aditive (Nikolić i Rešetnik, 2007). Istraživanja su pokazala da čak 80 % Afrikanaca i Azijata koristi isključivo ljekovite biljke u svrhu liječenja raznih oboljenja, a pretpostavlja se da 25% lijekova prisutnih na tržištu potječu iz prirodnih izvora (Jamshidi-Kia i sur., 2018; Tlili i Sarikurkcu, 2020). Sve većem broju zahtjeva za prirodnim lijekovima pridonijela je cijena kemijski sintetiziranih lijekova, kao i smanjen rizik od nuspojava. Iz navedenih razloga sve je veći porast potražnje za biljnim ljekovitim pripravcima u zemljama Europske Unije (Tlili i Sarikurkcu, 2020). U posljednjih nekoliko desetljeća bilježi se godišnji rast 8-15 % za biljnim lijekovima u europskim zemljama (Mosihuzzaman, 2012; Jamshidi-Kia i sur., 2018). Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO – *World Health Organization*), u ljekovite biljke ubrajaju se sve biljne vrste koje u strukturi sadrže biološki aktivne spojeve koji se mogu koristiti u terapijske ili kemijsko-farmaceutske svrhe. Dijelovi biljke koji se koriste u svrhu medicinskih i prehrambenih pripravaka su sjemenke, stabljika, listovi, cvijet, korijen ili cijela biljka (Jamshidi-Kia i sur., 2018). Farmakološka svojstva biljaka produkt su sekundarnih biljnih metabolita. Iako sekundarni biljni metaboliti nemaju ključnu ulogu za rast, razvoj i metaboličke procese biljke, od značajne su važnosti za ljudsko zdravlje. U tu skupinu ubrajamo organske spojeve poput alkaloida, terpenoida i fenolnih spojeva (Singh i Geetanjali, 2018).

2.2. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi pripadaju jednoj od najvećih i široko rasprostranjenih skupina sekundarnih biljnih metabolita (Scalbert i Williamson, 2000). Njihova funkcija u biljkama očituje se u zaštiti od patogena i ultraljubičastog zračenja. Prehrambeni proizvodi poput žitarica, voća, povrća, kave, vina, čokolade i maslina obiluju polifenolnim spojevima (D'Archivio i sur., 2007). Iako nemaju nutritivnu vrijednost od velike su važnosti za organizam ljudi zbog biološki aktivnih spojeva. Polifenolni spojevi smatraju se funkcionalnim komponentama u hrani zbog izraženog antioksidacijskog djelovanja uslijed oksidacijskog stresa u stanici. Također, imaju značajnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka, osteoporoze, dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti (D'Archivio i sur., 2007; Acosta-Estrada i sur., 2014; Zhang i sur., 2020).

Polifenolni spojevi mogu se podijeliti prema podrijetlu, biološkoj funkciji, rasprostranjenosti i kemijskoj strukturi (Bravo, 1998). Prema kemijskoj strukturi dijele se na jednostavne i složene (Slika 1.). Jednostavni polifenolni spojevi sastoje se od jednog fenolnog aromatskog prstena povezanog s hidroksilnom skupinom, a složeni polifenolni spojevi sadrže više povezanih fenolnih prstena s hidroksilnim skupinama. Ovisno o kemijskoj strukturi klasificiraju se u pet skupina: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, lignani i ostali. Flavonoidi se, kao najveća skupina, polifenolnih spojeva dijele u pet podskupina: flavonoli, flavoni, flavanoli, izoflavoni i antocijanidini (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2018). Na slici 1. prikazana je podjela polifenolnih spojeva prema kemijskoj strukturi. Što se tiče lokacije u biljci polifenoli mogu se identificirati kao slobodni, u topljivoj frakciji stanice (tanini), ili vezani na strukture stanične stijenke (polisaharide, proteine) tvoreći stabilne netopljive komplekse (fenolne kiseline, kondenzirani tanini (Shahidi i Yeo, 2016).



Slika 1. Podjela polifenolnih spojeva (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004)

Fenolne kiseline su spojevi koji sadrže benzenski prsten, karboksilnu skupinu i jednu ili više hidroksilnih i/ili metoksiliranih grupa. Dijele se u dvije skupine– derivati hidroksicimetne kiseline i derivati hidroksibenzojeve kiseline. U skupinu derivata hidroksibenzojeve kiseline ubrajaju se: galna, elaginska, protokatehinska, 4-hidroksibenzojeva i druge. Jestive biljke uglavnom su siromašne hidroksibenzojevom kiselinom, izuzev crvenog bobičastog voća poput kupina (270 mg kg^{-1}) i čaja koji obiluje galnom kiselinom ($4,5 \text{ g kg}^{-1}$). Najpoznatiji derivati hidroksicimetne kiseline su: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Fenolne kiseline uglavnom se nalaze u vezanom (esterificiranom) obliku, osim u procesiranoj hrani koja je podvrgnuta procesima sterilizacije, fermentacije ili zamrzavanja. Kafeinska kiselina najzastupljenija je kiselina u većini voća, uz klorogensku kiselinu koja je najviše zastupljeni polifenolni spoj u kavi (Manach i sur., 2018).

Flavonoidi su najrasprostranjeniji polifenolni spojevi. Od svih flavonoida, flavonoli su najzastupljeniji polifenolni spojevi u hrani. Glavni predstavnici flavonola u hrani su kvercetin i kempferol, a namirnica koja je najbogatija flavonolima je luk ($1,2 \text{ g kg}^{-1}$) (Manach i sur., 2004). Međusobno se razlikuju po stupnju hidroksilacije i prisustvu dvostruke veze C_2-C_3 u heterocikličkom prstenu (Sánchez-Moreno, 2002). Također, ističu se po svojim izraženim antiradijacijskim sposobnostima (Shan i sur., 2013). U hrani su prisutni kao slobodni i vezani polifenolni spojevi (Shahidi i Yeo, 2016).

2.2.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva

Ekstrakcija je separacijska metoda u kojoj se topljive komponente smjese odvajaju od manje topljivih ili netopljivih komponenti otapanjem u odgovarajućem otapalu. Princip ekstrakcije temelji se na difuziji, a s obzirom na agregatna stanja faza razlikujemo ekstrakciju kruto-tekuće i tekuće-tekuće. Ekstrakcijske metode uobičajeno se dijele na konvencionalne i inovativne. Odabir metode ovisi o vrsti biljnog materijala, prisutnim spojevima (Mourtzinis i Goula, 2019), veličini čestica uzorka te prisustvu interferirajućih spojeva (Brglez Mojzer i sur., 2016). Prije provedbe ekstrakcije biljni uzorci se podvrgavaju mljevenju, sušenju i homogenizaciji. Odabir vrste sušenja utječe na ukupni udio polifenola. Sušenje liofilizacijom, u biljnim uzorcima, zadržava veći udio polifenola za razliku od sušenja u struji zraka (Brglez Mojzer i sur., 2016). Konvencionalne ekstrakcijske metode podrazumijevaju ekstrakciju kruto-tekuće i tekuće-tekuće pri čemu se biljni materijal ekstrahira infuzijom, dekokcijom, maceracijom ili Soxhlet ekstrakcijom. Na učinkovitost ekstrakcije ovog tipa utječu pH, odabir otapala, temperatura, vrijeme ekstrakcije i stupanj usitnjenosti materijala. Najčešće se koriste polarna ili nepolarna organska otapala poput metanola, etanola, etil-acetata, heksana i dietil-etera. Polarna otapala često se koriste u kombinaciji s vodom. Također, u provedbi konvencionalne ekstrakcije troše se velike količine otapala jer se mora osigurati da biljni materijal bude potpuno uronjen u otapalo tijekom cijele ekstrakcije. Temperatura je iznimno važan čimbenik u provođenju ekstrakcije s obzirom da se polifenolni spojevi smatraju termolabilnim spojevima. Primjena konvencionalnih ekstrakcija uz sebe veže mnoge nedostatke poput velike potrošnje otapala koja su štetna po zdravlje, mogućnost istih da zaostanu u konačnom produktu, velike potrošnje energije i toplinske razgradnje termolabilnih spojeva (Brglez Mojzer i sur., 2016; Mourtzinis i Goula, 2019). S obzirom na mnoge nedostatke konvencionalnih metoda, u novije vrijeme razvile su se inovativne ekstrakcijske metode u vidu poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije, vremena ekstrakcije te uštede energije i kemikalija. Pod inovativne ekstrakcijske tehnike ubrajamo mikrovalnu i ultrazvučnu ekstrakciju (u kombinaciji ili pojedinačno), ekstrakciju subkritičnom vodom, superkritičnim fluidima i enzimsku ekstrakciju (Mourtzinis i Goula, 2019). Polifenolni spojevi u stanici se nalaze u topljivom ili netopljivom obliku. Topljivi polifenolni spojevi dolaze u slobodnom ili konjugiranom obliku (glikozidi ili esteri), dok su netopljivi polifenoli vezani kovalentnim vezama s velikim staničnim molekulama poput pektina, celuloze i strukturnih proteina uvjetujući njihovu netopljivost (Shahidi i Yeo, 2016; Arruda i sur., 2018). Određivanjem udjela ukupnih polifenola konvencionalnim metodama dolazi do izostavljanja netopljivih polifenolnih spojeva. Postoji nekoliko razloga zbog kojih su netopljivi polifenolni

spojevi važni za ljudski organizam. Prilikom konzumacije netopljivih polifenola dolazi do njihove razgradnje crijevnim enzimima pri čemu se oslobađaju slobodni i topljiviji polifenolni spojevi koji se mogu apsorbirati bez značajne degradacije (Arruda i sur., 2018). Adom i Liu (2002) otkrili su da netopljivi polifenoli najviše doprinose ukupnom antioksidacijskom kapacitetu pšenice, kukuruza, riže i zobi. Postupak određivanja slobodnih, konjugiranih i vezanih polifenola iz biljnih materijala određuje se u nekoliko koraka, koji uključuju ekstrakciju kruto-tekuće, alkalnu i kiselinsku hidrolizu, pri čemu se izdvajaju polifenolne frakcije. Stoga se ovakav način izdvajanja polifenolnih spojeva naziva frakcijska ekstrakcija (Arruda i sur., 2018).

2.2.2. Netopljivi vezani polifenolni spojevi

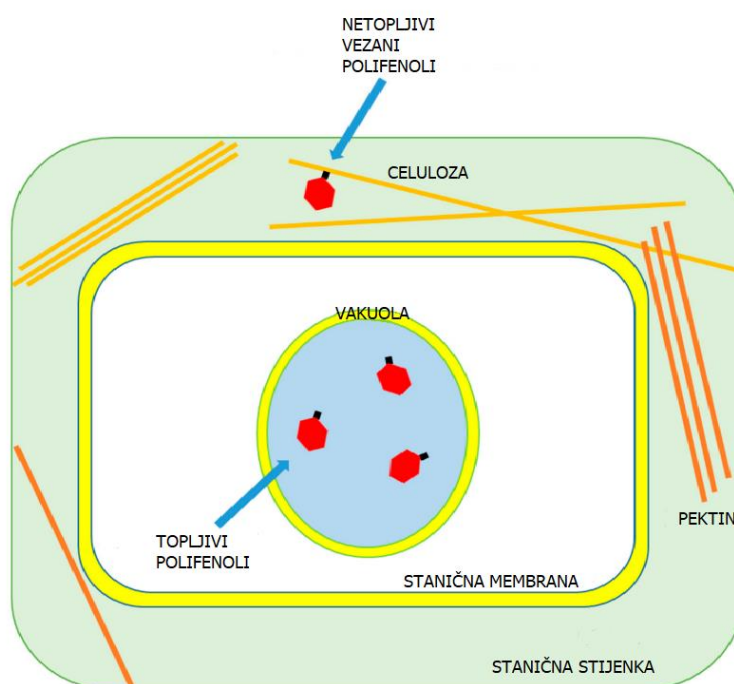
Netopljivi vezani polifenolni spojevi nalaze se kovalentno vezani za gradivne elemente stanične stijenke poput celuloze, pektina, arabinoksilana i strukturnih proteina. Te veze mogu biti esterske, eterske ili ugljik-ugljik veze (Acosta-Estrada i sur., 2014; Shahidi i Yeo, 2016; Dzah i sur., 2020). Takve veze imaju ključnu ulogu u povezivanju tvari stanične stijenke i stvaranju čvrste strukture matriksa stanične stijenke, kao i zaštite od gljivičnih infekcija i UV oštećenja kod biljaka. Nadalje, netopljivi vezani polifenolni spojevi, za razliku od slobodnih, ne mogu se apsorbirati u tankom crijevu upravo zbog kovalentnih veza koje tvore s netopljivim makromolekulama. Iz tog razloga podliježu procesima fermentacije u debelom crijevu nakon kojih se otpuštaju u topljivom obliku i mogu se apsorbirati. *Bifidobacterium spp.* i *Lactobacillus spp.* su bakterije zaslužne za oslobađanje netopljivih vezanih polifenolnih spojeva i njihovu apsorpciju u debelom crijevu (Shahidi i Yeo, 2016). Ti mikroorganizmi luče mnoge ekstracelularne enzime poput proteaza koje hidroliziraju kovalentne veze između makromolekula i polifenolnih spojeva. Oslobođeni polifenolni spojevi imaju važan utjecajna crijevnu floru jer smanjuju pH i sprječavaju rast mikroorganizama koji uzrokuju rak (Shahidi i Yeo, 2016). Primjerice, Yi i suradnici (2005) otkrili su da polifenolni spojevi iz borovnice smanjuju proliferaciju stanica raka crijeva (HT-29 i Caco-2) za čak 50 %.

Za ekstrakciju netopljivih vezanih polifenolnih spojeva koriste se kiselinska i alkalna hidroliza kao dvije najčešće tehnike. U novije vrijeme sve se više koristi enzimaska hidroliza i hidroliza potpomognuta mikrovalnim zračenjem u svrhu boljeg oslobađanja polifenolnih spojeva (Zhang i sur., 2020). Kod alkalne/kiselinske hidrolize važno je optimizirati parametre procesa, kao što su koncentracija lužine/kiseline, vrijeme hidrolize i temperatura kako ne bi došlo do degradacije polifenola. Kiselinska hidroliza provodi se najčešće s otopinom

klorovodične kiseline u vodi/metanolu i selektivno djeluje na razaranje glikozidnih veza između polifenola i šećera (Acosta-Estrada i sur., 2014). Prednost kiselinske hidrolize je što se nakon neutralizacije i filtracije ekstrahirani vezani polifenolni spojevi mogu koristiti za daljnje analize. Unatoč jednostavnoj metodi ekstrakcije, povišena temperatura prilikom provođenja kiselinske hidrolize često utječe na degradaciju polifenolnih spojeva u uzorcima pa se češće koristi alkalna hidroliza ili se primjenjuje prvo alkalna, zatim kiselinska hidroliza. Sani i suradnici (2012) proučavali su razlike u polifenolnom sastavu proklijale smeđe riže nakon alkalne i kiselinske hidrolize te ustanovili da su neke fenolne kiseline (kafeinska, protokatehinska i siringinska) pronađene u alkalnim hidrolizatima, no nisu u kiselinskim. Zaključili su da postoji razlika u sastavu hidrolizata zbog degradacije polifenolnih spojeva kiselinskom hidrolizom. Alkalna hidroliza, za razliku od kiselinske, djeluje i na esterske i na eterske veze, a provodi se uz različite koncentracije natrijevog hidroksida. Unatoč tomu što se alkalna hidroliza provodi pri sobnoj temperaturi, zbog nestabilnosti polifenolnih spojeva u lužnatom mediju, najčešće se provodi uz dodatak askorbinske kiseline i etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) kako bi se spriječio gubitak polifenolnih spojeva uslijed oksidacije (Acosta-Estrada i sur., 2014).

2.2.3. Konjugirani topljivi polifenolni spojevi

Topljivi polifenolni spojevi unutar stanice locirani su u vakuoli te se tamo nalaze u slobodnom obliku ili prisutni kao konjugati vezani esterskom ili glikozidnom vezom. Jedna od najvažnijih skupina takvih konjugiranih spojeva su flavonoidi. Flavonoidi su u biljnim stanicama uglavnom prisutni u glikoziliranom obliku. Pretpostavlja se da glikozilirani oblik flavonoide štiti od toksina, degradacije te poboljšava transport kroz membrane povećavajući topljivost u vodi (Risipail, Morris i Webb, 2005). Fenolne kiseline, osim u netopljivom vezanom obliku, mogu biti prisutne i kao esteri (Lafay i Gil-Izquierdo, 2008). Za razliku od netopljivih vezanih polifenolnih spojeva, konjugirani polifenolni spojevi apsorbiraju se u tankom crijevu te dalje odlaze u krvotok (Shahidi i Yeo, 2016). Obzirom da su konjugati topljivi u vodi određuju se iz vodene faze ukupnih topljivih polifenolnih spojeva u uzorku. Na slici 2. prikazana je lokacija netopljivih vezanih i konjugiranih topljivih polifenolnih spojeva u biljnoj stanici.



Slika 2. Lokacija netopljivih vezanih i topljivih (konjugiranih) polifenolnih spojeva u biljnoj stanici (prema Shahidi i Yeo, 2016)

2.3. Dobričica (*Glechoma hederacea* L.)

Carl Linne prvi je puta imenovao dobričicu 1753. godine u knjizi *Species Plantarum*. Ime roda potječe od grčke riječi „glechon“ što u prijevodu znači menta, odnosno majčina dušica. Latinski naziv za vrstu „hederacea“ znači nalik na bršljan (engl. ivy = bršljan) najviše zbog oblika listova i puzavosti (Mitich, 1994). Dobričica pripada porodici *Laminaceae* koja je osma najrasprostranjenija porodica biljaka na području Republike Hrvatske, a obuhvaća i većinu aromatičnog i ljekovitog bilja na tom području (Nikolić, 2007). Nadzemni dio biljke posjeduje adstringetna, diuretička, kardiotonična i simulirajuća svojstva (Kumarasamy i sur., 2002). Dosadašnja istraživanja pokazala su pozitivan učinak biljke na respiratorne probleme, glavobolju i hiperpigmentaciju (Kumarasamy i sur., 2002; Mitich, 1994; Qiao i sur., 2012). U tradicionalnoj medicini dobričica se koristila za liječenje mnogih zdravstvenih tegoba u obliku čaja i svježeg soka, a zanimljiva je činjenica da se koristila u proizvodnji piva do otkrića hmelja (Kim i sur., 2011; Mitich, 1994).

Dobričica je domorodna biljka britanskog otočja, rasprostranjena uglavnom po cijeloj Europi (osim Islanda, Krete, Farosa i Turske), sjevernoj i zapadnoj Aziji, kao i većim dijelovima Amerike (Azimova i Glushenkova, 2012). U Republici Hrvatskoj česta je biljka, koja se, zbog uglavnom šumske vegetacije, nalazi na gotovo cijelom teritoriju države, uz iznimku primorskog krajolika s mediteranskom florom (Nikolić i Rešetnik, 2007). Nastanjuje livade, živice i jarke umjerenog klimatskog pojasa. Najbolje raste na vlažnim, plodnim i karbonatnim tlima. pH tla varira od blago kiselog do blago alkalnog (5,5 – 7,5) iako se može naći i kiselijem tlu (pH<4) (Azimova i Glushenkova, 2012).

Nalazi se uglavnom na zasjenjenim ili blago sunčanim staništima. Ukoliko raste na zasjenjenom staništu, lišće će biti zelene boje, dok će rastom na sunčanom staništu nerijetko lišće i stabljika pocrveniti (Mitich, 1994). Rast dobričice je horizontalan, odnosno u širinu, zbog dugačke puzajuće stabljike prema čemu je dobila nadimak „creeping charlie“ (Anonymus 1). Listovi su okruglog oblika i srcolikih rubova (Slika 3.), zelene boje, duljine 0,5-3 cm i širine 0,5-4 cm (Anonymus 2). Cvjetovi su usnati, ljubičaste ili plave boje duljine oko 1 cm. Cvate od travnja do kolovoza najčešće, rjeđe u jesen (Grlić, 1990).



Slika 3. Dobričica (Anonymus 2)

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U ovome radu korištena je biljka dobričica (*Glechoma hederacea* L.) kupljena od proizvođača Travar MB d.o.o. (Bjelovar, Hrvatska). Korišten je nadzemni dio biljke koji je usitnjen te prosijan kroz sito veličine pora 450 µm čime je dobivena homogena frakcija dobričice korištena u daljnjim eksperimentima.

3.2. Kemikalije

Sve kemikalije i reagensi korišteni u ovome radu bili su visoke analitičke čistoće (p.a.) ili HPLC čistoće.

Priprema ekstrakta i frakcija polifenolnih spojeva:

- Aceton, Fisher Chemical (New Hampshire, SAD)
- L-askorbinska kiselina, Merck (St.Louis, SAD)
- Etil-acetat, Lach-ner (Neratovice, Republika Češka)
- Klorovodična kiselina, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Komplekson III (etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol, dihidrat), T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Metanol, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Natrijev klorid, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, Francuska)
- Natrijev sulfat, bezvodni, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

Karakterizacija polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta:

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina diamonijeva sol), Merck (St. Louis, SAD)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; min 85 % CHN), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
- Etanol, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev peroksodisulfat, Fluka/Honeywell (Charlotte, SAD)
- Metanol, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni, GRAM-MOL d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Sigma Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

HPLC analiza:

- Acetonitril, HPLC čistoće, Carlo Erba (Val de Reuil, Francuska)
- Metanol, HPLC čistoće, Pancreac (Barcelona, Španjolska)
- Analitički standardi polifenolnih spojeva:
 - ❖ Kafeinska kiselina (HPLC standard), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Klorogenska kiselina (95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Kvercetin (>97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Rutin trihidrat (>97 %), Acros Organics/Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
 - ❖ Ružmarinska kiselina (97 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)
 - ❖ Sinapinska kiselina (>95 %), Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, SAD)

3.3. Uređaji i posuđe

Priprema ekstrakta i frakcija polifenolnih spojeva:

- Analitička vaga (New Classic ML204/01), Mettler Toledo (Zürich, Švicarska)
- Centrifuga (SL 8R) Thermo Scientific (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijski pribor: teflonski magneti, propipete, željezni stalak
- Laboratorijsko plastično posuđe: Falcon epruvete (50 mL), Eppendorf epruvete (2 mL), Pasteur pipete
- Laboratorijsko stakleno posuđe: odmjerne tikvice, reagens boce, menzure, laboratorijske čaše, tikvice s okruglim dnom (100 mL), pipete, štapići
- Magnetska mješalica (SMHS-6), Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, Njemačka)
- Rotacijski vakuum uparivač RV8, IKA (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (S60H) Elmasonic Elma (Singen, Njemačka)
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)

Karakterizacija polifenolnog sastava i antioksidacijskog kapaciteta:

- Laboratorijski pribor: propipete, kivete za spektrofotometar
- Laboratorijsko stakleno posuđe: laboratorijske čaše, odmjerne tikvice, reagens boce, staklene epruvete
- Mikropipete Gilson (Villiers-le-Bel, Francuska)
- Spektrofotometar (GenesysTM 10S UV-VIS), Thermo Fischer Scientific (Waltham, SAD)
- Vortex (MX-S), DLAB Scientific Co. (Beijing, Kina)

HPLC analiza:

- Laboratorijski pribor: plastične šprice (2 mL), mikrofilteri (regenerirana celuloza) veličine pora 0,45 μm , HPLC posude za uzorke (viale) s čepovima
- Tekućinski kromatograf Agilent Series 1200, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) koji se sastoji od degazera, kvarterne pumpe, automatskog injektora, termostata kolone i DAD (eng. *Diode-Array Detector*) detektora

3.4. Metode

3.4.1. Frakcioniranje i ekstrakcija polifenolnih spojeva

Ekstrakcija i frakcioniranje polifenolnih spojeva provedeni su prema radu Arruda i suradnika (2018) s određenim modifikacijama. Postupak frakcioniranja polifenolnih spojeva prikazan je na slikama 4. i 5. Od pripremljenog ekstrakta dobričice postupkom frakcioniranja dobivene su frakcije slobodnih topljivih i konjugiranih topljivih (glikolizirani i esterificirani polifenolnih spojevi) polifenolnih spojeva, a iz taloga preostalog nakon ekstrakcije, pripremljena je frakcija netopljivih-vezanih polifenolnih spojeva.

Određivanje ukupnih topljivih polifenolnih spojeva

Uzorak dobričice pomiješa se sa smjesom otapala voda:metanol:acetona (6:7:7, v/v/v) u omjeru 1:40 (w/v). Smjesa otapala i uzorka homogenizira se na vortex uređaju te potom slijedi ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji (15 min.) i ekstrakcija na magnetskoj miješalici (30 min.) pri sobnoj temperaturi. Nakon provedene ekstrakcije, slijedi centrifugiranje (9500 o/min., 15 min., 4 °C,) pri čemu se odvojeni supernatant sakuplja u tikvicu s okruglim dnom, a zaostali talog se ponovno ekstrahira smjesom otapala prema opisanom postupku još dva puta. Sakupljeni supernatanti upare se na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi od 40 °C do volumena od ~2,5 mL. Upareni ekstrakt kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Ekstrakcija se provodi u duplikatu.

Priprema frakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva

Alikvot od 1 mL uparenog ekstrakta, 2 mL 5 M NaCl, 250 μL 4 M HCl i 1,75 mL destilirane vode pomiješaju se u staklenoj epruveti s navojnim čepom (konačni volumen iznosi 5 mL) na vortex uređaju nakon čega se otpipetira jednak volumen organskog otapala etil-acetata (5 mL). Ekstrakcija tekuće-tekuće započinje intenzivnim miješanjem otapala i uzorka na vortex uređaju

u trajanju od 1 min u čvrsto zatvorenoj staklenoj epruveti. Potom se provodi kratko centrifugiranje (2000 o/min., 1 min., 4 °C) kako bi se pospješilo odvajanje faza. Gornja organska faza skuplja se u zasebnu epruvetu dok se vodena faza ponovno ekstrahira s organskim otapalom po opisanom postupku još dva puta. U epruvetu sa skupljenim organskim fazama dodaje se manja količina bezvodnog natrijevog sulfata kako bi se uklonila zaostala voda. Smjesa soli i organske faze promiješa se na vortex uređaju te kratko centrifugira (2000 o/min., 2 min., 4 °C). Organska faza prenese se u tikvicu s okruglim dnom i uparava se do suhoga na rotacijskom vakuum uparivaču pri 40 °C. Preostali suhi talog u tikvici otopi se u 1 mL 80%-tnog (v/v) metanola za upotrebu u daljnjim HPLC i spektrofotometrijskim analizama (poglavlje 3.4.2). Postupak ekstrakcije ukupnih topljivih polifenolnih spojeva provodi se u duplikatu.

Priprema frakcije konjugiranih topljivih polifenolnih spojeva

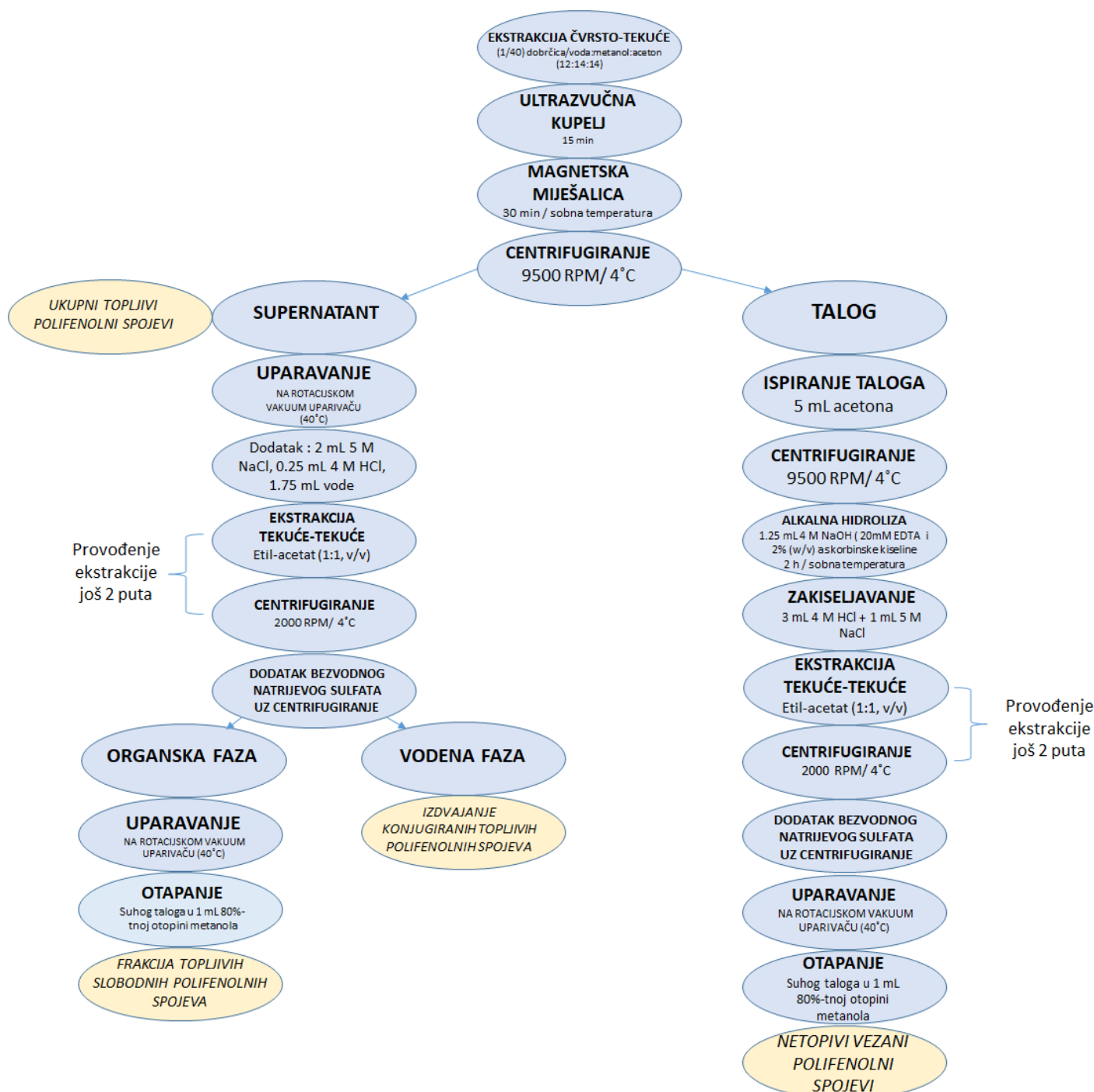
Nakon ekstrakcije tekuće–tekuće s etil-acetatom, preostala vodena faza podvrgava se alkalnoj hidrolizi. Alkalna hidroliza provodi se na način da se u staklenu epruvetu s navojnim čepom pomiješa 1 mL alikvota vodene faze zaostale nakon ekstrakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva s 1,25 mL 4 M otopine NaOH u kojoj su otopljeni etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA 20 mM) i askorbinska kiselina (2 %, w/v) te se otpipetira još 50 µL 4 M otopine NaOH i 200 µL destilirane vode. Potom se otopina promiješa na vortex uređaju te se ostavi 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon 2 h provodi se neutralizacija otopine uz blago zakiseljavanje dodatkom 1,5 mL otopine 4 M HCl uz hlađenje. HCl se dodaje u suvišku kako bi se postigao niži pH čija je uloga olakšavanje postupka ekstrakcije deesterificiranih spojeva u organsko otapalo. U zakiseljenu otopinu doda se 1 mL 4 M NaCl, a otopina se još jednom promiješa na vortex uređaju te se ekstrahira s jednakim volumenom etil-acetata po postupku opisanom u prethodnom poglavlju. Organska faza prenese se u tikvicu s okruglim dnom i uparava se do suhoga na rotacijskom vakuum uparivaču pri 40 °C. Preostali suhi talog u tikvici otopi se u 1 mL 80%-tnog (v/v) metanola za upotrebu u daljnjim HPLC i spektrofotometrijskim analizama (poglavlje 3.4.2).

Vodena faza preostala nakon postupka alkalne hidrolize podvrgava se kiselinskoj hidrolizi. Alikvot od 1 mL vodene faze i 1 mL 4 M HCl pomiješaju se u staklenu epruvetu s navojnim čepom. Zatim se otopina zagrijava na 80 °C u vodenoj kupelji tijekom 1 h. Nakon isteka vremena, otopina se hladi te se u istu otpipetira 2 mL 5 M NaCl i 1 mL destilirane vode. Organska faza prenese se u tikvicu s okruglim dnom i uparava se do suhoga na rotacijskom

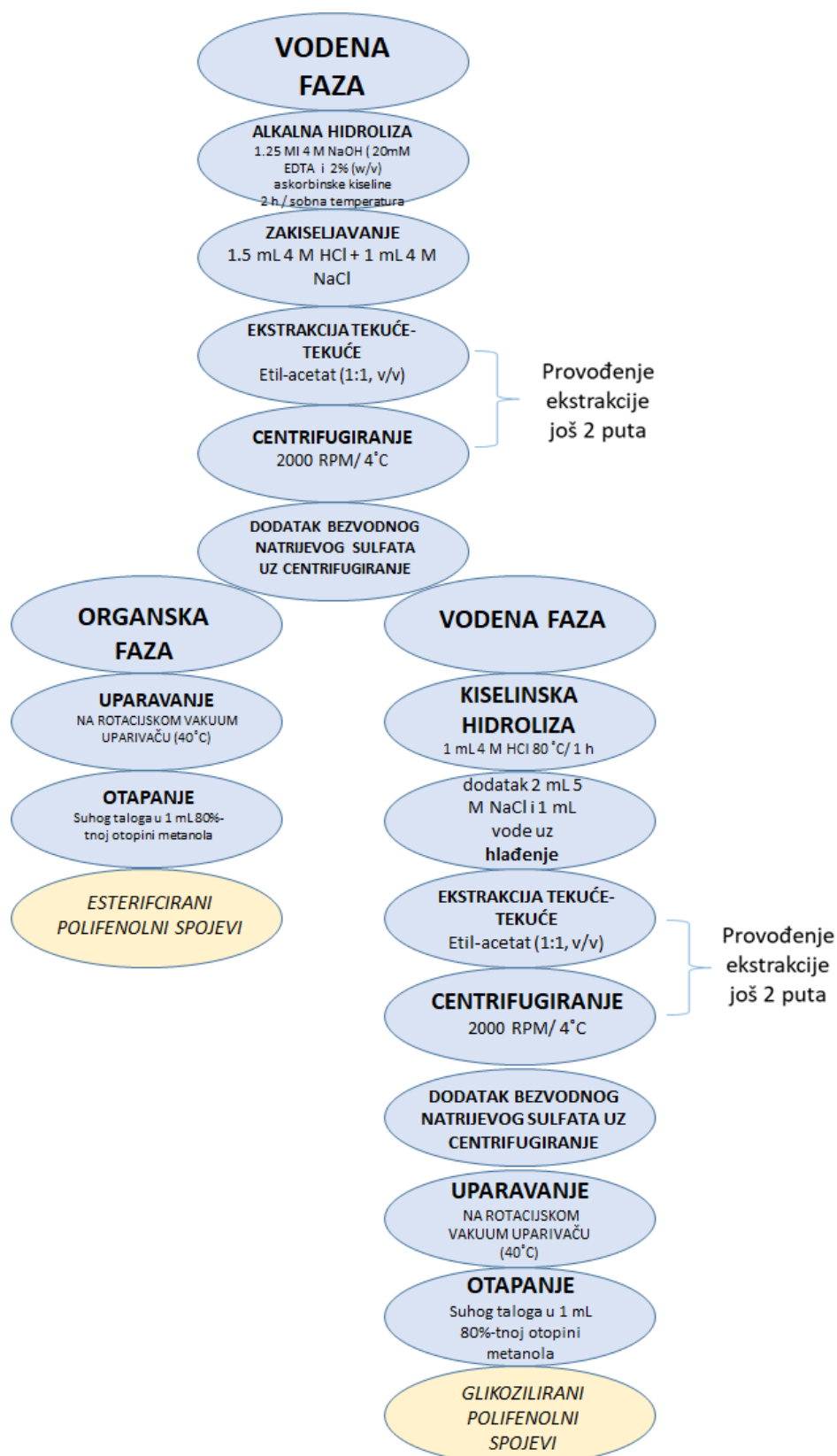
vakuum uparivaču pri 40 °C. Preostali suhi talog u tikvici otopi se u 1 mL 80%-tnog (v/v) metanola za upotrebu u daljnjim HPLC i spektrofotometrijskim analizama (poglavlje 3.4.2). Postupak ekstrakcije konjugiranih topljivih polifenolnih spojeva provodi se u duplikatu.

Priprema frakcije netopljivih-vezanih polifenolnih spojeva

Zaostali talog nakon ekstrakcije čvrsto-tekuće podvrgava se alkalnoj hidrolizi kako bi se odredili netopljivi-vezani polifenolni spojevi. Talog se ispiri dva puta s 5 mL acetona, zatim se dobro promiješa na vortex uređaju te se centrifugira (9500 o/min., 10 min., 4 °C) . U ispran i osušen talog otpipetira se 5 mL 2 M otopine NaOH u kojem su otopljeni EDTA (10 mM) i askorbinska kiselina (1 %, w/v). Alkalna hidroliza provodi se tijekom 2 h na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Nakon 2 h provodi se neutralizacija smjese uz blago zakiseljavanje dodatkom 3 mL 4 M otopine HCl. U zakiseljenu otopinu otpipetira se 2 mL 5 M otopine NaCl. Otopina se još jednom promiješa na vortex uređaju te se ekstrahira etil-acetatom po prethodno opisanom postupku. Suhi talog preostao nakon uparavanja organskog otapala otopi se u 1 mL 80%-tnog metanola. Tako priređen uzorak podvrgava se HPLC-u i spektrofotometrijskoj analizi. Postupak frakcioniranja netopljivih-vezanih polifenolnih spojeva provodi se u duplikatu.



Slika 4. Shematski prikaz frakcioniranja polifenolnih spojeva dobrčice_1.dio (prema Arruda i sur., 2018.)



Slika 5. Shematski prikaz frakcioniranja polifenolnih spojeva dobričice_2.dio (prema Arruda i sur., 2018.)

3.4.2. Karakterizacija polifenolnog sastava ekstrakta i frakcija

3.4.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda za određivanje udjela ukupnih polifenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s polifenolnim spojevima. Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koji reagira s fenoksidnim ionom iz uzorka pri čemu dolazi do redukcije reagensa (nastaju volframov i molibdenov oksid) i nastanka plavog obojenja (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Intenzitet obojenja je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Singleton i Rossi, 1965), a određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma od 765 nm (Ough i Amerine, 1988).

Postupak rada:

U staklene epruvete otpipetira se 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđen s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20%-tne (w/v) otopine natrijevog karbonata te se reakcijska smjesa u epruvetama dobro izmiješa. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 h na sobnoj temperaturi u mraku nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorci koji se ispituju, samo umjesto 100 μL uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbanacije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Izračun:

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbanacije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}), određuje se udio ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku prema formuli:

$$y = 0,0010x - 0,0001 \quad [1]$$

gdje su:

x – udio ukupnih polifenola (mg L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 765 nm

Određivanje udjela ukupnih polifenola provodi se u dvije paralele ($n=2$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mg ekvivalenata galne kiseline (EGK) po gramu suhe tvari uzorka (mg GAE g^{-1} s.tv.).

3.4.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Princip metode:

Metoda se temelji na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini. DPPH radikal zbog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorbanciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - antioksidansa koji gasi slobodne radikale, boja se mijenja iz ljubičaste u žutu. Kolorimetrijska reakcija praćena je mjerenjem smanjenja apsorbancije (Brand-Williams i sur., 1995).

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 M otopina DPPH u metanolu. Apsorbancija te otopine mora biti ~1 na 515 nm. U epruvetu se otpipetira 100 µL uzorka i 3,9 mL otopine DPPH te se nakon 30 min. po dodatku otopine DPPH mjeri apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 100 µL metanola te 3,9 mL otopine DPPH. Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepa probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se prema jednadžbi baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preraćunava u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Izračun:

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,603x - 0,006 \quad [2]$$

gdje su:

x – koncentracija standarda otopine Trolox-a (mmol L^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom provodi se u dvije paralelene probe ($n=2$), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka ($\text{mmol Trolox g}^{-1}$ s.tv.).

3.4.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog ABTS radikal-kationa koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se apsorbancija mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 734 nm (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka pripremi se otopina ABTS⁺ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 88 µL otopine kalijevog peroksodisulfata (persulfat) te nadopuniti sa otopinom ABTS reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5, neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi 96%-tnim etanolom do konačne koncentracije ABTS⁺ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi $0,70 \pm 0,02$ (1 mL otopine ABTS⁺ radikala se stavi u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 96%-tnim etanolom).

Volumen od 40 µL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine ABTS⁺ radikala u epruveti te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 min. Slijepe proba umjesto uzorka sadrži 40 µL etanola. Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA , koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Izračun:

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 0,303x + 0,0006 \quad [3]$$

gdje su:

x – antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox L⁻¹)

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}), određuje se antioksidacijski kapacitet u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom provodi se u dvije paralelene probe ($n = 2$), a rezultati se izražavaju kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u $\text{mmol Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka}$ ($\text{mmol Trolox g}^{-1} \text{ s.tv.}$).

3.4.2.4. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti – HPLC

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je na kromatografskom sustavu Agilent Series 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) uz kromatografsku kolonu Zorbax Extend C18 ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m i.d.}$) te detektora s nizom fotodioda (DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Uzorci su injektirani u sustav u volumenu od $5 \mu\text{L}$, protokom od 1 mL min^{-1} te temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Elucija je provedena s dvokomponentnom mobilnom fazom koja se sastojala od otapala A (1%-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u destiliranoj vodi) i otapala B (1%-tna (v/v) otopina mravlje kiseline u acetonitrilu) prema slijedećem postupku : 0 min. – 93 % A i 7 % B; 5 min. – 93 % A i 7 % B; 45 min. – 60 % A i 40 % B; 47 min. – 30 % A i 70 % B; 52 min. – 30 % A i 70 % B. Kromatogrami su snimani pri valnim duljinama od 320 nm, 350 nm i 370 nm što odgovara maksimumima apsorpcijskih spektara pojedinih polifenolnih spojeva. Identifikacija pikova na kromatogramima uzoraka određena je usporedbom retencijskog vremena pojedinačnih standarda i apsorpcijskih spektara snimljenih u valnom području od 190 nm do 400 nm. Kvantifikacija identificiranih pikova provedena je na temelju konstruiranih baždarnih pravaca za pojedini standard u koncentracijskom rasponu $20\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tablica 1.). Uzorci su neposredno prije analize filtrirani pomoću filtarskih injekcija načinjenih od regenerirane celuloze promjera pora $0,2 \text{ mm}$. Analiza je provedena u duplikatu.

Tablica 1. Jednadžbe baždarnih krivulja i valne duljine detekcije korištenih standarda

Polifenolni spoj	Maksimum apsorpcijskog spektra (nm)	Jednadžba baždarne krivulje	R²
Kafeinska kiselina	320 nm	$y = 28,688x + 8,3483$	0,99
Klorogenska kiselina	320 nm	$y = 14,274x + 2,6832$	0,99
Ružmarinska kiselina	320 nm	$y = 10,876x - 0,1215$	0,99
Sinapinska kiselina	320 nm	$y = 24,613x - 0,3774$	0,99
Rutin	350 nm	$y = 7,7097x + 3,035$	0,99

§ 4. RASPRAVA I REZULTATI

Zbog bogatog bioaktivnog sastava u kojem dominiraju polifenoli, dobričica ima brojne pozitivne zdravstvene učinke zbog kojih ima i dugu tradiciju primjene u narodnoj medicini. U dosadašnjim istraživanjima u dobričici je, uz polifenole, identificirano nekoliko skupina bioaktivnih spojeva od kojih su najznačajniji još alkaloidi, saponini i terpenoidi (Kumarasamy i sur., 2002).

Među polifenolnim spojevima, u dobričici se ističu fenolne kiseline i flavonoidi. Kafeinska, ružmarinska i klorogenska kiselina posjeduju izražena antioksidacijska svojstva, dok su za flavonoide karakteristična antiradijacijska i antioksidacijska svojstva (Shan i sur., 2013). Od alkaloida u dobričici su značajni hederacin A i B, kojeg su Sarker i suradnici (2003) identificirali iz nadzemnog dijela biljke. Otkriveno je da navedeni alkaloidi djeluju citotoksično na stanične linije raka crijeva (Yamashita, 2011). Također, Kim i suradnici (2011) izolirali su tri nova seskviterpenska laktona, kojima je dokazano citotoksično djelovanje na ljudske stanične linije raka crijeva, dojke i prostate. Optimiranjem svojstava tla i klime može se postići veća koncentracija vrijednih polifenolnih spojeva u dobričici. Ključni čimbenici su optimalna temperatura, vlaga tla, koncentracija iona željeza i fosfora (Jin i sur., 2019). Varga i suradnici (2016) dokazali su da koncentracija fenolnih kiselina i antioksidacijski kapacitet dobričice ovise o vremenu žetve pa je tako dobričica ubrana u srpnju imala najveću koncentraciju fenolnih kiselina, kao i najveći antioksidacijski kapacitet.

4.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva izdvojenih iz dobričice primjenom postupka frakcioniranja

Dostupni literaturni podaci vezani uz polifenolni sastav dobričice su limitirani. Stoga je primijenjeni postupak frakcijske ekstrakcije definiran s ciljem detaljnije karakterizacije i kvantifikacije polifenolnih spojeva prisutnih u dobričici. Postupkom frakcijske ekstrakcije izdvojene su ukupno 4 polifenolne frakcije: i) slobodni topljivi polifenolni spojevi (ST_P), ii) esterificirani polifenolni spojevi (ES_P), iii) glikozilirani polifenolni spojevi (GL_P) i (iv) netopljivi vezani polifenolni spojevi (NV_P). Primjenom HPLC-DAD metodologije identificirano je šest polifenolnih spojeva u navedenim frakcijama. Identificirane su četiri fenolne kiseline: ružmarinska, klorogenska, kafeinska i sinapinska te dva flavonola: rutin i kvercetin. Udjeli navedenih spojeva, izraženi kao masa identificiranog spoja (mg) po masi suhe tvari dobričice (g s.tv.), prikazani su u tablici 2. Sve HPLC-DAD analize provedene su na valnoj duljini od 320

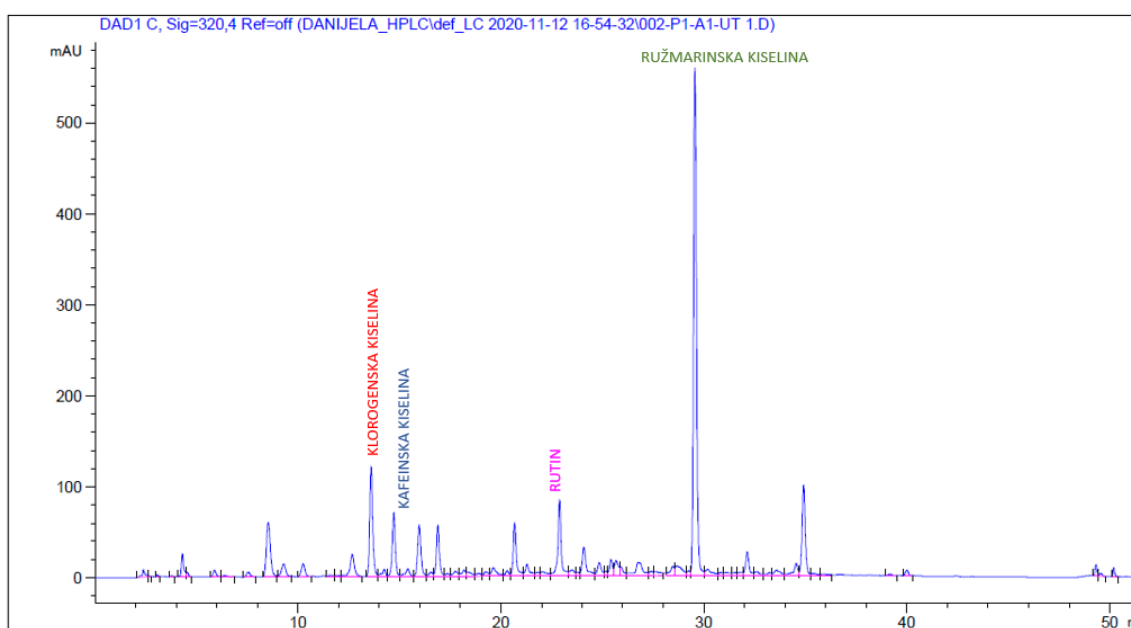
nm ili 350 nm jer pri tim valnim duljinama je maksimalna apsorpcija fenolnih kiselina i flavonoida pa je osigurana najveća osjetljivost postupka.

Tablica 2. Udjeli (mg g^{-1} s.tv.*) polifenolnih spojeva u frakcijama dobričice pripremljenima iz izvornog ekstrakta dobričice te nakon ostatka ekstrakcije.

Fenolni spoj		Ukupni topljivi polifenoli u ekstraktu (UT)	Frakcija slobodnih topljivih polifenola (ST_P)	Frakcija esterificiranih polifenola (ES_P)	Frakcija glikoziliranih polifenola (GS_P)	Frakcija netopljivih vezanih polifenola (NV_P)
Fenolne kiseline	Ružmarinska kiselina	6,64±1,19	5,39±1,31	-	-	-
	Klorogenska kiselina	1,11±0,21	0,90±0,13	-	-	-
	Kafeinska kiselina	0,25±0,05	0,21±0,04	0,09±0,01	-	0,16±0,00
	Sinapinska kiselina	-	-	0,03±0,00	-	-
Flavonoidi	Rutin	1,87±0,35	0,52±0,07	-	-	0,06±0,01
	Kvercetin	-	-	-	0,02±0,00	-

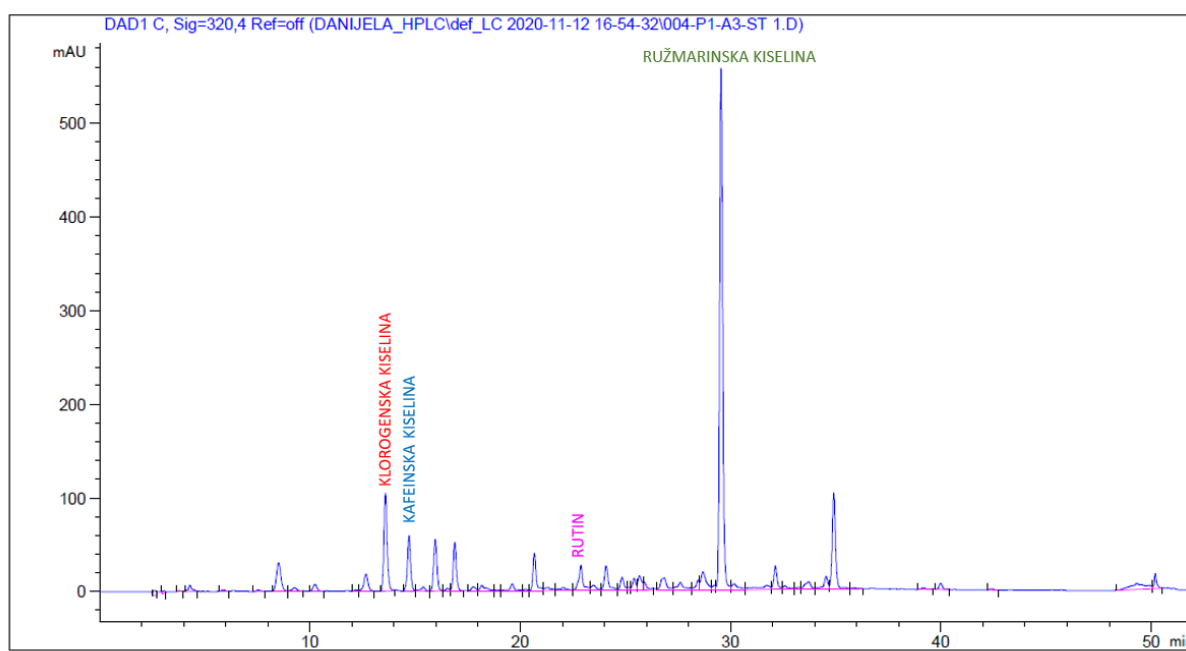
* s.tv. – suha tvar uzorka

HPLC-DAD analizom izvornog ekstrakta te usporedbom s retencijskim vremenom i dostupnim standardima detektirane su fenolne kiseline: ružmarinska kiselina ($6,64 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.), kafeinska kiselina ($0,25 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) i klorogenska kiselina ($1,11 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) te flavonoid rutin ($1,87 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) (Slika 6.). Ružmarinska kiselina karakterističan je polifenolni spoj za porodicu *Laminaceae*. Belščak-Cvitanović i suradnici (2011) također su odredili visok udio ružmarinske kiseline ($3,24 \text{ mg g}^{-1}$ s.tv.) u dobričici. Uz ružmarinsku kiselinu, najčešći polifenolni spoj dominantan u porodici *Laminaceae* je klorogenska kiselina. Udio fenolnih kiselina varira u ovisnosti o dijelovima biljke. Döring i Peterson (2014) otkrili su da je udio ružmarinske kiseline najveći u cvijetu dobričice (12,53%) i korijenu (1,31%), dok su u stabljici (0,64%) i listovima (0,88%) značajno niži udjeli. Značajan udio klorogenske i kafeinske kiseline, uz ružmarinsku kiselinu kao dominantnu ($13,98 \text{ mg g}^{-1}$), u vrućem vodenom ekstraktu identificirali su i Chou i suradnici (2019).



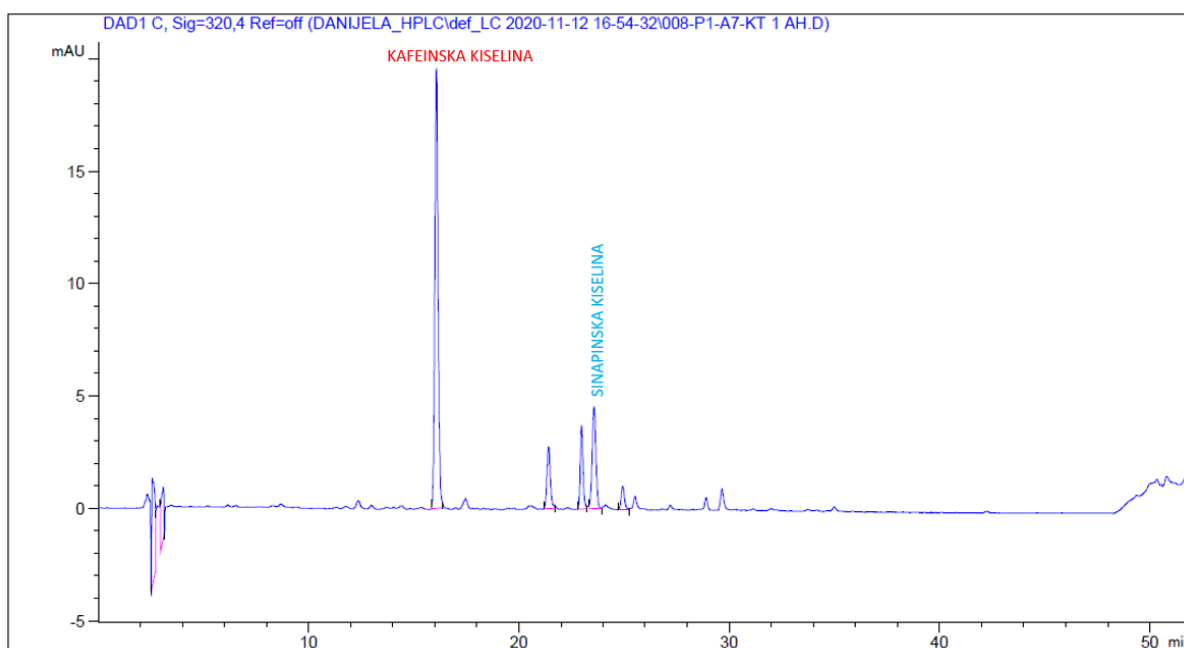
Slika 6. Kromatogram izvornog ekstrakta (UT)

Promatrajući frakciju slobodnih topljivih polifenolnih spojeva (Slika 7.) uočava se da su se esteri kafeinske, ružmarinske i klorogenske kiseline dobro ekstrahirali uz visoku učinkovitost – 81 %, za razliku od rutina čija je učinkovitost ekstrakcije 28 %. Znatno lošija ekstrakcija rutina u frakciji slobodnih topljivih polifenolnih spojeva ukazuje da su složeni glikozidi sadržani u vodenoj fazi tijekom frakcioniranja.



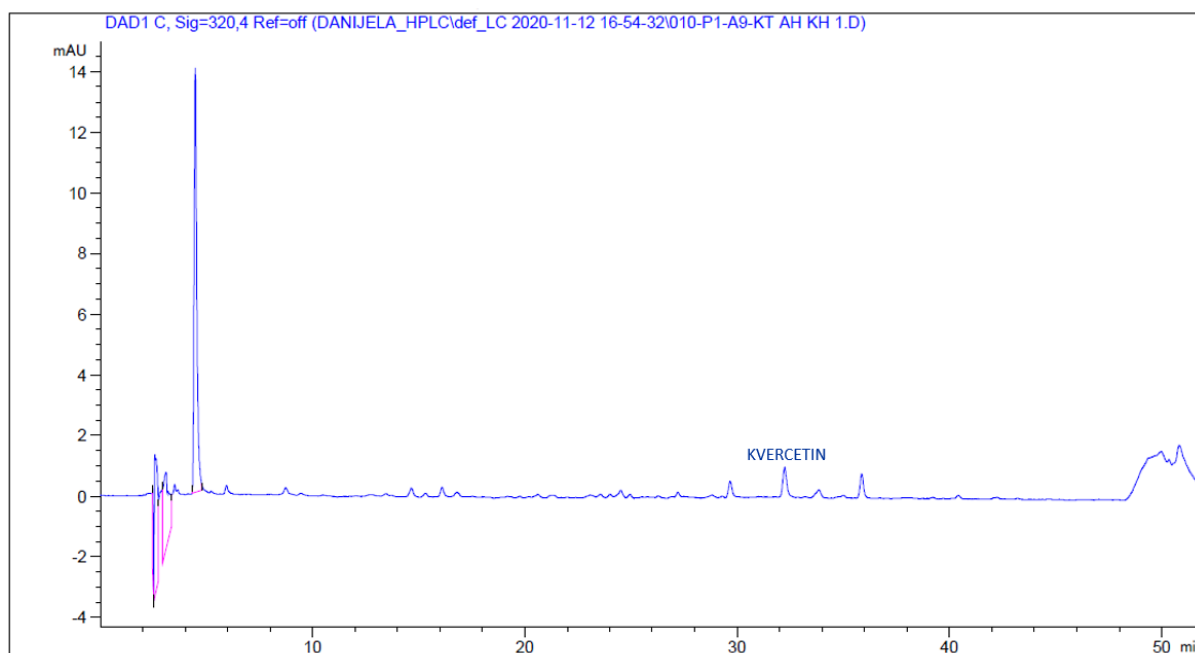
Slika 7. Kromatogram frakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva (ST_P)

U frakciji esterificiranih polifenolnih spojeva (Slika 8.) detektirane su kafeinska kiselina ($0,09 \text{ mg g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$) i sinapinska kiselina ($0,03 \text{ mg g}^{-1}_{\text{s.tv.}}$). Prisutnost kafeinske kiseline uvjetovana je hidrolizom zaostale ružmarinske i klorogenske kiseline u vodenoj fazi nakon ekstrakcije slobodnih topljivih polifenolnih spojeva. Sinapinska kiselina, iako određena u malom udjelu, implicira na moguću prisutnost složenijih esterificiranih konjugata. Međutim, takve spojeve nije bilo moguće identificirati u izvornom ekstraktu obzirom na dostupne standarde.



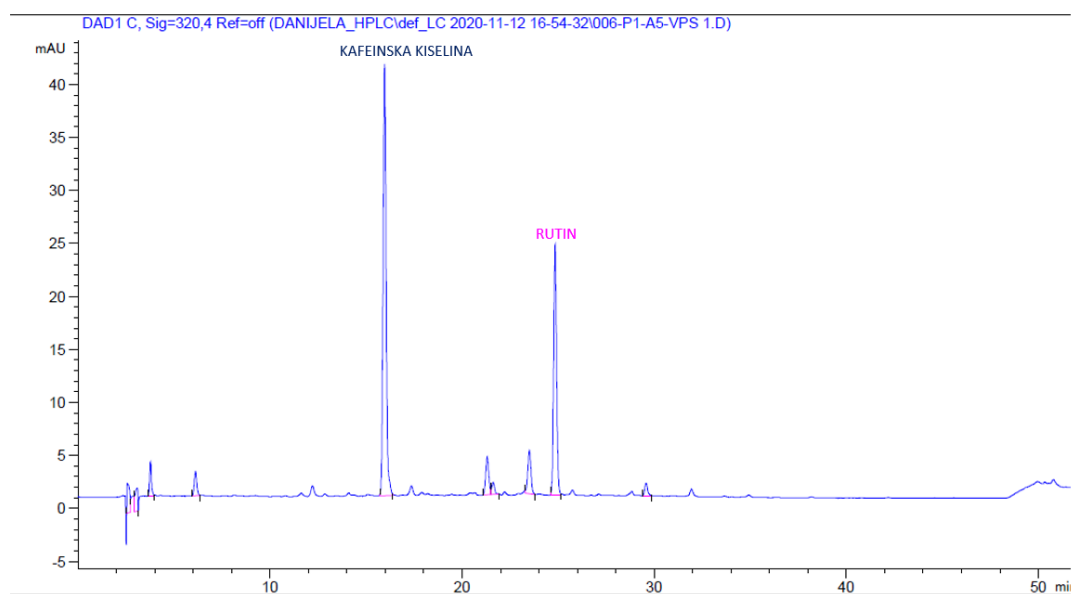
Slika 8. Kromatogram frakcije esterificiranih polifenolnih spojeva (ES_P)

Kod frakcije glikoziliranih polifenolnih spojeva jedini identificirani spoj je kvercetin – glikozid rutina. Kvercetin se oslobodio kiselinskom hidrolizom rutina što ukazuje da je rutin dominantan, a možda čak i jedini polifenolni glikozid određen u izvornom ekstraktu. Kromatogram glikoziliranih konjugata prikazan je na slici 9.



Slika 9. Kromatogram frakcije glikoziliranih polifenolnih spojeva (GS_P)

U frakciji netopljivih vezanih polifenolnih spojeva (Slika 10.) identificirana su dva pika s obzirom na dostupne standarde – kafeinska kiselina ($0,16 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.v.}$) i rutin ($0,06 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.v.}$). Obzirom na identificirane pikove ne može se potpuno razjasniti jesu li polifenolni spojevi u frakciji vezanih polifenola zaista vezani spojevi ili potiču iz neekstrahiranih polifenolnih spojeva zaostalih nakon pripreme izvornog ekstrakta.



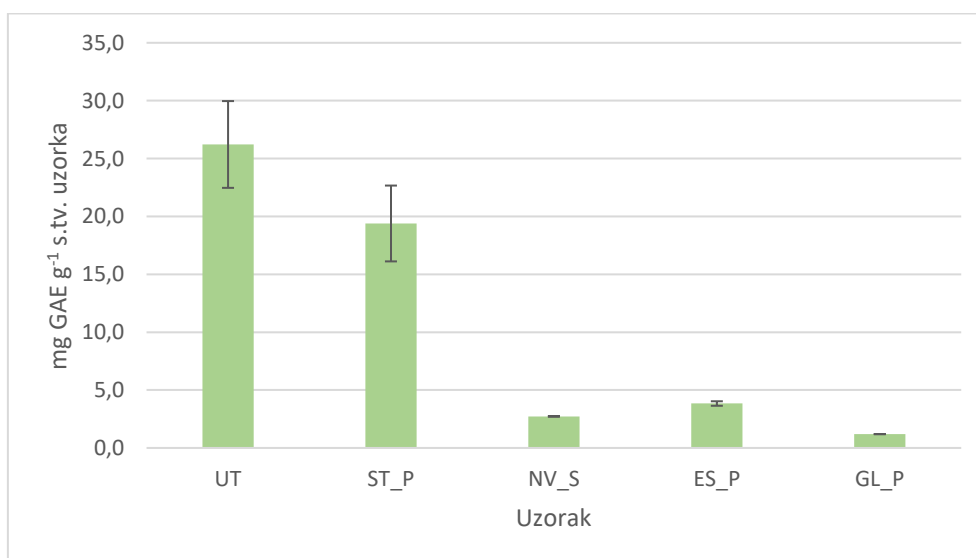
Slika 10. Kromatogram frakcije netopljivih vezanih polifenolnih spojeva (NV_P)

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da su dominantni polifenolni spojevi u dobričici fenolne kiseline (ružmarinska kiselina) i flavonoidi prisutni u obliku topljivih polifenolnih spojeva. Vezani polifenolni spojevi nemaju izražen doprinos polifenolnom sastavu dobričice. S obzirom na nedostupnost čistih standarda, HPLC-DAD analiza izrazito je otežana prilikom karakterizacije polifenolnog sastava nedovoljno istraženih biljnih materijala, posebice ako se radi o konjugiranim spojevima ili derivatima polifenola. Primjenom postupka frakcijske ekstrakcije uz kiselinsku i alkalnu hidrolizu omogućena je identifikacija složenijih polifenolnih spojeva – konjugata, s obzirom da se takvi spojevi određuju neposredno iz slobodnih topljivih polifenolnih spojeva. U nedostatku preciznijih instrumenata poput masenog spektrometra, ovakva analiza sužava izbor neidentificiranih pikova na kromatogramima.

4.2. Udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet polifenolnih frakcija dobričice

Izvornom ekstraktu dobričice i pripremljenim frakcijama slobodnih, glikoliziranih, esterificiranih i netopljivih vezanih polifenolnih spojeva određen je udio ukupnih polifenola te antioksidacijski kapacitet koristeći DPPH i ABTS metode.

Na slici 11. prikazan je udjel ukupnih polifenola u polifenolnim frakcijama izdvojenima iz dobričice.

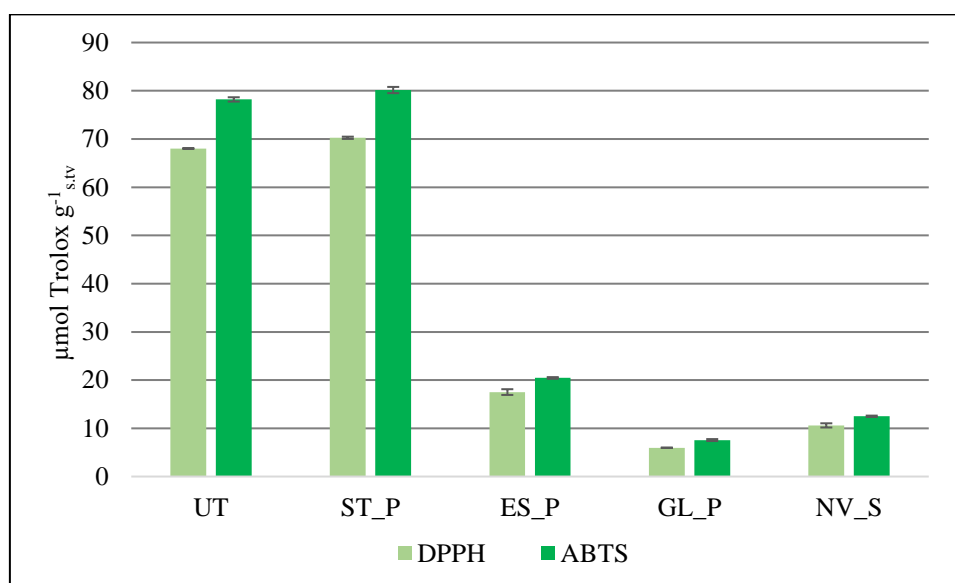


Slika 11. Udjel ukupnih polifenola u polifenolnim frakcijama dobričice

Najveći udio ukupnih polifenola sadržan je u izvornom ekstraktu (26,22 mg GAE g⁻¹_{s.tv.}) i predstavlja ukupne topljive polifenolne spojeve. Frakcija slobodnih topljivih polifenolnih spojeva druga je po udjelu ukupnih polifenola (19,39 mg GAE g⁻¹_{s.tv.}), dok je najmanji udio ukupnih polifenola određen u frakciji netopljivih vezanih polifenolnih spojeva (2,73 mg GAE g⁻¹_{s.tv.}).

U frakciji esterificiranih polifenolnih spojeva (3,84 mg GAE g⁻¹_{s.tv.}) određeno je tri puta više ukupnih polifenola u odnosu na frakciju glikoziliranih polifenolnih spojeva (1,20 mg GAE g⁻¹_{s.tv.}). Ovakvi rezultati u skladu su s HPLC-DAD analizom u kojoj je dokazano da se većina polifenolnih spojeva u dobričici nalazi u slobodnom topljivom obliku, ali i da rezultati udjela ukupnih polifenola u frakciji esterificiranih polifenolnih spojeva ukazuju na moguću prisutnost složenijih estera koji uslijed nedostatka standarda nisu mogli biti identificirani.

Izvornom ekstraktu i polifenolnim frakcijama izdvojenima iz dobričice određen je i antioksidacijski kapacitet primjenom metoda gašenja slobodnih radikala (DPPH i ABTS) (Slika 12.)



Slika 12. Antioksidacijski kapacitet polifenolnih frakcija dobričice određeni DPPH i ABTS metodama

Najveći antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH metode određen je u frakciji slobodnih topljivih polifenolnih spojeva (ST_P) (70,25 μmol Trolox-a g⁻¹_{s.tv.}), koju slijedi izvorni ekstrakt (UT) (68,02 μmol Trolox-a g⁻¹_{s.tv.}). Frakcija esterificiranih polifenolnih (ES_P) spojeva također ima izražen antioksidacijski kapacitet (17,52 μmol Trolox-a g⁻¹_{s.tv.}), dok je najmanji

antioksidacijski kapacitet, prema DPPH metodi, detektiran u frakciji glikoziliranih polifenolnih spojeva (GL_P) (5,97 $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$). Prema ABTS metodi najveći antioksidacijski kapacitet detektiran je u frakciji slobodnih topljivih polifenolnih spojeva (80,15 $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$), kojeg slijedi izvorni ekstrakt (78,21 $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$). Kao i kod DPPH metode, visok antioksidacijski kapacitet pokazala je i frakcija esterificiranih spojeva (20,44 $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$), nešto niži antioksidacijski kapacitet određen je u frakciji vezanih polifenolnih spojeva (12,49 $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$), dok je najniži antioksidacijski kapacitet, određen istom metodom, pripao frakciji glikoziliranih spojeva (7,56 $\mu\text{mol Trolox-a g}^{-1}_{\text{s.t.v.}}$), isto kao i kod DPPH metode. S obzirom na navedene rezultate, može se zaključiti da antioksidacijski kapacitet prati ukupan udio polifenola u ekstraktu i polifenolnim frakcijama, uz iznimku da je najveći antioksidacijski kapacitet zabilježen u frakciji slobodnih topljivih polifenolnih spojeva, primjenom obje metode, iako je ukupan udio polifenolnih spojeva nešto niži nego u izvornom ekstraktu.

Između rezultata izvornog ekstrakta i polifenolnih frakcija zabilježena je visoka korelacija, posebice između rezultata DPPH metode i udjela ukupnih polifenolnih spojeva ($R^2 = 0,94$), kao i rezultata ABTS metode i udjela ukupnih polifenolnih spojeva ($R^2 = 0,94$). Promatrajući rezultate HPLC-DAD analize, uz visoke vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih polifenolnih spojeva, dobričica se može smatrati odličnim izvorom slobodnih topljivih polifenolnih spojeva. Uz dodatna istraživanja i daljnju karakterizaciju polifenolnog sastava dobričice (osobito frakcije esterificiranih polifenolnih spojeva), ova ljekovita biljka predstavlja odličnu podlogu za izdvajanje biološki vrijednih sastojaka u svrhu razvoja inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

§ 5. ZAKLJUČCI

1. Većina polifenolnih spojeva u dobričici prisutna je u slobodnom topljivom obliku
2. Dominantni polifenolni spojevi su esteri kafeinske kiseline – ružmarinska i klorogenska kiselina
3. Jedini identificirani flavonoid je flavonol rutin koji je u frakciji glikoziliranih spojeva potvrđen kao glikozid kvercetina
4. Prisutnost sinapinske kiseline u frakciji esterificiranih polifenola ukazuje na prisutnost složenijih estera koji bi trebali biti identificirani daljnjim istraživanjima
5. Polifenolne frakcije dobričice posjeduju izražena antioksidacijska svojstva, naročito frakcija slobodnih topljivih polifenolnih spojeva
6. Dobričica se može smatrati visokovrijednim izvorom biološki aktivnih sastojaka izraženih antioksidacijskih svojstava što joj omogućava širu primjenu razvoju inovativnih funkcionalnih prehrambenih proizvoda

§ 6. LITERATURNI IZVORI

- Anonymus 1, <<https://hort.extension.wisc.edu/articles/creeping-charlie/>> Pristupljeno 13.svibanj.
- Anonymus 2, <<https://www.krenizdravo.hr/zdravlje/alternativna-medicina/biljna-ljekarna/dobricica-ljekovitost-uporaba-i-mjere-opreza>> , Pristupljeno 13.svibanj
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014) Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* **152**: 46–55.
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., de Moraes, D. R., Eberlin, M. N., Pastore, G. M. (2018) Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC- ESI-MS/MS. *Food Chemistry* **245**: 738–749.
- Azimova, S. S., Glushenkova, A. I., Vinogradova, V.I. (2012) 'Glechoma hederacea L.', Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources. *Journal of Ecology*. **87**: 347-364.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. U: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 1.izd. (Galanakis, C., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 3–44.
- Belščak-Cvitanović, A., Stanojević, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International* **44**: 1094-1101
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* **28**: 25-30
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317–333.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. (2016)

Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* **21**(7): 901

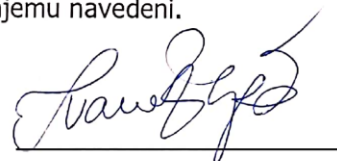
- Chou S.T., Lai C.C., Lai C.P., Chao W.W. (2018) Chemical Composition, antioxidant, anti-melanogenic and anti-inflammatory activities of *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* **122**: 675–85.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovanni, C., Masella, R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita* **43**: 348–361.
- Döring, A. S. i Petersen, M. (2014) Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochemistry Letters*, **10**: 1-7.
- Dzah C.S., Duan Y., Zhang H., Boateng N.A.S., Ma H. (2020) Latest developments in polyphenol recovery and purification from plant by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology* **99**: 375-388.
- Mitich, L. W. (1994) Ground ivy. *Weed technology* **8**: 413–415.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z. i Amini-Khoei, H. (2018) Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of HerbMed Pharmacology* **7**(1): 1–7.
- Jin, L., Liu L., Guo Q., Li W., Jun Z. (2019) Scientia horticulturae variation in bioactive compounds of *Glechoma longituba* and its in fl uential factors : Implication for advanced cultivation strategies. *Scientia Horticulturae* **244**(7): 182–192.
- Kim J.P., Song S.B., Lee I.S., Kim Y.H., Yoo I.D., Ryoo I.J., Bae K.H. (2011) Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**: 3483-3487.
- Kim, J. P., Lee I.S., Ha D.T., Seo J.J., Min B.S., Yoo I.D., Bae K.H. (2011) New sesquiterpene lactones from *Glechoma hederacea* L. and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Planta Medica*, **77**(9): 955-957.
- Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D. (2002) Biological activity of *Glechoma hederacea*. *Fitoterapia* **73**: 721-723.
- Lafay, S. i Gil-Izquierdo, A. (2008) 'Bioavailability of phenolic acids', *Phytochemistry Reviews*, **7**(2): 301–311.

-
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727–747.
 - Mosihuzzaman, M. (2012) 'Herbal medicine in healthcare-an overview', *Natural Product Communications*, **7**(6): 807–812.
 - Mourtzinou, I., Goula, A. (2019) Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste. U: *Polyphenols in Plants*, 2.izd. [online] (Watson, R. R., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 23–44.
 - Nikolić, T. i Resetnik, I. (2007) 'Plant uses in Croatia', *Phytologia Balanica*, **13**(2): 229–238.
 - Nikolić, T. (2001) 'The diversity of Croatian vascular flora based on the checklist and CROFlora database', *Acta Botanica Croatica*, **60**(1): 49–67.
 - Ough C.S., Amerine M.A. (1988) *Methods for analysis of musts and wine*, John Wiley & Sons. Inc., 196-221.
 - Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130**: 2073–2085.
 - Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144–158.
 - Qiao, Z., Koizumi Y., Zhang M., Natsui M., Flores M.J., Gao L., Yusa K., Sugiyama T. Koyota S. . (2012) 'Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **76**(10): 1877–1883.
 - Shahidi, F. i Yeo, J. D. (2016) 'Insoluble-bound phenolics in food', *Molecules*, **21**(9): 2-22.
 - Shan Q., Cao G., Cai H., Cai B. (2013) Simultaneous determination of four bioactive compounds in *Glechoma longituba* extracts by high performance liquid chromatography. *Pharmacognosy Magazine*, **9**: 216-219.
 - Singh, R. i Geetanjali (2018) *Chemotaxonomy of Medicinal Plants: Possibilities and Limitations, Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach*. Elsevier, str. 119-136.

-
- Tlili, N. i Sarikurkcu, C. (2020) 'Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants', *Industrial Crops and Products*, **151**(12): 112448.
 - Wang, B., Huang, Q., Venkitasamy, C., Chai, H., Gao, H., Cheng, N., Pan, Z. (2016) Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) during three edible maturity stages. *LWT-Food Sci. and Technol.* **66**: 56–62.
 - Yamashita, M., Yamashita, T. i Aoyagi, S. (2011) 'Toward the racemic total synthesis of hederacines A and B: Construction of an advanced tricyclic intermediate', *Organic Letters*, **13**(9): 2204–2207.
 - Yi, W., Fischer J., Krewer G., Akoh C.C. (2005) 'Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(18): 7320–7329.
 - Zhang B., Zhang Y., Li H., Deng Z., Tsao R. (2010) A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, **105**: 347-362.

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.



ime i prezime studenta