

# Usporedba sastava fitosterola iz korijena koprive, vrbovice i sabal palme

---

Ritoša, Ema

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:832309>

*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**

**Prediplomski studij Prehrambena tehnologija**

EMA RITOŠA

7356/PT

**USPOREDBA SASTAVA FITOSTEROLA IZ  
KORIJENA KOPRIVE, VRBOVICE I SABAL  
PALME**

**ZAVRŠNI RAD**

ZAGREB, 2020.

Predmet: Kemija i tehnologija ulja i masti

Mentor: doc.dr.sc. Marko Obranović



**Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost – HRZZ (2018.-2022.), „ Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma“ (HRZZ PlantBioPower, IP-01-2018).**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju ulja i masti**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### USPOREDBA SASTAVA FITOSTEROLA IZ KORIJENA KOPRIVE, VRBOVICE I SABAL PALME

**Ema Ritoša 7356/PT**

**Sažetak:** Svrha ovog rada bila je istražiti sastav i udjeli pojedinačnih i ukupnih fitosterola iz uzoraka korijena samonikle koprive, ubrane na više lokacija na području Republike Hrvatske (Istra), te ga usporediti sa sastavom fitosterola iz vrbovice i sabal palme. Za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima lipidnog ekstrakta korijena koprive, vrbovice i sabal palme korištena je plinska kromatografija. Najzastupljeniji fitosterol u obrađenim uzorcima je  $\beta$ -sitosterol čiji udio u koprivi iznosi  $69,64 \pm 0,22$  do  $81,10 \pm 0,01\%$ , u vrbovici  $68,28 \pm 0,86\%$  te u ekstraktu sabal palme  $54,05 \pm 0,09\%$ . Sastav fitosterola korijena koprive značajno varira ovisno o lokaciji sakupljanja uzoraka ( $p \leq 0,05$ ). Najveći udio ukupnih sterola zabilježen je kod ekstrakta sabal palme ( $4,84 \pm 0,01$  g/kg).

**Ključne riječi:** fitosteroli, korijen koprive, sabal palma, vrbovica

**Rad sadrži:** 30 stranica, 7 slika, 2 tablice, 41 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. Marko Obranović

**Pomoć pri izradi:** izv.prof.dr.sc. Sandra Balbino

**Datum predaje rada:** 1.9.2020.

## **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 Oil and Fat Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

### **COMPARISON OF THE PHYTOSTEROL COMPOSITION OF NETTLE ROOT, WILLOWHERB AND SABAL PALM**

**Ema Ritoša 7356/PT**

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the composition and percentage of individual and total phytosterols in wild nettle rhizomes, harvested at several locations in the Republic of Croatia (Istria) and to compare it with the composition of phytosterols from willowherb and sabal palm. The gas chromatography was used to determine the content and composition of sterols in the samples of lipid extract of nettle, willowherb and sabal palm. The most common phytosterol founded in the extracted samples was  $\beta$ -sitosterol with percentage of  $69.64 \pm 0.22$ - $81.10 \pm 0.01\%$  in nettle extract,  $68.28 \pm 0.86\%$  in willowherb extract and ( $54.05 \pm 0.09\%$ ) in sabal palm extract. The composition of nettle rhizome phytosterols significantly varies depending on the sampling locations ( $p \leq 0,05$ ). The highest content of the total sterols was determined in sabal palm extract ( $4.84 \pm 0.01$  g/kg).

**Keywords:** nettle root, phytosterols, sabal palm, willowherb

**Thesis contains:** 30 pages, 7 figures, 2 tables, 41 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:** Marko Obranović, PhD, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Sandra Balbino, PhD, Associate Professor

**Thesis delivered:** 1.9.2020.

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Kopriva .....	2
2.1.1. Kemijski sastav .....	3
2.2. Sabal palma.....	3
2.2.1 Kemijski sastav .....	4
2.3. Vrbovica.....	4
2.3.1. Kemijski sastav .....	5
2.4. Biljni steroli.....	6
2.4.1 Utjecaj biljnih sterola na smanjenje kolesterola u krvi.....	7
2.4.2 Antikacerogena svojstva fitosterola.....	8
2.5 Fitoterapija benigne hiperplazije prostate .....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1 MATERIJALI.....	12
3.2. METODE.....	15
3.2.1 Ekstrakcija lipida .....	15
3.2.2. Određivanje udjela i sastava sterola.....	15
3.2.2.1 Priprema neosapunjive frakcije.....	16
3.2.2.2. Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom u stupcu.....	16
3.2.2.3 Izdvajanje sterola iz neosapunjive frakcije tankoslojnom kromatografijom .....	17
3.2.2.4. Priprema trimetilsililetera .....	18
3.2.2.5. Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Rezultati statističke analize.....	21
4.2. RASPRAVA.....	23
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. LITERATURA.....	27

## 1.UVOD

Benigna hiperplazija prostate (BHP) jedna je od najčešćih uroloških bolesti kod muškaraca starije životne dobi. Ovisno o stadiju bolesti, liječenje benigne hiperplazije prostate moguće je terapijom lijekovima (alfa-blokatori, inhibitori-5-alfa-reduktaze), operativnim zahvatima (prostataktomija, transuretralna resekcija) te fitoterapijom koja je sve popularnija. Biljni lijekovi pokazali su se najučinkovitijim kod bolesnika s umjereno teškom oblikom BHP-a, a također se često primjenjuju kod bolesnika s blagim i umjerenim simptomima. Biljni lijekovi se komercijaliziraju kao ekstrakti koji se dobivaju iz lista, ploda ili korijena biljaka te sadrže široki spektar kemijskih spojeva među kojima prevladavaju fitosteroli, masne kiseline te flavonoidi. Ekstrakti Sabal palme (*Serenoa repens*), afričke šljivke (*Pygeum africanum*) i koprive (*Urtica dioica*) su najčešće korišteni fitoterapijski lijekovi korišteni u tretiranju BHP. Biljke iz roda *Epilobium* (npr. vrbovica), usjevna raž (*Secale cereale*) te kraljevska palma (*Roystonea regia*) također se koriste kao fitoterapijski lijekovi no u manjem udjelu (Allkanjari i Vitalone, 2015). Cilj ovog istraživanja bio je istražiti sastav fitosterola iz uzoraka rizoma samonikle koprive, ubrane na više lokacija na području Republike Hrvatske, te im usporediti sastav s fitosterolima iz vrbovice i sabal palme.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOPRIVA

Kopriva (*Urtica dioica L.*) (slika 1.) je trajna zeljasta biljka, rasprostranjena u umjerenom klimatskom pojasu. Pripada porodici usnača (*Lamiaceae*). Ima četverbridnu, uspravnu stabljiku koja može narasti do 1-2 m u visinu. Listovi su smješteni jedan nasuprot drugomu, duguljastog su oblika i blago nazubljeni na rubovima. Rizom je žućkaste boje. Dvodomna je biljka, pa stoga muški i ženski cvjetovi rastu na odvojenim stabljikama, a cvatu od srpnja do rujna. Na površini listova i stabljike nalaze se dlačice koji sadrže acetilkolin, histamin, serotonin, moroidin i mravlju kiselinu (Asgarpanah i Mohajerani, 2012). Fizički kontakt s brojnim sićušnim dlačicama na lišću i stabljici mogu rezultirati kontaktnim urtikarijalnim dermatitisom zbog kemijskih i mehaničkih iritacija potaknutih prodorom dlačica u kožu. Ljekoviti ekstrakti ne uzrokuju ovu reakciju jer se dlačice prilikom obrade degradiraju. Pripravci koprivinog lista koriste se u liječenju upalnih i drugi poremećaja, uključujući osteoartritis, alergijski rinitis, astmu, probleme s krvarenjem te dijabetes (Baumgardner, 2016). Međutim, najpoznatija zdravstvena korist koprive je u liječenju benigne hiperplazije prostate (BHP), poznate i kao povećana prostata. U tu svrhu koriste se ekstrakti korijena koprive. Klinička ispitivanja sugeriraju da vrste *Urtica* sadrže spojeve koji utječu na hormone odgovorne za razvitak BHP. Uz to, ekstrakt korijena koprive pokazuje antikancerogenu aktivnost u tretiranju raka prostate. U terapiji se kopriva obično koristi u kombinaciji s sabal palmom (*Serenoa repens*) (Kregiel i sur., 2018).



Slika 1. Kopriva (Anonymus 1)



### 2.1.1. Kemijski sastav

Listovi koprive bogati su flavonoidima, kao i fenolnim spojevima, organskim kiselinama, vitaminima i mineralima. Korijen sadrži lektine, polisaharide, sterole, lignane i kumarine (skopoletin). Skopoletin se sintetizira prilikom izloženosti biljke raznim stresorima (patogeni mikroorganizmi, dehidracija, mehanička oštećenja). Ima antibakterijsko djelovanje te inhibira produljenje klice i germinaciju konidija kod patogenih gljivica (Benoit Gnonlonfin i sur., 2012). Sekundarni metaboliti koprive imaju izražena farmakološka svojstva. Glavni flavonoidi su kvercetin, kaempferol i rutin. Ti flavonoidi imaju antioksidacijska i protuupalna svojstva koja mogu ograničiti oksidativna oštećenja odgovorna za neke kronične bolesti poput raka, kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti. Ostali učinci uključuju inhibiciju lipidne peroksidacije mitohondrija jetre i krvnih stanica, a također se pokazalo da imaju antibakterijska i antivirusna svojstva. Najaktivniji flavonoid je kvercetin koji ima snažno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje. Tanini, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina i kumarini također imaju antioksidativno djelovanje i mogu zaštititi stanice od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima. Korijen koprive sadrži lektin zvan Urtica Dioica Aglutinin (UDA) koji ima malu molekulsku masu (8 do 9 kDa) i sastoji se od jednog polipeptidnog lanca s manje od 100 aminokiselina. UDA ima imunomodulatornu aktivnost i reducira autoimune simptome (Said i sur., 2015).

### 2.2. SABAL PALMA

Sabal palma (lat. *Serenoa repens*, syn. *Sabal serrulata*) je niska grmolika vrsta palme, pripada porodici *Arecaceae*. Rasprostranjena je u jugoistočnom dijelu SAD-a, od Južne Karoline do južnog Missisipija te na Floridi. U nekim slučajevima može narasti od 3 do 4 metra u visinu. Ima zelene lepezaste, oštro nazubljene listove dužine oko 0,25 m s bodljikavim peteljka. Stabljika je najčešće kratka, prekrivena osnovicama otpalih listova i smeđim nitima. Cvjetovi su sitni i bijeli, a skupljeni su u gusti klipasti cvat. Plod koštunica, ovalnog oblika duljine 0,016-0,025 m, bogata je uljima čija žućkasta boja zrenjem prelazi u plavo-crnu. U plodu se nalazi sjemenka veličine do 0,018 m. Ekstrakt sabal palme koristi se u liječenju benigne hiperplazije prostate, često kao alternativa farmaceutskim agensima. Za proizvodnju ljekovitih pripravaka beru se zreli plodovi te se suše ili u svježem stanju koriste za dalju preradu u ekstrakt (Leung i Foster, 1996).

### 2.2.1 Kemijski sastav

Plodovi sabal palme (slika 2.) bogati su biološki aktivnim tvarima koje pripadaju različitim skupinama organskih spojeva. Sadrže ulje sa 75% masnih kiselina (kaprinska, kaprilna, laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska, oleinska, linolna i linolenska) te 25% neutralnih spojeva koji uključuju slobodne i esterificirane sterole (kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol i cikloartenol) i estere masnih kiselina. Sadržaj eteričnog ulja je 1-2%. Prisutni su također i glukoza, galaktoza, manoza, fruktoza, arabinoza, ramnoza, polisaharidi, glukuronska kiselina, heksakozanol, 1-oktakozanol, farnezol i fitol (Leung i Foster, 1996).



Slika 2. List i plod sabal palme (Anonymus 2)

### 2.3. VRBOVICA

Vrbovica (*Chamaenerion angustifolium* L. syn. *Epilobium angustifolium* L.) (slika 3.) je višegodišnja biljka iz porodice pupoljki (*Onagraceae*). Rod *Epilobium* (*Onagraceae*) sastoji se od oko 200 vrsta rasprostranjenih širom svijeta, a u Europi se može naći 27 različitih vrsta. U proljeće iz rozete prizemnih listova izraste okrugla stabljika visine do 0,5-2 m. Pri vrhu stabljike i ogranaka cvatu od lipnja do rujna sitni, ljubičasto-rozi cvjetovi s duguljastim laticama, zaobljenim na vrhovima. Plod je izduženi tobolac, sličan mahuni, koji nakon dozrijevanja uzdužno puca na četiri dijela iz kojeg ispadaju brojne sitne, crne sjemenke s karakterističnim čuperkom dlačica. Biljka

najčešće raste u većim skupinama uz jarke, obale rijeka i po vlažnim šumskim čistinama (Buchwald i sur., 2006). Vrbovica je jedna od važnih ljekovitih biljaka koja se koristi u liječenju urogenitalnih poremećaja, uključujući benigne hiperplazije prostate (BHP) i prostatitisa. Terapeutski učinci ekstrakta vrbovice uključuju antiproliferativno, protuupalno, imunomodulacijsko, antioksidativno i antimikrobno djelovanje (Adamczak i sur., 2019).

### 2.3.1. Kemijski sastav

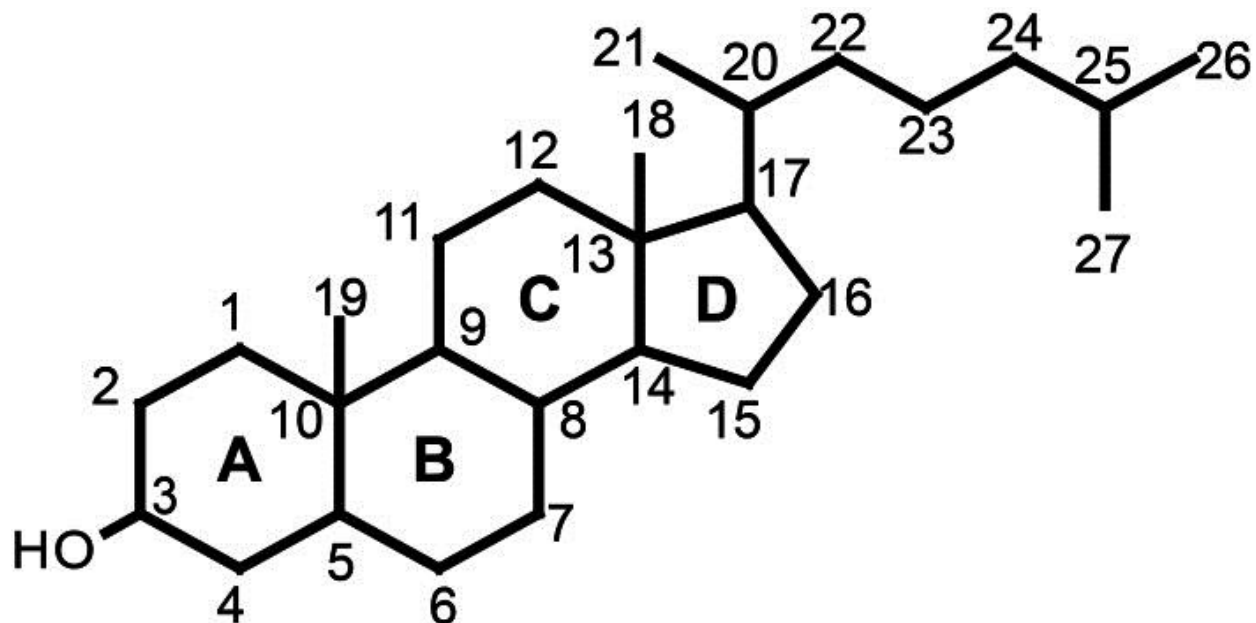
Identificirano je oko 250 metabolita prisutnih u vrbovici od čega 50 flavonoida i njihovih derivata. Oni uključuju flavonolske aglikone (kaempferol, kvercetin i miricetin) koji u glikonskom djelu sadrže jedinicu šećera glukuronske kiseline, ramnoze, glukoze, arabinoze ili galaktoze. Kvercetin-3-*O*-glukuronid je dominantan i karakterističan flavonoid vrbovice. Fenolne kiseline (kafeinska, elaginska, ferulinska, galna, protokatehinska) i njihovi derivati jedan su od dominantnih skupina fenolnih spojeva vrbovice i važni su antioksidansi i imaju terapijski potencijal kod liječenja BHP. Vrbovica sadrži i visoku razinu aktivnih polifenola elagitanina koji predstavljaju oko 15% suhe tvari biljke. Osim polifenola, sadrži i lipofilnu lipidnu frakciju bogatu steroidima, terpenoidima i masnim kiselinama. Prisutni su kampesterol, stigmasterol kao i  $\beta$ -sitosteroli njegovi derivati. Masne kiseline, kao i triterpeni (npr. oleanolna, pomolna i ursolna kiselina) su glavne komponente lipofilne frakcije ekstrakta vrbovice (Adamczak i sur., 2019).



Slika 3. Vrbovica (Anonymus 3)

## 2.4. BILJNI STEROLI

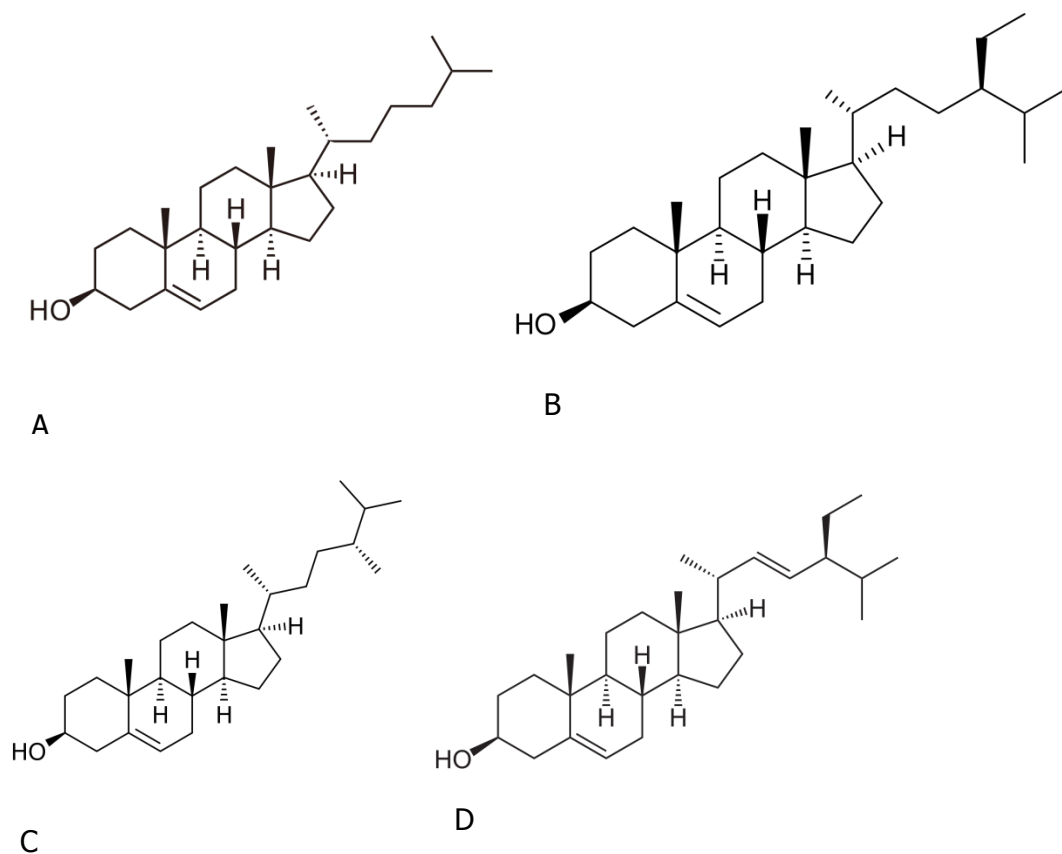
Biljni steroli ili fitosteroli su kompleksni alkoholi, strukturno slični kolesterolu (slika 5. **A**) Sastoje se od steroidnog kostura s hidroksilnom skupinom pričvršćenom na C-3 atom A-prstena i alifatskog bočnog lanaca vezanog za C-17 atom D-prstena. Steroli obično imaju dvostruku vezu između C-5 i C-6, dok je ta veza zasićena fitostanolima (slika 4).



Slika 4. Osnovna kemijska struktura sterola (Anonymus 4)

Najčešći su fitosteroli i fitostanoli, primjerice  $\beta$ -sitosterol (stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol) (slika 5. **B**), sitosterol (3 $\beta$ -stigmast-5-en-3-ol), sitostanol (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ -stigmastan-3-ol), kampesterol (3 $\beta$ -ergost-5-en-3-ol) (slika 5. **C**), kampestanol (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -ergostan-3-ol), stigmasterol (3 $\beta$ -stigmasta-5,22-dien-3-ol) (slika 5. **D**) i brasikasterol (3 $\beta$ -ergosta-5,22-dien-3-ol). Svaki pojedini izvor ima tipični fitosterolni sastav (Cantrill, 2008). Uobičajeni izvori uključuju biljna ulja (suncokreovo, kukuruzno, sojino, maslinovo, repičino), povrće, voće te mahunarke, a identificirano ih je preko 40. Ovi steroli su obično prisutni kao slobodni steroli ili esteri masnih kiselina. Biljni stanoli su zasićeni steroli (ne sadrže dvostruke veze) i manje su zastupljeni u prirodi nego steroli. Stanoli teže oksidiraju i jednako su učinkoviti kao steroli u smanjenju apsorpcije kolesterola (Patterson 2006). Dnevni unos sterola varira u populaciji, a kreće se od 160 – 400 mg. U ranim razdobljima ljudske evolucije (prije 5-7 milijuna godina) dnevni unos biljnih sterola bio je znatno veći, do 1 g dnevno. Apsorpcija biljnih sterola kod ljudi je znatno niža (2-5%) u usporedbi s kolesterolom (60%). Posljedično,

razina biljnih sterola u krvi iznosi 0,1-0,4% razine kolesterola. S obzirom na strukturnu sličnost s kolesterolom, biljni steroli prvenstveno su proučavani zbog svojstva da inhibiraju apsorpciju kolesterola. Potencijana pozitivna svojstva biljnih sterola uključuju prevenciju raka i ateroskleroze, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje (Berger i sur., 2004).



Slika 5. Kolesterol **A**,  $\beta$ -sitosterol **B**, kampesterol **C**, stigmasterol **D** (Ogbe i sur., 2015).

#### 2.4.1 Utjecaj biljnih sterola na smanjenje kolesterola u krvi

Visoke koncentracije kolesterola u krvi veliki su faktor rizika za razvitak koronarne bolesti srca. Oksidacija suvišnog kolesterola dovodi do taloženja plaka na stijenkama koronarnih arterija, što dovodi do otežanog protoka krvi i visokog krvnog tlaka. Utjecaj fitosterola na smanjenje kolesterola u krvi vrlo je dobro dokumentiran u znanstvenoj literaturi. Nakon dugogodišnjih znanstvenih debata, zaključeno je da fitosteroli (slobodni i esterificirani) smanjuju ukupni kolesterol i LDL-kolesterol tako što reduciraju njegovu apsorpciju (Berger i sur., 2004). 2009. godine EFSA (European Food Safety Authority) potvrdila je da fitosteroli smanjuju LDL-kolesterol u krvi za 7-10,5% ukoliko osoba konzumira 1,5-2,4 g fitosterola dnevno. FDA je također utvrdila

da konzumacija fitosterola (u količini većoj od 1.3 g, dva puta dnevno) dovodi do smanjenja rizika razvitka bolesti srca (ako se konzumiraju unutar prehrane s niskim udjelom zasićenih masti).

#### 2.4.2 Antikacerogena svojstva fitosterola

Fitosteroli inhibiraju razvoj različitih vrsta karcinoma inhibicijom rasta i promicanjem apoptoze njihovih stanica te aktivacijom enzima kaspaze. Povećana aktivnost enzima kaspaze može se pripisati činjenici da ugradnja fitosterola u stanične membrane rezultira promjenama u njihovoj strukturi i funkciji što dovodi do povećanja aktivnosti proteina uključenih u izvanstanične i unutarstanične putove transdukcije signala kojima se aktiviraju kaspazni enzimi. Fitosteroli također inhibiraju razvoj raka snižavanjem kolesterola u krvi čime se posljedično smanjuje koncentracije kolesterola u lipidnim slojevima staničnih membrana. Ove činjenice potvrđuju antikarcinogeno djelovanje fitosterola i stoga se preporučuje njihova konzumacija u svrhu prevencije i liječenja raka (Woyengo i sur., 2009). Mendilaharsu i sur. (1998) proveli su studiju na 463 sudionika kojima je recentno dijagnosticiran rak pluća prvog stupnja. Tijekom 3 godine promatrani su utjecaji konzumacije fitosterola na razvitak raka pluća. Konzumiranje fitosterola dovelo je do smanjenja rizika razvijanja raka za oko 50%. De Stefani i sur. (2000) istraživali su učinke unosa biljnog sterola na prevalenciju karcinoma želuca kod 120 pacijenata kojima je potvrđen rak želuca. Rezultati su pokazali obrnuto proporcionalnu vezu između ukupnog unosa fitosterola i raka želuca. McCann i sur. (2003), proveli su istraživanje na pacijentima s potvrđenim karcinomom jajnika. Utvrđen je smanjeni rizik od razvoja raka jajnika kod pacijentica koje su unosile veće dnevne količine stigmasterola (> 23 mg) u usporedbi s skupinom pacijentica koje su unosile manju količinu istog biljnog sterola (< 12 mg). Međutim, Normen i sur. (2001), proveli su studiju u Nizozemskoj na 3123 ispitanika s rizikom od raka debelog crijeva i rektuma. Uočeno je da nema veze između unosa fitosterola i smanjenog rizika od raka debelog crijeva i rektuma nakon 6 godina praćenja. Nedostatak učinka fitosterola na rizik od raka debelog crijeva *in vivo* može se pripisati njegovom inhibicijskom učinku na apsorpciju kolesterola u tankom crijevu, što je rezultiralo povećanim protokom kolesterola u debelo crijevo, gdje može izazvati i promovirati razvoj raka.

## 2.5 FITOTERAPIJA BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE

Suplementacija fitosterolima pokazala se korisnom u tretiranju benigne hiperplazije prostate (BHP). BHP je vrlo česta bolest kod starijih muškaraca, a vjerojatnost za razvitak raste sa starenjem. Određeni stupanj BHP prisutan je u 40% 50-godišnjaka, a ta se brojka povećava na 80% kod muškaraca u dobi od 70 godina. Simptomatski BHP uzrokovan je povećanjem prostate i povećanim tonusom glatkih mišića prostate što dovodi do otežanog protoka mokraće. Patogeneza BHP nije još do kraja razjašnjena no vjerojatni uzrok stanične proliferacije su dob i s time povezane hormonske promjene. BHP također može bit uzrokovana ili pogoršana kroničnim upalama i oksidativnim stresom, pa stoga prehrambeni čimbenici kao što su omega-3-masne kiseline, polinezasićene masti i antioksidanti mogu utjecati na smanjenje rizika razvitka BHP (Kristal i sur., 2008). Lijekovi propisani za liječenje uključuju alfa-blokatore, inhibitore 5-alfa-reduktaze i biljne pripravke. Suplementacija fitosterolima pokazala se korisnom u tretiranju BPH. Wilt i sur. (1999) proveli su studiju čiji su rezultati pokazali da oralna konzumacija malih doza (60-130 mg/dan)  $\beta$ -sitosterola u periodu od 4 do 26 tjedana poboljšava kliničke simptome BHP (brzinu protoka i zaostatak mokraće) bez smanjivanja veličine prostate. Studija koju su proveli Berges i sur. (2000) pokazala je da su korisni učinci  $\beta$ -sitosterola u dozi od 60 mg/dan održavani u razdoblju od 18 mjeseci. Ova učinkovitost u poboljšanju simptomatologija BHP vrijedna je pažnje zbog male doze  $\beta$ -sitosterola korištene u studiji (u odnosu na uobičajeni prehrambeni unos fitosterola od 150-400 mg/dan). Mehanizmi odgovorni za korisne učinke fitosterola na BHP ostaju nejasni, no prepostavka je da su povezani s izmijenjenim metabolizmom testosterona prilikom njihove konzumacije.

Postoje brojne biljke koje imaju blagotvoran utjecaj na BHP iako mehanizmi djelovanja još nisu dobro poznati. Aktivni sastojci nekih od tih biljaka su poznati i mogu se koristiti kao komponente za razvoj novih učinkovitih i sigurnih lijekova. Ljekovite biljke čiji se ekstrakti najčešće koriste kod fitoterapijelog liječenja BHP su: sabal palma (*Serenoa repens*), afrička šljiva (*Pygeum africanum*) te kopriva (*Urtica dioica L.*). Biljke koje se rijeđe primjenjuju su: bundeva (*Cucurbita pepo L.*), vrbovica (*Epilobium spp. L.*), raž (*Secale cereale L.*), afrički krumpir (*Hypoxis rooperi*), kraljevska palma (*Roystonea regia*), primorski bor (*Pinus pinaster*) te rajčica (*Lycopersicon esculentum*) (Allkanjari i Vitalone, 2015). Korijen koprive, plod sabal palme i list vrbovice bili su predmet istraživanja ovog rada te su detaljnije opisani u natavku.

Ekstrakt korijena koprive vrlo je čest sastojak pripravaka za liječenje BHP-a dok se svježi i osušeni dijelovi biljke koriste u druge svrhe (bolovi u zglobovima, infekcije mokraćnog sustava). Kopriva

se također koristi za vanjsku upotrebu, kao sastojak šampona protiv gubitka kose, seboreje i peruti vlasišta. Ekstrakti korijena sadrže mješavinu spojeva topljivih u vodi i alkoholu dok se postupci ekstrakcije ovisni o proizvođaču. Predloženi mehanizmi djelovanja ekstrakta baziraju se na inhibiciji faktora rasta prostate, uključujući i inhibiciju konverzije testosterona u dihidrotestosteron, antiproliferativno i protuupalno djelovanje te inhibiciju SHBG (eng. Sex Hormone Binding Globulin, glavni transportni protein za estrogene i androgene u perifernoj krvi). Fitosteroli, lignani, polisaharidi i lektin UDA smatraju se glavnim aktivnim tvarima korijena koprive.

Inhibitori aromataze koriste se u liječenju BHP-a za sprječavanje porasta estrogena kod muškaraca tijekom starenja i posljedičnog povećanja prostate. Testosteron, njegov metabolit dihidrotestosteron (DHT) i estrogen su hormoni povezani s bolešću prostate. Testosteron se konvertira do estrogena posredovanjem enzima aromataze. Razine aromataze povećavaju se starenjem, a razina testosterona opada (više razine aromataze pretvaraju testosteron u estrogen), a posljedično dolazi do povećanja prostate. Korijen koprive u svom sastavu sadrži 9-hidroksi-10-*trans*-12-*cis*-oktadekadiensku kiselinu koja inhibira aromatazu u tkivu prostate (Kraus i sur., 1991). Važnost lignana iz korijena koprive (npr. 3,4-divanilliltetrahidrofurana) u liječenju benigne hiperplazije prostate posljedica je interferencije kod vezanja globulina koji veže spolne hormone (SHBG) na testosteron, testosteroni receptor te SHBG-receptor (Schottner i sur., 1997; Hryb i sur., 1995). Protein UDA (*Urtica dioica* aglutinin) je lektin otporan na toplinu i kiseline koji se nalazi u korijenu koprive. UDA antagonizira receptor za epidermalni faktor rasta koji može biti od koristi kod ometanja patogeneze BHP (Wagner i sur., 1995). Hirano i sur. (1994) ispitivali su učinke ekstrakata korijena koprive na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-azu tkiva kod BHP. Rezultati su pokazali da hidrofobni sastojci, poput steroida iz korijena koprive inhibiraju membransku  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP-aznu aktivnost u prostati, što posljedično može suzbiti metabolizam i rast stanica i prostate.

Najčešće korišteni fitoterapijski ekstrakt kod liječenju BHP je ekstrakt osušenog, zrelog ploda američke, patuljaste sabal palme (*Sabal serrulata*). Ljekovitost sabal palme za ublažavanje oticanja prostate poznata je još od početka 19.-og stoljeća. Mehanizam djelovanja ekstrakta bio je predmet istraživanja nekoliko *in vitro* i indirektnih *in vivo* studija, no nije još definiran. Predloženi mehanizmi uključuju promjene u metabolizmu kolesterola i antiestrogena, antiandrogenski (aktivnost inhibitora 5-alfa-reduktaze) i protuupalni učinak kao i smanjenje dostupnih spolnih hormona koji vežu globulin (Wilt i sur., 2000). Lipidni ekstrakt ploda sabal palme sadrži kompleksnu smjesu dugolančanih alkohola, masnih kiselina i njihovih glicerida



(kaprilna, miristinska, laurinska, stearinska, palmitinska, linolna kiselina), fitosterola ( $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3-*O*-glukozid,  $\beta$ -sitosterol-3-*O*-diglukozid, kampestrol, cikloartenol), flavonoida, ugljikohidrata, tanina, pigmenta i organskih kiselina. Smatra se da su fitosteroli i slobodne masne kiseline glavni farmakološki aktivni sastojci ekstrakta (Allkanjari i Vitalone, 2015). Analizom podataka iz 18 provedenih studija u kojima je sudjelovalo preko 3000 muškaraca proizašlo je sljedeće: (1) u usporedbi s placebom, ekstrakt sabal palme poboljšao je simptome bolesti urinarnog trakta za 28%, nokturije za 25%, prosječnog protoka urina za 28% i zaostalog volumena urina za 43% (Wilt i sur., 2000), (2) rezultati provedenih studija ukazuju da ekstrakt sabal palme pruža umjereno poboljšanje simptoma bolesti urinarnog trakta, (3) smanjuje prisutnost nuspojava i cijenovno je pristupačniji u usporedbi finasteridom (inhibitor testosteron 5-alfa-reduktaze, koristi se u liječenju BHP). Carbin i sur. (1990.) objavili su studiju usmjerenu na procjenu učinkovitosti pripravka Curbicina koji je sadržavao kombinaciju ekstrakta bučinih sjemenki i ekstrakta sabal palme. U usporedbi s placebom (11%), Curbicin je poboljšao simptome urinarnog trakta za 85%, zaostali urin smanjio za 31 % (placebo 6,5%).

Vrbovica ima protuupalni i terapijski učinak te se koristi u liječenju benigne hiperplazije prostate kao i za prevenciju raka prostate. Predloženi su brojni mehanizmi djelovanja uključujući antiandrogeno djelovanje, protuupalni učinak i inhibitorno djelovanje aromataze i tipa-2-izoenzima 5-alfa reduktaze. Farmakološke studije su kao glavnu tvar odgovornu za ovo djelovanje identificirale oenotein B (inhibitor 5 $\alpha$ -reduktaze), prisutan u svim vrstama roda *Epilobium*. Pokazalo se da oenotein B ima antivirusno i antikancerogeno djelovanje (Rogers 2014). Vrbovica je također bogata flavonoidima (miricitrin, izokvercitrin, kvercitrin, guaiaverin, glukuronid) te steroliima ( $\beta$ -sitosterol i njegovi esteri) (Allkanjari i Vitalone, 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 MATERIJALI

##### *Prah rizoma koprive*

Za istraživanje korišteni su rizomi koprive pulverizirani mlincem (slika 6). Rizomi koprive izvađeni su sa lokacija u Istri: Poreč-1, Limski zaljev-2, Bale-3, Vodnjan-4 i Muntrilj-5 tijekom jeseni 2019. godine.



Slika 6. Rizomi koprive (vlastita fotografija)

##### *Prah lista vrbovice*

Za istraživanje korišteni su listovi vrbovice pulverizirani mlincem (SUBAN, Samobor, 2019).

##### *Ekstrakt ploda sabal palme*

Za istraživanje korišten je ekstrat ploda sabal palme (*Serenoa repens*) izdvojen iz jedne meke kapsule biljnog lijeka Prostanol uno (Proizvođač: Berlin-Chemie AG, Glienicke Weg 125, 12489 Berlin, Njemačka).

*Aparatura i pribor:*

- Analitička vaga (KERN ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
- Tikvice s ravnim dnom (25 mL)
- Tikvice s okruglim dnom (25 mL i 50 ml)
- Povratno zračno hladilo
- Plinski plamenik
- Graduirane pipete (5 mL)
- Kolona za kromatografiju sa sinterom na dnu
- Stakleni štapić
- Laboratorijske čaše (50 mL)
- Menzure (50 mL)
- Rotacijski vakuum-otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Mikropipeta
- Razvijajuće kadice za TLC
- Metalna špatula
- Filter-papir (Whatman filter papir, veličina pora 125 mm)
- Stakleni lijevak
- Sušionik (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- Spremnik s dušikom
- Vijalice s insertom
- 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 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm)

*Reagensi:*

- Kalijev hidroksid KOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ )- otopiti 3 g KOH u 5 mL vode i razrijediti u 100 mL 95 %-tnog etanola ( $V V^{-1}$ )
- Interni standard,  $\alpha$ -kolestanol ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  u 95 %-tnom etanolu ( $V V^{-1}$ ))
- Etanol 95% ( $V V^{-1}$ ), Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Aluminijski oksid ( $0,063 \text{ mm} - 0,200 \text{ mm}$ ; udio vode 0 %)
- Dietil-eter, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Silikagel ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) (Silikagel F<sub>254</sub>, Macherey-Nagel, GmbH, Co. KG)
- Mobilna faza (TLC) – heksan/dietil eter (1:1,  $V V^{-1}$ )
- Heksan, Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska)
- Otopina standarda za TLC ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  kolestanola u acetonu i  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  kolesterola u acetonu)
- Aceton, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska)
- Metanol, Kefo (Sisak, Hrvatska)
- Sililirajući reagens [sastoji se od piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 5:2:1 ( $V V^{-1} V^{-1}$ )]

## 3.2. METODE

### 3.2.1 Ekstrakcija lipida

Prije ekstrakcije rizome koprive i listove vrbovice bilo je potrebno usitniti mlincem do forme praha. 5 g praha odvagano je u dvije plastične graduirane epruvete nakon čega je uzorcima dodano 40 ml ekstrakcijskog otapala heksana. Uzorci su 30 minuta izmućkavani na tresilici te u sljedećem koraku centrifugirani 10 minuta pri 5000 o/min. Supernatant je filtriran kroz filter-papir u tikvicu sa okruglim dnom (100 mL) te uparavan na rotavaporu (60°C). Opisani postupak ponovljen je sa zaostalim talogom u plastičnoj epruveti. Tako dobiveni lipidni ekstrakt propuhan je strujom dušika te izvagan.

### 3.2.2. Određivanje udjela i sastava sterola

Princip određivanja:

Za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima nepolarne frakcije koprive, vrbovice i sabal palme korištena je metoda HRN EN ISO 12228-1:2014. Metoda se temelji na saponifikaciji uzorka, kojemu je dodan  $\alpha$ -kolestanol kao unutarnji standard, u prisutnosti etanolne otopine KOH. Neosapunjiva frakcija ispire se dietil-eterom sa kolone ispunjene aluminijskim oksidom kao stacionarnom fazom. Aluminijski oksid zadržava anione masnih kiselina, a propušta negliceridne komponente. Potom se iz neosapunjive frakcije se tankoslojnom kromatografijom na bazičnom silikagelu izdvaja sterolna frakcija. Sterolna frakcija prevodi se u trimetilsililestere te analizira plinskim kromatografom s masenim detektorom.

### 3.2.2.1 Priprema neosapunjive frakcije

Lipidnom ekstraktu, dobivenom ekstrakcijom s heksanom, dodan je 1,0 mL prethodno pripremljenog internog standarda (etanolna otopina  $\alpha$ -kolestanola), 5,0 mL otopine KOH ( $c = 0,5 \text{ molL}^{-1}$ ) te 2-3 kuglice za vrenje. Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo i zagrijava na plameniku preko azbestne mrežice do vrenja. Nakon 15 minuta zagrijavanja pri temperaturi vrelišta, u tikvicu se doda 5,0 mL etanola te se sadržaj ohladi do sobne temperature.

Priprema kolone za kromatografiju u stupcu:

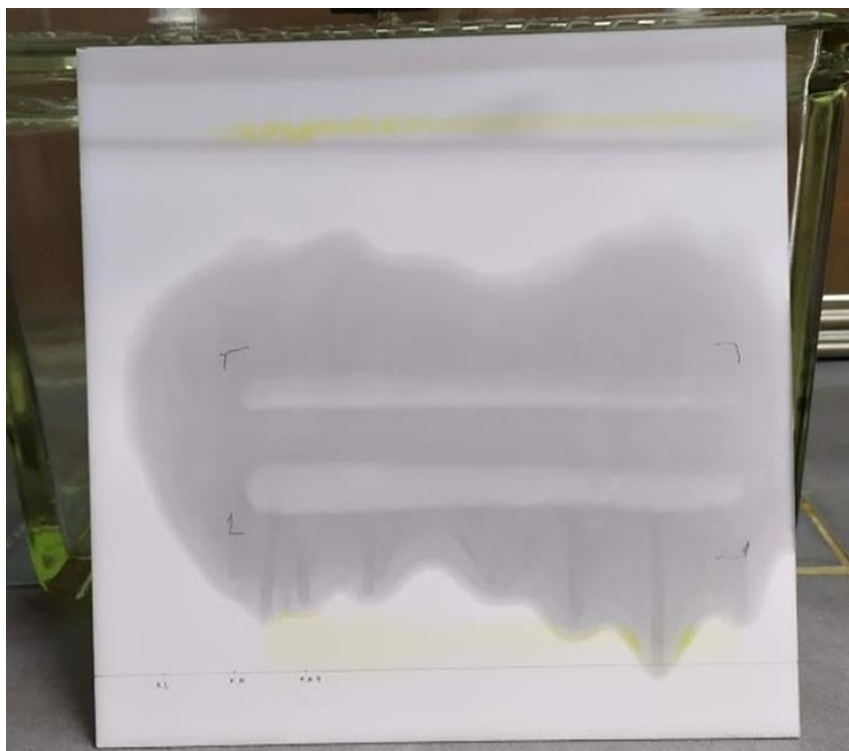
Kolona za kromatografiju dugačka je 25 cm, ima unutarnji promjer 1,5 cm te sinter na dnu kolone. Na dno kolone stavi se vata i doda se malo etanola, kako bi vata što bolje prionula uz sinter. Pomoću staklenog štapića istisne se zrak, kako ne bi zaostao u vati. Kolona se pričvrsti za metalni stalak. Odvaži se 10 g aluminijevog oksida koji se uz 20 mL etanola kvantitativno prenese u kolonu za kromatografiju. Punjenje kolone potrebno je provesti pažljivo kako bi se izbjegle moguće pukotine u stupcu aluminijevog oksida. Višak etanola ispusti se iz kolone tako da nivo etanola bude za pola centimetra iznad nivoa stupca aluminijevog oksida.

### 3.2.2.2. Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom u stupcu

Pomoću pipete od 5 mL, ohlađeni uzorak prebaci se u pripremljenu kolonu s aluminijevim oksidom. Euliranje započinje prvo s 5 ml etanola pa 30 ml dietil etera (10ml za ispiranje tikvice i 10+10 ml direktno u kolonu). Protok eluensa treba održavati na oko  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Neosapunjiva frakcija skuplja se u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL. Dobiveni eluat upari se do suhog na rotacijskom uarivaču pri vakumu i temperaturi  $40^\circ\text{C}$  oko 10 min kako bi se uklonila otapala.

### 3.2.2.3 Izdvajanje sterola iz neosapunjive frakcije tankoslojnom kromatografijom

Steroli se od neosapunjive lipidne frakcije odvajaju pomoću tankoslojne kromatografije (TLC). Uzorak neosapunjive frakcije otopi se u 0,5 mL dietil-etera, te se nanosi mikropipetom na TLC-ploču sa silikagelom (veličine 20 x 20 cm, debljine 0,25 mm) u ravnoj liniji, 2 cm od donjeg ruba ploče. Potom se sa još 0,5 mL dietil etera isperu stijenke tikvice te se uzorak ponovno nanosi. Na istoj se visini ispred ove linije nanese 2-3  $\mu$ L referentne otopine  $\alpha$ -kolesterola te  $\alpha$ -kolestanola s ciljem identifikacije sterola nakon što se razvije kromatogram. TLC-ploča se postavi u kadicu koja sadrži 100 ml eluensa, u ovom slučaju smjese heksan/dietil-eter te se zatvori poklopcem. Kromatogram se razvija pri sobnoj temperaturi, do trenutka kada linija otapala dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče (oko sat i pol). Nakon toga ploča se suši u digestoru. Osušena ploča ravnomjerno se poprskava metanolom dok se ne pojave zone sterola. Zone se označe (2 mm iznad i 4 mm ispod vidljivog traga), ostružu metalnom špatulicom i kvantitativno prenesu u laboratorijsku čašu. Radi kvantitativnog prenošenja silikagela dodaje se 0,5 mL 95% otopine etanola i prenese u lijevak s filter-papirom, a sterolna frakcija se izdvoji ispiranjem u tri navrata s po 5 mL dietil etera. Sterolna frakcija skuplja se u tikvicu od 50 mL s okruglim dnom. Ekstrakt se uarava na rotacijskom uarivaču do volumena od 1 mL na temperaturi od 40° C. Koncentrat se mikropipetom prenese u epruvetu, a stijenke tikvice isperu se sa još 1 ml dietil-etera. Epruveta se propuhuje strujom dušika do suhog ostatka koji predstavlja sterolnu frakciju.



Slika 7. Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom (vlastita fotografija).

#### 3.2.2.4. Priprema trimetilsililetera

U epruvetu sa sterolnom frakcijom doda se 100  $\mu\text{L}$  reagensa za sililiranje, nakon čega se epruveta dobro začepi i stavi u sušionik na temperaturu od  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  na 15 min. Nakon sušenja, sadržaj u epruveti ohladi se u eksikatoru te se prebaci u vijalice od 2 mL s insertom od 100  $\mu\text{L}$ . Bistra otopina injektira se u kolonu plinskog kromatografa.

#### 3.2.2.5. Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom

Pripremljen uzorak analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD). Kromatograf je opremljen sa sustavom za injektiranje uzoraka i masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector koji je preko kanala spojen na računalo. U kompjuterskom sustavu zadani su uvjeti analize: temperatura kolone, temperatura detektora, temperatura injektora, protok plina nositelja i količina uzorka.



Prilikom analize koristila se kapilarna kolona Agilent DB-17MS (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), a količina injektiranog uzorka bila je 1  $\mu\text{L}$ . Temperatura injektora iznosila je 290°C, a temperatura kolone je programirana tako da raste 6°C  $\text{min}^{-1}$  od 180 do 270°C pri čemu se maksimalna temperatura zadržava 30 min. Temperatura detektora iznosi 280°C. Kao plin nositelj koristio se helij, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize njegov je protok bio konstantan te je iznosio 1,5 mL  $\text{min}^{-1}$ , uz Split 13,3:1. Analiza je provedena u minimalno 4 paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

Identifikacija sterola provedena je usporedbom retencijskih vremena analiziranih uzoraka s vremenima zadržavanja komercijalno dostupnih standardnih smjesa sterola poznatog sastava analiziranih pod jednakim uvjetima i putem literature te potvrđena GC-MS s NIST bazom podataka. Kvantitativni sastav sterola određuje se metodom normizacije površine ispod pikova. Iz dobivenih vrijednosti računa se pojedinačni udio sterola koji se izražava kao % od ukupnih sterola.

Udio ukupnih sterola izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  i izračunat je prema formuli [1]:

$$\text{Ukupni steroli} = \frac{\sum A_s \cdot 1000}{A_\alpha \cdot m} \quad [1]$$

gdje je:

$A_s$  = površina svakog pojedinačnog pika sterola

$A_\alpha$  = površina ispod pika  $\alpha$ -kolestanola

$m$  = masa uzorka ulja (g)

Udjel pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola te je izračunat po formuli [2]:

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

gdje je:

$A$  = površina ispod pika određenog sterola ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

$A_i$  = površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola



## 4.REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. REZULTATI STATISTIČKE ANALIZE

U ovom radu, analiziran je sadržaj fitosterola korijena koprive (sakupljenih s više različitih lokacija), listu vrbovice i ekstraktu sabal palme. Detektirano je deset fitosterola: kampesterol, kampestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ 5-avenasterol, lanosterol, cikloartenol, 24-metilen-cikloartenol, etilkolestenol i citrostadienol.

Za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Uzorci su uspoređeni jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA), a marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom. Statistički značajna razlika razmatrana je na razini  $p \leq 0,05$  (95 %-tni interval pouzdanosti).

Tablica 1. Ukupni steroli u korijenu samonikle koprive (Poreč-1, Limski zaljev-2, Bale-3, Vodnjan-4, Muntrilj-5), listu vrbovice-6, te u plodu sabal palme-7

Uzorak	Ukupni steroli (g/kg)
1	0,62±0,00 <sup>a</sup>
2	0,77±0,00 <sup>b</sup>
3	0,87±0,00 <sup>c</sup>
4	0,95±0,00 <sup>d</sup>
5	0,86±0,00 <sup>c</sup>
6	1,15±0,01 <sup>e</sup>
7	4,84±0,01 <sup>f</sup>
Prosječna vrijednost	1,44

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

Tablica 2. Sastav sterola u rizomu samonikle koprive s različitih lokacija na području RH (Poreč-1, Limski zaljev-2, Bale-3, Vodnjan-4, Muntrilj-5), listu vrbovice-6 i plodu sabal palme-7

Uzorak	Kampesterol (%)	Kampestanol (%)	Stigmasterol (%)	$\beta$ -sitosterol (%)	$\Delta$ 5-avenasterol (%)	Lanosterol (%)	Cikloartenol (%)	24-metilen cikloartenol (%)	Etilkolestenol (%)	Citrostadienol (%)
1	11,23±0,02 <sup>b</sup>	11,72±0,04 <sup>d</sup>	0,58±0,01 <sup>b</sup>	69,64±0,22 <sup>b</sup>	0,44±0,01 <sup>b</sup>	1,03±0,01 <sup>cd</sup>	1,15±0,02 <sup>d</sup>	0,37±0,28 <sup>a</sup>	0,59±0,00 <sup>a</sup>	3,25±0,05 <sup>e</sup>
2	12,30±0,04 <sup>c</sup>	0,53±0,03 <sup>b</sup>	1,72±0,03 <sup>c</sup>	78,62±0,10 <sup>d</sup>	0,36±0,00 <sup>a</sup>	1,64±0,00 <sup>e</sup>	1,64±0,00 <sup>e</sup>	1,03±0,00 <sup>b</sup>	0,45±0,02 <sup>a</sup>	1,72±0,04 <sup>b</sup>
3	14,04±0,00 <sup>e</sup>	0,56±0,01 <sup>b</sup>	2,17±0,01 <sup>d</sup>	75,54±0,03 <sup>c</sup>	0,30±0,01 <sup>a</sup>	0,83±0,01 <sup>bc</sup>	0,56±0,02 <sup>b</sup>	0,36±0,01 <sup>a</sup>	1,62±0,01 <sup>b</sup>	4,03±0,03 <sup>f</sup>
4	12,30±0,01 <sup>c</sup>	0,36±0,00 <sup>b</sup>	2,48±0,00 <sup>e</sup>	81,10±0,01 <sup>e</sup>	0,35±0,00 <sup>a</sup>	0,69±0,00 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,09±0,00 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>a</sup>	2,28±0,01 <sup>c</sup>
5	13,05±0,03 <sup>d</sup>	0,57±0,00 <sup>b</sup>	2,18±0,00 <sup>d</sup>	77,43±0,22 <sup>d</sup>	0,59±0,00 <sup>c</sup>	1,15±0,00 <sup>d</sup>	0,83±0,01 <sup>c</sup>	0,97±0,03 <sup>b</sup>	0,44±0,30 <sup>a</sup>	2,79±0,02 <sup>d</sup>
6	2,72±0,05 <sup>a</sup>	0,05±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,00 <sup>a</sup>	68,28±0,86 <sup>b</sup>	1,30±0,04 <sup>d</sup>	1,61±0,17 <sup>e</sup>	2,10±0,15 <sup>f</sup>	1,91±0,11 <sup>c</sup>	21,52±0,38 <sup>c</sup>	0,29±0,07 <sup>a</sup>
7	17,46±0,02 <sup>f</sup>	0,86±0,16 <sup>c</sup>	7,50±0,02 <sup>f</sup>	54,05±0,09 <sup>a</sup>	2,34±0,01 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	8,39±0,04 <sup>g</sup>	2,87±0,12 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	6,53±0,21 <sup>g</sup>
Prosječna vrijednost	11,87	2,09	2,41	72,10	0,81	0,99	2,12	1,09	3,55	2,98

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

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

## 4.2.RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti sastav fitosterola u uzorcima korijena samonikle koprive, ubrane na više lokacija na području Republike Hrvatske, te im usporediti sastav s vrbovicom i sabal palmom. Fitosteroli, čija je prisutnost istraživana u ovom radu su: kampesterol, kampestanol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ 5-avenasterol, lanosterol, cikloartenol, 24-metilencikloartenol, etilkolestenol i citrostadienol. Udio pojedinih spojeva u uzorcima korijena koprive statistički se značajno razlikuje ( $p \leq 0,05$ ). Prema dobivenim podacima najzastupljeniji fitosterol izoliran iz analiziranih uzoraka je  $\beta$ -sitosterol. U uzorku koprive Vodnjan-4 detektirane su najviše koncentracije  $\beta$ -sitosterola ( $81,10 \pm 0,01^e\%$ ), a najmanje kod uzorka Poreč-1 ( $69,64 \pm 0,22^b\%$ ). Razlike u detektiranim udjelima sterola u korijenu koprive posljedica su različitih lokacija njihovog sakupljanja, odnosno specifičnih vanjskih čimbenika staništa kao što su klimatski uvjeti i vrsta tla te način ekstrakcije. U uzorku sabal palme udio  $\beta$ -sitosterola bio je  $54,05 \pm 0,09^a\%$ , a kod vrbovice  $68,28 \pm 0,86^b\%$ , što je nešto manje u odnosu na uzorke koprive. Ham i sur. (2002) su u ekstraktu sabal palme detektirali 59,4%  $\beta$ -sitosterola. Müller i Bracher (2015) određivali su sastav fitosterola u medicinskim preparatima korištenim u liječenju BHP (bučine sjemenke, sabal palma i kopriva) te su također utvrdili kvantitativnu dominaciju  $\beta$ -sitosterola u istraživanim uzorcima. Horník i sur. (2013) određivali su HPLC-NMR metodom  $\beta$ -sitosterol u korijenu koprive, te su detektirali 81% istog fitosterola u uzorku. Prethodna istraživanja pokazala su da  $\beta$ -sitosterol i njegovi analozi imaju veliki potencijal u liječenju mnogih bolesti kao što je BHP i povišeni kolesterol. Osim toga pokazuje destruktivno djelovanje na tripanosome i larve, a koristi se i kao agens za neutralizaciju otrova zmija (Saeidnia i sur., 2014).

Kampesterol je drugi fitosterol po zastupljenosti u istraživanim uzorcima, a najveća koncentracije detektirana je u ekstraktu sabal palme ( $17,46 \pm 0,02^f\%$ ). Korijen koprive također sadrži kampesterol u znatnoj količini. Najviši udio detektiran je kod uzorka Bale-3 ( $14,04 \pm 0,00^e\%$ ), a najmanji kod uzorka Poreč-1 ( $11,23 \pm 0,02^b\%$ ). Kod lista vrbovice, prisutnost kampesterola je znatno manja ( $2,72 \pm 0,05^a\%$ ) u odnosu na koprivu i sabal palmu.

Ostali fitosterol, obuhvaćeni ovim istraživanjem, prisutni su u znatno manjim koncentracijama u uzorcima, u odnosu na kampesterol i  $\beta$ -sitosterol. Kampestanol je prisutan u vrlo niskim koncentracijama u svim obrađenim uzorcima osim kod uzorka koprive Poreč-1 ( $11,72 \pm 0,04^d\%$ ). U ostalim uzorcima koprive detektiran je znatno manji udio kampestanola, najmanje kod uzorka

Vodnjan-4 ( $0,36 \pm 0,00^b\%$ ), a najviša izmjerena vrijednost, izuzev uzorka Poreč-1, detektirana je kod uzorka Muntrilj-5 ( $0,57 \pm 0,00^b\%$ ). Kao što je već napomenuto, varijaciju u udijelu kampestanola u korijenu koprive možemo pripisati različitim lokacijama sakupljanja korijena, odnosno različitim vanjskim uvjetima u kojima je rasla kopriva, vremenu berbe i načinu ekstrakcije. List vrbovice najsiromašniji je kampestanolom ( $0,05 \pm 0,01^a\%$ ) u odnosu na sabal palmu ( $0,86 \pm 0,16^c\%$ ) i koprivu.

Stigmasterol je najzastupljeniji u plodu sabal palme ( $7,50 \pm 0,02^f\%$ ), a najmanje u listu vrbovice ( $0,23 \pm 0,00^a\%$ ). Koncentracija stigmasterola u uzorcima korijena koprive varira od  $0,58 \pm 0,01^b\%$  u uzorku Poreč-1, do maksimalno  $2,48 \pm 0,00^e\%$  u uzorku Vodnjan-4.

$\Delta 5$ -avenasterola najviše je detektirano u plodu sabal palme ( $2,34 \pm 0,01^e\%$ ), dok je kod lista vrbovice zabilježen nešto niži udio ( $1,30 \pm 0,04^d\%$ ). Ovaj fitosterol najmanje je zastupljen u korijenu koprive i to najmanje kod uzorka Bale-3 ( $0,30 \pm 0,01^a\%$ ), a najviše kod uzorka Muntrilj-5 ( $0,59 \pm 0,00^c\%$ ).

Lanosterol je prisutan u niskim koncentracijama u korijenu koprive. Najmanji udio detektiran je u uzorku Vodnjan-4 ( $0,69 \pm 0,00^b\%$ ), a najviši u uzorku Limski zaljev-2 ( $1,64 \pm 0,00^e\%$ ). U listu vrbovice udio lanosterola je  $1,61 \pm 0,17^e\%$ , dok u plodu sabal palme njegova prisutnost nije detektirana.

Cikloartenol u najvećoj koncentraciji je prisutan u plodu sabal palme ( $8,39 \pm 0,04^g\%$ ), list vrbovice ga sadrži u nešto manjem udjelu ( $2,10 \pm 0,15^f\%$ ) dok je korijen koprive najsiromašniji ovim fitosterolom. Maksimalni udio cikloartenola u korijenu koprive zabilježen je u uzorku Limski zaljev-2 ( $1,64 \pm 0,00^e\%$ ), a najmanji u uzorku Vodnjan-4 ( $0,14 \pm 0,01^a\%$ ).

24-metilen cikloartenol prisutan je u vrlo niskim koncentracijama u korijenu koprive. Najmanji udio detektiran je u uzorku Vodnjan-4 ( $0,09 \pm 0,00^a\%$ ), najveći kod uzorka Limski zaljev-2 ( $1,03 \pm 0,00^b\%$ ). Kod lista vrbovice i ploda sabal pame, ovaj fitosterol je prisutan u nešto višoj koncentraciji, u odnosu na korijen koprive. Kod vrbovice detektiran je udio  $1,91 \pm 0,11^c\%$  24-metilen cikloartenola, a kod sabal palme  $2,87 \pm 0,12^d\%$ .

Etilkolestenol je u najvećoj koncentraciji detektiran u listu vrbovice ( $21,52 \pm 0,38^c\%$ ). Niske koncentracije ovog fitosterola detektirane su u korijenu koprive, najmanje kod uzorka Vodnjan-4

( $0,21 \pm 0,01^a\%$ ), a najviše kod uzorka Bale-3 ( $1,62 \pm 0,01^b\%$ ). Kod ploda sabal palme etilkolestenol nije detektiran.

Citrostadienol najzastupljeniji je u plodu sabal palme ( $6,53 \pm 0,21^g\%$ ). U nešto manjim koncentracijama je prisutan u uzorcima korijena koprive. U uzoraku Bale-3 detektirano je najviše ovog fitosterola ( $4,03 \pm 0,03^f\%$ ), a najmanje u uzorku Limski zaljev-2 ( $1,72 \pm 0,04^b\%$ ). Varijacije u udjelima fitosterola, u uzorcima korijena koprive, posljedica su već spomenutih čimbenika okoliša i uvjeta rasta. List vrbovice ima najmanje koncentracije citrostadienola ( $0,29 \pm 0,07^a\%$ ).

Najveći udio ukupnih sterola zabilježen je u plodu sabal palme ( $4,84 \pm 0,01^f$  g/kg). Ham i sur. (2002.) su u uzorcima ekstrakta sabal palme detektirali 1,056 do 2,768 g/kg ukupnih sterola. Razlike u vrijednostima mogu biti posljedica različitih ekstrakcijskih metoda i porijeklu ploda, vrsti tla i klimatskim uvjeta sazrijevanja ploda. List vrbovice nešto je siromašniji ukupnim sterolima ( $1,15 \pm 0,01^e$  g/kg) dok je kod korijena koprive zabilježen najmanji udio ukupnih sterola. Kod uzorka Poreč-1, detektiran je najmanji udio ukupnih sterola ( $0,62 \pm 0,00^a$  g/kg), a najveći kod uzorka Vodnjan-4 ( $0,95 \pm 0,00^d$  g/kg).

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Analizirani uzorci korijena koprive sakupljenih sa 5 lokacija na području Istre pokazali su statistički značajnu razliku u količini ukupnih i udjelu pojedinačnih sterola.
2.  $\beta$ -sitosterol najzastupljeniji je fitosterol obrađenim uzorcima. U uzorku koprive Vodnjan-4, detektirani su najveći udjeli  $\beta$ -sitosterola ( $81,10 \pm 0,01$  %). U uzorku ekstrakta sabal palme udio  $\beta$ -sitosterola bio je  $54,05 \pm 0,09$  %, a kod vrbovice  $68,28 \pm 0,86$  %.
3. Najveća koncentracija ukupnih sterola, detektirana je u ekstraktu sabal palme ( $4,84 \pm 0,01$  g/kg). Kod lista vrbovice detektirano je  $1,15 \pm 0,01$  g/kg ukupnih sterola. Kod korijena koprive, zabilježen je najmanji udio ukupnih sterola. Najniže koncentracije zabilježene su u uzorku Poreč-1 ( $0,62 \pm 0,00$  g/kg), a najveći kod uzorka Vodnjan-4 ( $0,95 \pm 0,00$  g/kg).
4. Razlika ukupnih i pojedinačnih sterola iz korijena koprive može se pripisati razlikama u vrsti tla i klimatskim uvjetima staništa.



## 6. LITERATURA

Allkanjari O., Vitalone A. (2015) What do we know about phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. *Life Sciences* **1**: 1-47.

Adamczak A., Dreger M., Seidler-Łozikowska K., Wielgus K. (2019) Fireweed (*Epilobium angustifolium* L.): botany, phytochemistry and traditional uses. *Herba Polonica* **65**: 51-63.

Asgarpanah J., Mohajerani R. (2012) Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *Journal of Medicinal Plants Research* **1**: 5714-5719.

Anonymus 1 [https://en.wikipedia.org/wiki/Urtica\\_dioica](https://en.wikipedia.org/wiki/Urtica_dioica) Pistupljeno 30. kolovoza 2020.

Anonymus 2 [https://www.palmpedia.net/wiki/Serenoa\\_repens](https://www.palmpedia.net/wiki/Serenoa_repens) Pistupljeno 30. kolovoza 2020.

Anonymus 3 [https://en.wikipedia.org/wiki/Chamaenerion\\_angustifolium](https://en.wikipedia.org/wiki/Chamaenerion_angustifolium) Pistupljeno 30. kolovoza 2020.

Anonymus 4 [https://www.researchgate.net/figure/The-core-structure-of-sterols-is-a-fused-four-ring-A-B-C-and-D-ring-Various-groups\\_fig2\\_236959412](https://www.researchgate.net/figure/The-core-structure-of-sterols-is-a-fused-four-ring-A-B-C-and-D-ring-Various-groups_fig2_236959412) Pristupljeno 3. Rujna 2020.

Baumgardner D.J. (2016) Stinging nettle: the bad, the good, the unknown. *Journal of Patient-Centered Research and Reviews* **3**: 48-53.

G. J. Benoit Gnonlonfin , A. Sanni L. Brimer (2012) Review Scopoletin – A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 47-56.

Berger A., Jones P.J.H., Abumweis S.S. (2004) Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Disease* **2004**: 3-5.

Berges R.R., Windeler J., Trampisch H.J., Senge T. (1995) Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. Beta-sitosterol Study Group. *Lancet* **345**: 1529-1532.

Berges R.R., Kassen A., Senge T. (2000) Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with beta-sitosterol: an 18-month follow-up. *BJU International* **85**: 842-6.

Buchwald W., Kozłowski J., Szczyglewska D., Foryck A. (2006) Biology of germination of medicinal plant seeds. Part XXII: Seeds of *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop. from *Oenotheraceae* family. *Herba polonica* **52**: 17-20.

Cantrill R. (2008) Phytosterols, phytostanols and their esters. *Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation ACP-EU* **1**: 1-13.

De Stefani E., Boffetta P., Ronco A.L., Brennan P., Deneo-Pellegrini H., Carzoglio J.C. (2000) Plant sterols and risk of stomach cancer: A case-control study in Uruguay. *Nutrition and Cancer* **37**: 140–144.

EFSA (2009) Plant Stanols and Plant Sterols and Blood LDL-Cholesterol. *The EFSA Journal* **1175**: 1-9.

FDA (2010) Food Labeling; Health Claim; Phytosterols and Risk of Coronary Heart Disease <https://www.federalregister.gov> Pristupljeno 10. Srpnja 2020.

Ham B., Jolly S., Triche G., Williams P., Wallace F. (2002) A Study of The Physical and Chemical Properties of Saw Palmetto Berry Extract. <http://preprint.chemweb.com/biochem/0202001> Pristupljeno 10. Srpnja 2020.

HRN EN ISO 12228-1:2004, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola-Metoda plinske kromatografije.

Hryb D.J., Khan M.S., Romas N.A., Rosner W. (1995) The effect of extracts of the roots of the stinging nettle (*Urtica dioica*) on the interaction of SHBG with its receptor on human prostatic membranes. *Planta Medica* **61**: 31-32.

Horník Š., Sajfrtová M., Karban J., Sýkora J., Blezinová A., Wimmer Z. (2013) LC-NMR technique in the analysis of phytosterols in natural extracts. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **526818**: 1-7.

Hirano T., Homma M., Oka K. (1994) Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Medica* **60**:30-33.

Kristal A.R., Arnold K.B., Schenk J.M., Neuhouser M.L., Goodman P., Penson D.F., Thompson I.M. (2008) Dietary patterns, supplement use, and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. *American Journal of Epidemiology* **167**: 925-934.

Kraus R., Spittleer G., Bartsch W. (1991) (10-E, 12Z)-9-hydroxy-10,12-octadecadienic acid, an aromataseinhibiting substance from the root extract of *Urtica dioica*. *Liebigs Annalen* **19**:335-339.

Leung A.Y., Foster S. (1996) Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs and Cosmetics, 2. izd. New York, John Wiley & Sons, Inc. Str. 561-563.

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**: 613–620.

Mendilaharsu M., Stefani E.D., Deneo-Pellegrini H., Carzoglio J., Ronco A. (1998) Phytosterols and risk of lung cancer: a case-control study in Uruguay. *Lung Cancer* **21**: 37–45.

McCann S.E., Freudenheim J.L., Marshall J.R., Graham S. (2003) Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *Journal of Nutrition* **133**: 1937–1942.

Miettinen T.A., Vanhanen H. (1994) Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis* **105**: 217-226.

Normen A.L., Brants H.A., Voorrips L.E., Andersson H.A., van den Brandt P.A., Goldbohm R.A. (2001) Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands cohort study on diet and cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**: 141–148.

Ogbe R.J., Ochalefu D.O., Mafulul S.G., Olaniru O.B. (2015) A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian Journal of Plant Science and Research* **5**: 10-21.

Patterson C.A. (2006) Phytosterols and stanols. *Agriculture and Agri-Food Canada*: 1-4.

Rogers D.R. (2014) Fireweed – a treasured medicine of the boreal forest. *Discovery Phytomedicine* **1**: 10-15.

Saeidnia S., Manayi A., Gohari A., Abdollahi M. (2014) The Story of Beta-sitosterol. *European Journal of Medicinal Plants* **4**: 590-609.

Schottner M., Gansser D., Spiteller G. (1997) Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human sex hormone binding globulin (SHBG). *Planta Medica* **63**: 529-532.

Said A.H., Sbai el Otmani I., Derfoufi S., Benmoussa A. (2015) Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica dioica*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **10**: 8-14.

StatSoft, Inc. (2007) STATISTICA, version 8, Tulsa, SAD

Woyengo T.A., Ramprasath V.R., Jones P.J.H. (2009) Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition* **63**: 813–820.

Wilt T.J., Macdonald R., Ishani A. (1999) Betasitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *BJU International* **83**: 976-83.

Wagner H., Geiger W.N., Boos G., Samtleben R. (1995) Studies on the binding of *Urtica dioica* agglutinin (UDA) and other lectins in an in vitro epidermal growth factor receptor test. *Phytomedicine* **2**: 287-290.

Wilt T.J., Ishani A., Rutks I., MacDonald R. (2000) Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Public Health Nutrition* **3**: 459-472.

## 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.*

*Eme Ritoša*

---