

Ispitivanje primjene cvijeta odabranih predstavnika porodice Orchidaceae kao kiselo-baznog indikatora

Ištvanović, Adriana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:231446>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Adriana Ištvanović

**Ispitivanje primjene cvijeta odabranih predstavnika porodice Orchidaceae kao
kiselobaznog indikatora**

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2023. godina

Sažetak

Rod *Phalaenopsis* jedan je od najrasprostranjenijih i najduže cvjetajućih rodova porodice Orchidaceae. Osim lijepog izgleda, latice ovoga cvijeta možda bi mogle poslužiti i kao pH indikatori. Određivanje pH vrijednosti provodi se pomoću opće poznatih konvencionalnih kiselobaznih indikatora, ali u istu svrhu mogu se koristiti i neki biljni materijali. To je moguće zbog prisutnosti raznih pigmenata, poput antocijanina i karotenoida, koji mijenjaju boju ovisno o pH vrijednosti. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene cvijeta odabranih predstavnika porodice Orchidaceae kao kiselobaznog indikatora. U tu svrhu korištene su svježe latice *Phalaenopsis* orhideja u kombinaciji s različitim otapalima (voda, aceton, etanol i metanol). Istraživanjem je utvrđeno da se većina ispitanih latica *Phalaenopsis* orhideja može koristiti kao alternativni kiselobazni indikator. Neki od ispitanih uzoraka dali su dobre rezultate samo u bazičnom mediju, a neki u cijelom pH spektru.

Ključne riječi: Orchidaceae, *Phalaenopsis*, kiselobazni indikatori, pigmenti, otapala

Abstract

The genus *Phalaenopsis* is one of the most widespread and longest flowering genera of the Orchidaceae family. In addition to their beauty, the petals of this flower could be used as pH indicators. The determination of pH is carried out using commonly known conventional acid-base indicators, but some plant materials may also be used for the same purpose. This is possible due to the presence of various pigments, such as anthocyanins and carotenoids, that change colour depending on the pH value. The aim of this work was to investigate the possibility of using flowers of selected representatives of the Orchidaceae family as an acid-base indicator. For this purpose, fresh *Phalaenopsis* orchid petals were used in combination with different solvents (water, acetone, ethanol and methanol). The research found that most of the examined *Phalaenopsis* orchid petals can be used as an alternative acid-base indicator. Some give good result only in the alkaline medium, and some in the entire pH spectrum.

Key words: Orchidaceae, *Phalaenopsis*, acid-base indicators, pigments, solvents

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Porodica Orchidaceae	2
2.1.2. Rod Phalaenopsis	6
2.2. Konvencionalni kiselo-bazni indikatori	9
2.3. Alternativni kiselo-bazni indikatori	14
2.3.1. Pigmenti orhideja	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Korišteni biljni materijal, kemikalije i pribor	24
3.2. Priprema otopina, plan rada i postupak	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Indikator pripremljen s vodom	26
4.2. Indikator pripremljen s acetonom	29
4.3. Indikator pripremljen s etanolom	32
4.4. Indikator pripremljen s metanolom	35
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATurna VRELA	40

1. UVOD

Orhideje, porodica Orchidaceae, jedna je od najvećih i najraznovrsnijih porodica cvjetnica, s preko 800 opisanih rodova i 25 000 vrsta. Nalaze se na svim kontinentima, osim Antarktike. Većina se nalazi u tropskim područjima Azije te Južne i Srednje Amerike, a neke se čak nalaze iznad Arktičkog kruga. Orhideje su poznate po svojoj ljepoti a uzgoj orhideja popularan je hobi diljem svijeta ali i važna industrija (na primjer, vanilija koja se koristi u prehrambenoj industriji, industriji pića i kozmetičkoj industriji). Rod *Phalaenopsis*, poznat kao „noćni leptir“ ili „moljac orhideje“, jedan je od najduže cvjetajućih rodova orhideja, čiji cvjetovi traju od dva do šest mjeseci. *Phalaenopsis* orhideje cvjetaju dva do tri puta godišnje a cvjetovi mogu biti raznih boja i izgledom podsjećaju na krila leptira po čemu je ovaj rod i dobio naziv (grč. *phalaina*, noćni leptir, i *opsis*, nalik) [1, 2].

Kiselo-bazni indikatori su spojevi koji mijenjaju boju u otopini u ovisnosti o pH vrijednosti okoline. Osim konvencionalnih indikatora, bitnu primjenu imaju i alternativni indikatori. Na primjer, biljke poput crvenog kupusa, ruža i borovnica sadrže antocijanine koji se ponašaju kao pH indikator. Biljna pigmentacija uključuje tri glavne skupine pigmenata, a to su antocijanini, karotenoidi i klorofili. Klorofili su odgovorni za zelenu boju, antocijanini za crvenu, ljubičastu i plavu boju, a karotenoidi za žutu, narančastu i crvenu boju. Prekrasne i upečatljive boje cvijeća uglavnom su rezultat kombinacije raznih pigmenata koji se razvijaju u laticama [3, 4].

U prvom dijelu rada navedene su neke općenite značajke porodice Orchidaceae i roda *Phalaenopsis*. Također su nabrojani i opisani najpoznatiji kiselo-bazni konvencionalni i alternativni pH indikatori te pigmenti prisutni u orhidejama. U drugom dijelu rada opisani su korišteni biljni materijal, kemikalije i pribor, priprema otopina i plan ispitivanja. Rezultati su prikazani slikama te su opisane i raspravljene promjene boja pri različitim pH vrijednostima. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su bijela, žuta orhideja i žuta orhideja s roza pjegicama dobar pH indikator u bazičnom mediju, dok su se ljubičasta, roza, bijela s ljubičastim pjegicama i bijela orhideja s ljubičastim i žutim pjegicama pokazale kao dobar indikator u izrazito kiselom i izrazito bazičnom mediju. U većini slučajeva iste orhideje u različitim otapalima dale su slične rezultate, s manjim odstupanjima u intenzitetu obojenja.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Porodica Orchidaceae

Kaćunovke ili orhideje, Orchidaceae, čine jednu od najvećih porodica angiospermi, odnosno kritosjemenjača. Pripadaju carstvu biljaka, koljenu kritosjemenjača i razredu jednosupnica. One su jedna od ekološki i evolucijski najznačajnijih skupina biljaka i uspješno su kolonizirale gotovo sva staništa na Zemlji. S procijenjenih više od 25 000 vrsta, orhideje su najbogatija porodica angiospermi. Ova porodica se sastoji od kopnenih ili epifitskih, višegodišnjih (rijetko jednogodišnjih) biljaka. Prema istraživanju Ramirez i sur. (2007), zadnji zajednički predak postojećih orhideja živio je u kasnoj kredi kako je datirano prema fosilu orhideje i njezinu oprašivaču [5, 6].

S ogromnim brojem vrsta Orchidaceae povezana je izvanredna cvjetna raznolikost, predstavljaju vrlo naprednu i završnu liniju cvjetne evolucije jednosupnica. Ta različitost povezana je sa specifičnom interakcijom između cvijeta orhideje i oprašivača. Orhideje imaju nekoliko jedinstvenih reproduktivnih strategija koje pridonose njihovom uspjehu. To uključuje zrela peludna zrnca upakirana kao polinije, razvoj jajnika/jajnih stanica reguliran oprašivanjem, sinkronizirano vrijeme mikro- i mega-gametogeneze za učinkovitu oplodnju i oslobađanje tisuća ili milijuna nezrelih embrija (sjemenki bez endosperma) u zrelih mahunama [5].

Sve orhideje su višegodišnje zeljaste biljke koje nemaju trajnu drvenastu strukturu, a ulogu korijena ima gomolj (kod kopnenih vrsta) ili postoji zračno korijenje (kod epifitskih vrsta) [7]. Kopnene orhideje mogu biti rizomske, tvoreći gomolje koji djeluju kao skladišni organi za hranu i vodu. Veliki broj orhideja su epifiti, kojima nije potrebno tlo, nego koriste drveće kao potporu. Takve orhideje imaju modificirano zračno korijenje (Slika 1.). U starijim dijelovima korijena imaju epidermis koji je modificiran u spužvasti velamen koji upija vodu, a može biti srebrno-sive, bijele ili smeđe boje. Stanice epidermisa korijena rastu pod pravim kutom prema osi korijena, što orhidejama omogućava da se čvrsto uhvate za potporu. Takvo korijenje može biti dugo i nekoliko metara kako bi upilo što više vlage [8].



Slika 1. Zračno korijenje orhideje [9].

Stabljike su rizomske ili kormozne kod kopnenih vrsta, dok se u epifitskih vrsta govori o pseudobulbama (Slika 2.) [2]. Stabljika orhideje određuje gdje će orhideja obitavati, a može rasti na dva načina, monopodijalno i simpodijalno. Kod monopodijalnog rasta novi izdanci rastu prema gore iz jedne stabljike koja potječe od pupa starih izdanaka, zatim stvaraju listove i cvjetove duž stabljike. Stabljika takvih orhideja može narasti do nekoliko metara. Simpodijalni rast znači da biljka proizvodi niz susjednih izdanaka koji narastu do određene veličine, cvjetaju, a onda prestanu rasti i zamjenjuje ih novi rast. Ovakve biljke rastu bočno, a ne okomito, slijedeći površinu svoje potpore. Baza stabljike simpodijalnih epifita (kod nekih vrsta cijela stabljika) može biti zadebljana i tvoriti pseudobulbe. One sadrže vodu i hranjive tvari za sušnija razdoblja te imaju glatku površinu s uzdužnim brazdama. Obično ostaju žive pet do šest godina [8].



Slika 2. Stabljika orhideje [10].

Listovi su spiralni, distihozni ili kovrčasti, obično omotasti, jednostavni i s paralelnim žilama (Slika 3.) [2]. Njihov oblik je vrlo različit među vrstama, pa veličina i

oblik lista mogu pomoći u identifikaciji orhideja. Listovi mogu biti veliki ili sitni, a mogu i ne postojati, kao kod vrste *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe, koja za fotosintezu ovisi o zračnom korijenju koje sadrži klorofil. Struktura lista odgovara specifičnom staništu orhideje. Vrste koje su na Suncu većinu vremena ili rastu na mjestima koja su povremeno suha imaju debele kožnate listove, a lamine su prekrivene voštanom kutikulom koja zadržava vodu. S druge strane, vrste koje rastu u sjeni imaju duge, tanke listove. Takve vrste ne podnose pad atmosferske vlage i izlaganje izravnoj Sunčevoj svjetlosti. Između ove dvije navedene krajnosti postoji niz srednjih oblika. Listovi većine orhideja žive nekoliko godina. Neke vrste svake godine odbacuju stare listove nakon čega izrastu novi [8].



Slika 3. Listovi orhideje [11].

Cvat je grozd, metlica, klas ili pojedinačni cvijet. Cvjetovi su dvospolni, rijetko jednospolni, zigomorfni, obično resupinirani, što rezultira pomakom cvjetnih dijelova za 180 ° (Slika 4.) [2]. Orhideje su ljudima najpoznatije zbog raznolikosti i ljepote njihovih cvjetova. Nijedna porodica nema toliko različitih vrsta cvijeta kao porodica orhideja. Strukturne varijacije cvjetova potiču oprašivanje određenim vrstama kukaca, šišmiša ili ptica. Većina afričkih orhideja su bijele, dok su azijske orhideje većinom višebojne. Neke orhideje imaju samo jedan cvijet na stabljici, a neke imaju više od stotinu cvjetova na jednom klasu. Osnovni cvijet orhideje sastoji se od tri latice u vanjskom kolutu i tri latice u unutarnjem kolutu. Središnja latica (naziva se usna ili labellum) kod orhideja je modificirana i povećana te ona tvori platformu za oprašivače. Sepale čine vanjski dio pupoljka, one su većinom zelene u toj fazi, ali ponekad, ako je cvijet orhideje npr. ljubičast, pupoljak može imati ljubičastu nijansu. Kada se cvijet otvori, sepale postaju intenzivno obojane [8].



Slika 4. Cvjetovi orhideje [12].

Plod je lokulicidna čahura ili rjeđe bobica. Sjemenke su često s opnastim krilima, zbog raspršivanja vjetrom. Oprašivanje vrše različiti kukci (često jedna vrsta ima specifičnu povezanost s jednom vrstom orhideja), ptice, šišmiši ili žabe. Neke vrste imaju izvanredne prilagodbe za oprašivanje. Među značajnijima je nekoliko vrsta s vizualnom i kemijskom mimikom, koja zavarava muškog kukca da cvijet doživi kao potencijalnog partnera (Slika 5.) [7].



Slika 5. Oprašivanje orhideje [13].

Porodica Orchidaceae se sastoji od pet podporodica, a to su Apostasioideae (2-3 prašnika), Cypripedioideae (2 prašnika) i ostale orhideje: Epidendroideae, Orchidoideae i Vanilloideae (1 prašnik). Članovi ove porodice rasprostranjeni su po cijelom svijetu. Ekonomska važnost uglavnom je rezultat uzgojenih ukrasnih vrsta orhideja, uključujući neke vrlo skupocjene. Tajvan je jedno od svjetskih središta uzgoja i hibridizacije orhideja, a izvrsna kvaliteta tajvanskih hibrida orhideja privukla je potrošače diljem svijeta. Neke od najpopularnijih cvjetnica u lončanicama na hortikulturnom tržištu su hibridi roda *Phalaenopsis* [5].

U flori Hrvatske poznato je 129 vrsta orhideja, što Hrvatsku svrstava među prvih pet europskih zemalja s najvećom zastupljenošću orhideja. Autohtone orhideje u Hrvatskoj ne rastu tijekom cijele godine, nego sezonski (kada imaju povoljne uvjete za rast), a njihov cijeli životni ciklus se odvija na ili u kopnu (terestričke biljke). Dio godine kada ne rastu, za preživljavanje se oslanjaju na podzemne organe. Neki od rodova autohtonih orhideja su: *Anacamptis* (vratizelja), *Cephalanthera* (naglavica), *Cypripedium* (gospina papučica), *Dactylorhiza* (kaćunak), *Epipactis* (kruščika), *Gymnadenia* (vranjak), *Himantoglossum* (kozonoška), *Limodorum* (šiljorep), *Listera* (čopotac), *Neottia* (kokoška), *Ophrys* (kokica), *Spiranthes* (zasukica) i *Orchis* (kaćuni) [14].

Rod *Orchis* (kaćuni) je jedan od najbrojnijih rodova u Europi. Poznato je više od trideset vrsta, od kojih u Hrvatskoj uspijeva šesnaest vrsta (s velikim brojem podvrsta), a deset vrsta je ugroženo. Porodica Orchidaceae je dobila ime upravo po rodu *Orchis*. Riječ *orchis* (grč., testisi) u nazivu ovih biljaka prvi je put upotrijebio starogrčki filozof Teofrast u knjizi „*De historia plantarum*“, pretpostavlja se zbog dva gomolja koje imaju neke vrste roda *Orchis*. Kaćuni imaju cjelovit gomolj, uspravnu stabljiku s listovima koji su naizmjenično raspoređeni. Rastu na travnjacima, čistinama i svijetlim šumama, a cvatu od svibnja do kolovoza. Cvjetovi mogu biti različitih boja od žute, narančaste, tamnocrvene, bijele do ljubičaste i većinom su skupljeni u klas [14].

2.1.2. Rod *Phalaenopsis*

Rod *Phalaenopsis* pripada porodici Orchidaceae, podporodici Epidendroideae, plemenu Vandaeae i podplemenu Aeridinae (Tablica 1.). Prirodno je rasprostranjen od Indije, preko jugoistočne Azije do Filipina, Nove Gvineje i Australije. Pripadnici roda su epifiti na drveću, uglavnom u sjeni i u blizini vode, a neke vrste mogu rasti i kao litofiti [15].

Tablica 1. Sistematska klasifikacija roda Phalaenopsis [14].

carstvo	Plantae
koljeno	Magnoliophyta
razred	Liliopsida
red	Orchidales
porodica	Orchidaceae
potporodica	Epidendroideae
pleme	Vandae
potpleme	Aeridinae
rod	Phalaenopsis

Biljke roda Phalaenopsis imaju kratku stabljiku obično s tri do šest listova. Lisne plojke obično su više dugačke nego široke, prošarane su purpurnom donjom površinom ili svijetlo do tamno zelenom bojom i obično su mesnate i kožaste (Slika 6.) [15].



Slika 6. Listovi orhideje Phalaenopsis [16].

Cvjetovi su zaokrenuti za 180 °, variraju u veličini i obično su mesnati i voštani. Cvjetovi su ružičasti, ljubičasti, bijeli, smeđi, žuti ili crveni, a najkompleksniju i jedinstvenu strukturu ima labellum cvijeta (Slika 7., označeno strelicom) [15].



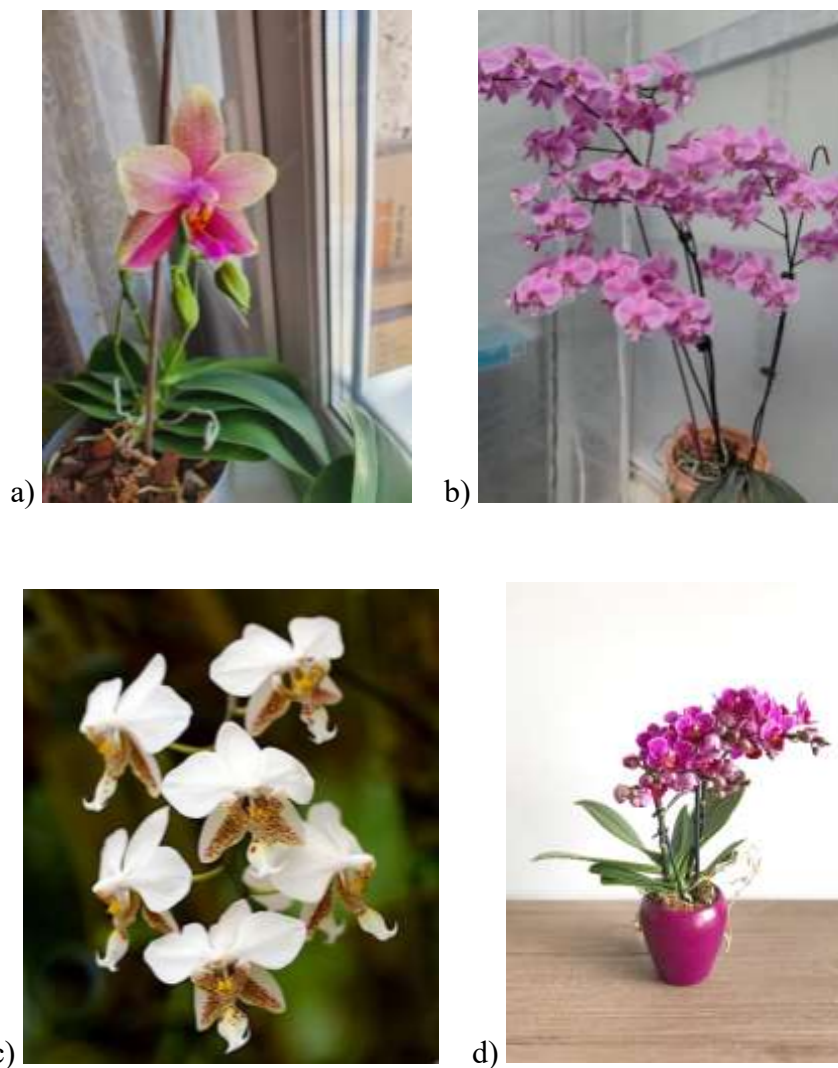
Slika 7. Labellum orhideje Phalaenopsis [17].

Phalaenopsis orhideje je moguće uzgajati u zatvorenom prostoru i pri odgovarajućim uvjetima će cvjetati mjesecima. Ove orhideje rastu na deblima i granama u tropskom okruženju, stoga je najbolje oponašati slične uvjete. Za uspješan rast potrebno je pronaći ravnotežu između vlage, temperature, svjetlosti i protoka zraka [18].

Za uzgoj Phalaenopsis orhideja potrebno je dobro osvjetljenje, ali izravna Sunčeva svjetlost će spržiti listove. Međutim, tijekom zime orhideja se može staviti na prozor okrenut prema jugu ili istoku koji ima izravnu svjetlost. Orhideju je potrebno s vremena na vrijeme okrenuti kako bi mogla ravnomjerno rasti. Biljka s odgovarajućom rasvjetom imat će svijetlo zelene listove. Premalo svjetla rezultirat će tamno zelenim listovima, a previše svjetla uzrokovat će pojavu ružičaste ili crvenkaste nijanse duž rubova listova, koja će na kraju požutjeti [18].

Phalaenopsis preferira temperature između 24 i 29 °C, ali mogu se prilagoditi uobičajenim sobnim temperaturama. Što je viša temperatura, veća je potreba biljke za vlagom, a što su veća vlaga i temperatura, veća je potreba za turbulentnim strujanjem zraka kako bi se spriječilo truljenje, gljivice i bolesti. Orhideje također vole kontrastne noćne i dnevne temperature. Phalaenopsis su monopodijalne orhideje, nemaju velike pseudobulbe pa slabije podnose sušu [18].

Postoji oko 60 vrsta Phalaenopsis orhideja, ali su ove biljke opsežno hibridizirane i postoje na tisuće hibrida. Neke od vrsta su *Phalaenopsis Deventeriana* × *Phalaenopsis violacea* „Liodoro“ (hibrid, Slika 8. a)), *P. schilleriana* Rchb.f. (Slika 8. b)), *P. stuartiana* Rchb.f. (Slika 8. c)) i mini *Phalaenopsis sp.* (Slika 8. d)) [18].



Slika 8. a) *Phalaenopsis Deventeriana* × *Phalaenopsis violaceae* „Liodoro“ [19], b) *P. schilleriana* Rchb.f. [20], c) *P. stuartiana* Rchb.f. [21] i d) mini *Phalaenopsis* sp. [22].

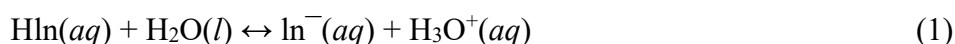
2.2. Konvencionalni kiselo-bazni indikatori

U kemiji se mnoge tvari otapaju u vodi i čine ju kiselom ili bazičnom. Bazična otopina ima $\text{pH} > 7$, dok kisela otopina ima $\text{pH} < 7$. Vodene otopine s $\text{pH} = 7$ smatraju se neutralnima. Kiselo-bazni indikatori su tvari koje se koriste za određivanje pH vrijednosti otopina. Možda je najpoznatiji pH indikator lakmus papir, a neki od uobičajenih su timol plavo, fenol crveno i metiloranž. Najčešće korišteni konvencionalni indikatori su prikazani u Tablici 2. [23].

Tablica 2. Odabrani pH indikatori i njihove karakteristike [23].

indikator	boja u kiselom	boja u bazičnom	pH raspon	pK _{ln}
timol plavo (prva promjena)	crvena	žuta	1,2-2,8	1,5
metiloranž	crvena	žuta	3,2-4,4	3,7
bromkrezol zeleno	žuta	plava	3,8-5,4	4,7
metilno crvenilo	žuta	crvena	4,8-6,0	5,1
bromtimol plavo	žuta	plava	6,0-7,6	7,0
enol crveno	žuta	crvena	6,8-8,4	7,9
timol plavo (druga promjena)	žuta	plava	8,0-9,6	8,9
fenolftalein	bezbojna	magenta	8,2-10,0	9,4

Ako je indikator slaba kiselina, tada su kiselina i njena konjugirana baza različite boje. Ako je indikator slaba baza, onda baza i njezina konjugirana kiselina imaju različite boje. Za indikator koji je slaba kiselina, opće formule HIn, ravnoteža se postiže u otopini prema jednadžbi (1):



Kao što je već rečeno, HIn je kiselina, koja je različite boje od baze In⁻. Kada je pH nizak, koncentracija hidronijevog iona (H₃O⁺) je visoka, a ravnoteža je pomaknuta ulijevo pa nastaje boja specifična za takvu sredinu. Pri visokom pH, koncentracija H₃O⁺ je niska, pa ravnoteža teži desnoj strani jednadžbe (1) što rezultira pojavom druge boje [22].

Primjer indikatora koji je slaba kiselina je fenolftalein, koji je u formi slabe kiseline bezbojan, ali disocira u vodi i formira magenta ili crveno-ljubičasti anion. U kiseloj otopini ravnoteža je pomaknuta ulijevo pa je otopina bezbojna (premala koncentracija magenta

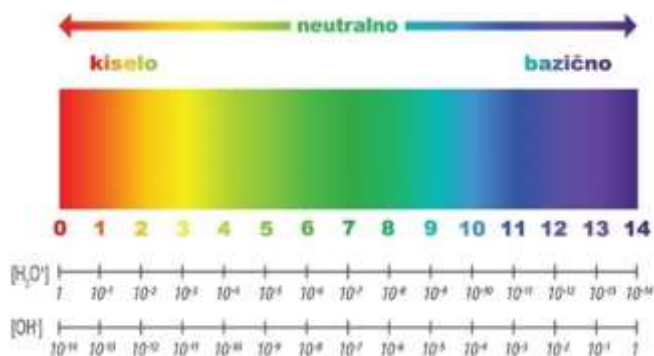
aniona da bi bila vidljiva), ali kako se pH povećava, ravnoteža se pomiče udesno i vidljiva je magenta boja [23].

Konstanta ravnoteže može se odrediti pomoću jednadžbe (2):

$$K_{In} = \frac{[H_3O^+][In^-]}{[HIn]} \quad (2)$$

gdje je K_{In} konstanta disocijacije indikatora, a promjena boje događa se na mjestu gdje su koncentracije kiseline i anionske baze jednake (što je točka u kojoj je polovica indikatora u obliku kiseline, a druga polovica je njezina konjugirana baza) [23].

Posebna vrsta kiselo-baznog indikatora je univerzalni indikator, koji je mješavina više indikatora koji postupno mijenjaju boju u širokom pH rasponu (Slika 9.). Indikatori su odabrani tako da se miješanjem nekoliko kapi s otopinom dobije boja koja se može povezati s odgovarajućom pH vrijednošću [23].



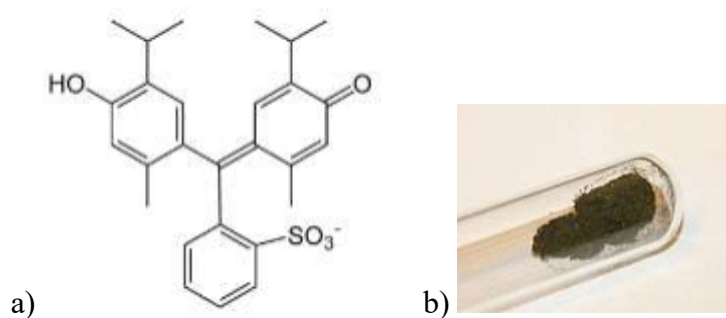
Slika 9. Ljestvica pH vrijednosti i boja univerzalnog indikatora pri određenom pH [24].

Lakmus papir je papir koji je tretiran mješavinom (10-15) prirodnih boja dobivenih iz lišajeva (uglavnom *Rocella tinctoria* DC.). Za izvođenje testa stavi se kap tekućeg uzorka na malu traku papira ili se umoči komadić lakmus papira u uzorak. Plavi papir mijenja boju u crvenu, što ukazuje na kiselost (Slika 10.). Crveni lakmus papir može pokazati bazičnost medija promjenom boje u plavu. Općenito, lakmus papir je crven ispod pH 4,5 i plav iznad pH 8,3. Ako papir postane ljubičast, znači da je pH približno neutralan [25].



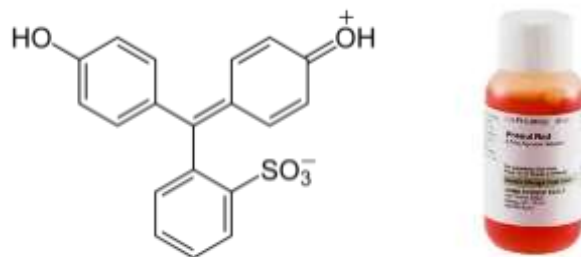
Slika 10. Promjena boje lakmus papira u kiselini [26].

Timol plavo (timolsulfonftalein), $C_{27}H_{30}O_5S$ (Slika 11. a)), je kristalni prah smeđe-zelene ili crvenkasto-smeđe boje (Slika 11. b)). Nije topljiv u vodi, ali je topljiv u alkoholu i razrijeđenim otopinama lužina. Mijenja boju iz crvene u žutu pri $pH = 1,2-2,8$ i iz žute u plavu pri $pH = 8,0-9,6$. Sastavni je dio univerzalnog indikatora [27].



Slika 11. a) Struktura indikatora timol plavo [28] i b) prah timol plavog [29].

Fenol crveno (fenolsulfonftalein), $C_{19}H_{14}O_5S$ (Slika 12.), je boja koja je topljiva u vodi, koja mijenja boju iz žute u crvenu pri $pH = 6,6-8,0$, a zatim postaje jako ružičasta iznad $pH = 8,1$. Zbog svojih svojstava, fenol crveno može se koristiti kao pH indikator u raznim medicinskim i biološkim testovima. Biolozi koriste fenol crveno u kulturama stanica, a koristi i u rashladnim tekućinama za automobile. Nedavno je otkriveno da fenol crveno može oponašati estrogen i da se može koristiti u procesu *in vitro* oplodnje [30].



Slika 12. Struktura indikatora [31] i sama bočica fenol crvenog [32].

Metiloranž, ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$) (Slika 13. a)), je jedan od najčešćih indikatora u analitičkoj kemiji (Slika 13. b)). Njegov pK_a iznosi 3,47 (pri 25 °C), a efektivni pH raspon kao indikatora u vodenim otopinama je $\text{pH} = 3,1-4,4$. Postupna promjena boje učinkovita je samo u vodenim kiselim otopinama, izvan raspona je nemoguće znati je li otopina još uvijek kisela, neutralna ili bazična. Kada se kiselost otopine smanji, ovaj indikator mijenja boju iz crvene u narančastu i na kraju u žutu, kako otopina postaje kiselija, vrijedi obrnuto (Slika 13. c)) [33].



Slika 13. Struktura [34], b) bočica [35] i c) promjena boje metiloranža u kiselom (lijevo) i bazičnom mediju (desno) [36].

Već spomenuti fenolftalein, ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$), organski spoj iz obitelji ftaleina. Kao indikator pH otopine, fenolftalein je bezbojan ispod $\text{pH} = 8,5$ i poprima ružičastu do duboko crvenu nijansu iznad $\text{pH} = 9,0$ (Slika 14.). Fenolftalein je snažan laksativ, koji djeluje unutar 6-8 sati, a njegovi učinci mogu trajati 3-4 dana. Otkrio ga je 1871. godine njemački kemičar Adolf von Baeyer, koji ga je sintetizirao spajanjem fenola i ftalnog anhidrida u prisutnosti sumporne kiseline ili cinkovog klorida, postupak koji se još uvijek koristi [37].



Slika 14. Promjena boje fenolftaleina u kiselom (lijevo) i bazičnom mediju (desno) [38].

2.3. Alternativni kiselo-bazni indikatori

Brojne biljke, ali i neke kućanske potrepštine (npr. soda bikarbona), mogu se koristiti kao pH indikatori budući da pokazuju različitu boju pri različitim pH vrijednostima. Na primjer, sok od višnje može biti crven (pH = 2,5), narančast (pH = 4,5), smeđi (pH = 7) ili zelen (pH = 10). Ruže, šljive, grožđe, vino, sok od cikle, curry prah, latice geranijuma,, čaj, kurkuma i crveni kupus samo su neki od primjera prirodnih kiselo-baznih indikatora. Naime, boja čaja potamni u bazičnoj otopini, ali postane svjetlija kada se u čaj stavi sok od limuna, odnosno neka kiselina (Slika 15.). Sok crvenog kupusa je zelen i žut u bazičnoj otopini, ali postaje crven u kiseljoj otopini, a u neutralnom je ljubičast [39].

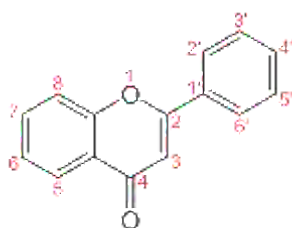


Slika 15. Promjena boje čaja kada se doda sok od limuna [40].

Gotovo svako jako obojano voće, povrće ili latice cvijeta može se koristiti kao kiselo-bazni indikator. Za prirodne boje odgovorni su različiti spojevi, kao na primjer flavonoidi, flavonoli, antocijanini, i dr. Među njima su najbitniji antocijanini i flavoni [39].

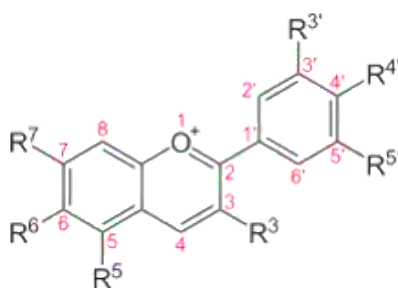
Flavoni su topljivi u vodi i alkoholu, mogu se ekstrahirati usitnjavanjem biljnog materijala, namakanjem u vrućoj vodi nekoliko minuta ili trljanjem alkoholom. To su žuti pigmenti iz skupine flavonoida koji se u biljkama pojavljuju u slobodnom stanju, kao

glikozidi ili povezani s taninima. Glavno svojstvo flavonoida je venoaktivnost, tj. njihova sposobnost da smanje propusnost kapilara i krhkost u životinjskom modelu. Oni mogu smanjiti znakove eksperimentalnog nedostatka vitamina C, zbog toga svojstva su prvo bili nazvani „vitamin P“, ali budući da flavoni nisu vitamini (nedostatak flavonoida ne uzrokuje nikakav poseban sindrom), kasnije su ih nazvali „vitamin P faktor“. Kod većine flavona pozicije 5 i 7 su hidroksilirane, također su jedna ili više pozicija 3', 4', 5' hidroksilirane, a daljnje pozicije 3' i 5' su često metilirane (Slika 16.) [39].



Slika 16. Osnovna struktura flavona [41].

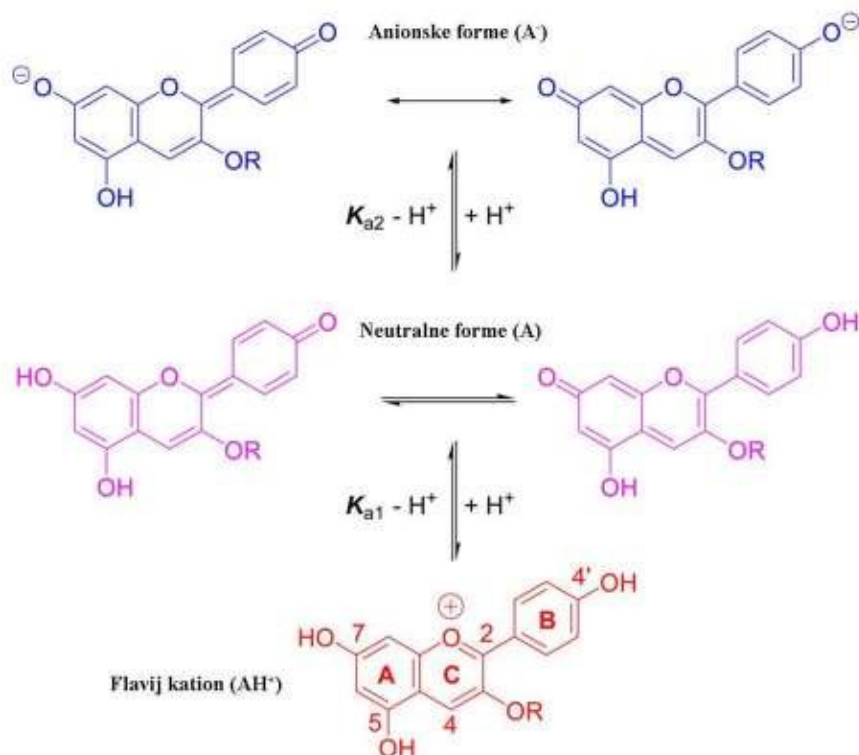
Drugi pigmenti prisutni u biljkama su antocijanini. Ovi pigmenti su topljivi u vodi i odgovorni su za boje cvijeća, listova i voća, a deriviraju se iz antocijanidina. Antocijanini su glikozidi i njihovi aglikoni, tj. pigmenti bez šećera poznati su kao antocijanidini. Antocijanini posjeduju isti ugljikov kostur i razlikuju se samo po prirodi supstituentskih skupina (Slika 17.) [39].



Slika 17. Osnovna struktura antocijanina [42].

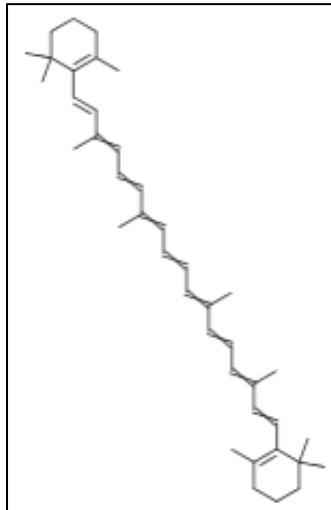
Uloge antocijanina u biljkama su brojne, kao na primjer povećanje osmotskog tlaka, privlačenje insekata i pomoć u oprašivanju, sudjeluju u fotosintezi, i dr. Antocijanini su nestabilni i lako podložni razgradnji. Na njihovu stabilnost utječu npr. pH, temperatura, enzimi, svjetlost, kisik i prisutnost nekih drugih spojeva [38]. Na stabilnost antocijanina

također utječe β -prsten u strukturi antocijanina i prisutnost hidroksilnih i metoksilnih skupina. U kiselom mediju, neki od antocijanina daju crvenu boju, u neutralnom daju ljubičastu nijansu, dok se povećanjem pH boja mijenja u plavu. Crveno obojeni pigmenti antocijanina pretežno su u obliku kationa flavija (AH^+) i oni su stabilniji u jako niskom pH. U blago kiselim uvjetima, AH^+ forma prelazi u neutralni oblik (A). Daljnjim porastom pH, molekula iz svoje neutralne forme (A), prelazi u anionsku formu (A^-) (Slika 18.) [43, 44].



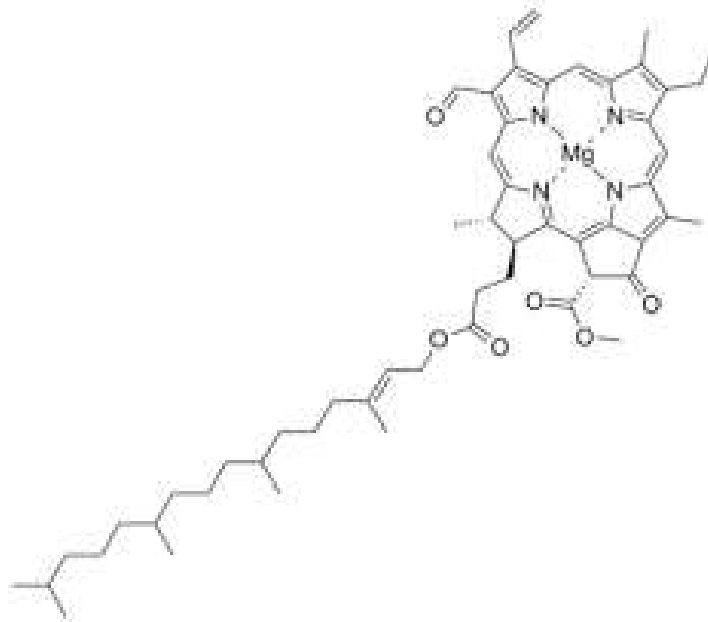
Slika 18. Prikaz promjena strukture flavij kationa s povećanjem pH i boje koje odgovaraju pojedinoj strukturi [44].

Karotenoidi su najrasprostranjeniji žuti, narančasti i crveni pigmenti. Obilje karotenoida u prirodi vjerojatno je posljedica njihovog relativno jednostavnog biosintetskog puta. Većina karotenoida sastoji se od osam izoprenskih jedinica s kosturom od 40 ugljika. Njihove opće strukture većinom se sastoje od polienskog lanca devet konjugiranih dvostrukih veza i krajnje skupine na oba kraja lanca (Slika 19.) [45].



Slika 19. Struktura karotenoida [46].

Pigment klorofil se nalazi u gotovo svim biljkama, uključujući zelene biljke, alge i cijanobakterije. Pojavljuje se u nekoliko različitih oblika, od kojih su klorofil *a* i klorofil *b* glavni. Molekula klorofila sastoji se od središnjeg atoma magnezija koji je okružen porfirinskim prstenom, a prsten je povezan s dugim bočnim lancem ugljika i vodika (fitolni lanac) (Slika 20.) [47].



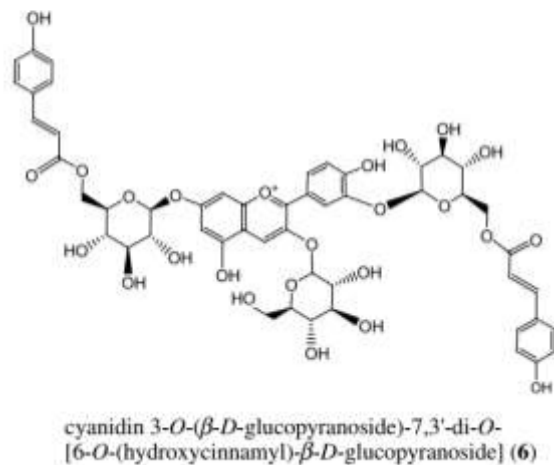
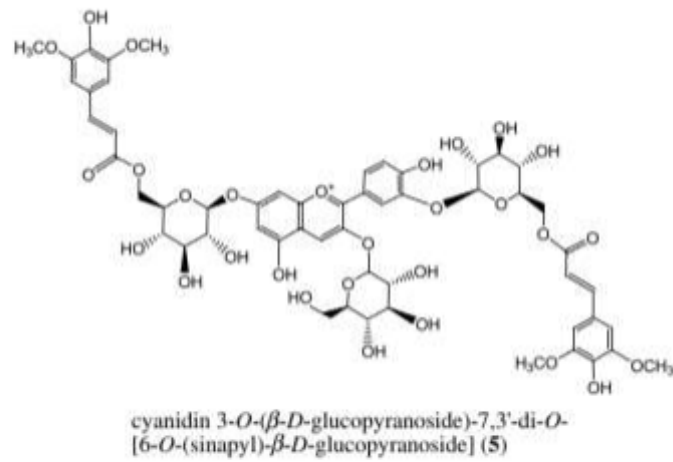
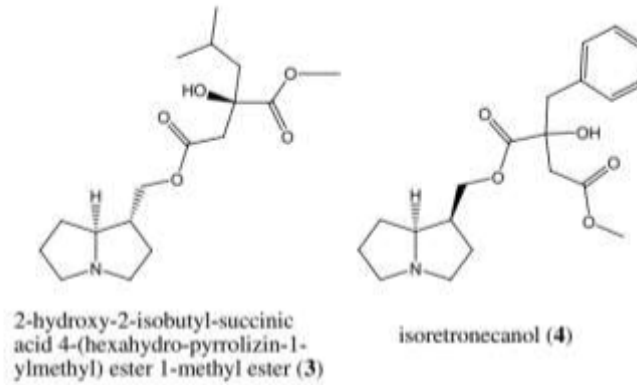
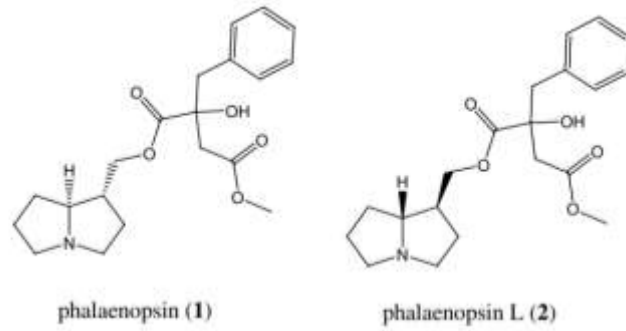
Slika 20. Struktura klorofila [48].

2.4. Pigmenti orhideja

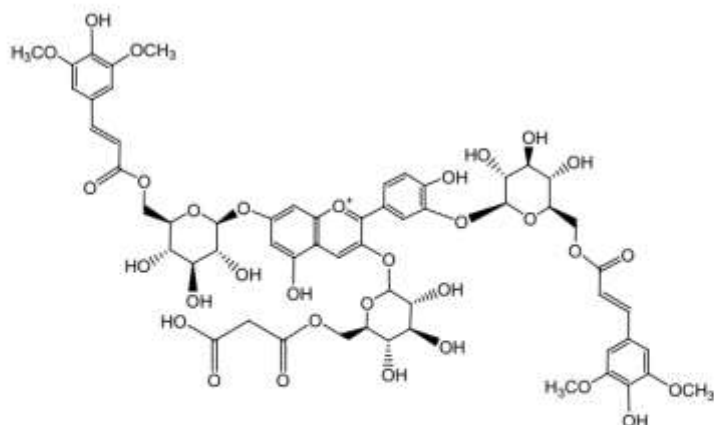
Sekundarni metaboliti orhideja (a time i pigmenti) bili su predmet brojnih istraživanja kojima su uočeni razni konstituenti poput bibenzila [49-52], stilbenoida [51, 53--55], fenentrena [52, 56, 57] i derivata fenantropina [58, 59]. Međutim, zbog rijetkosti i visoke cijene biljnih materijala, proveden je mali broj istraživanja o pigmentima u *Phalaenopsis* orhideja, a u literaturi su identificirani samo pirolizidini (Slika 21., strukture 1-4) [60-62], antocijanini (Slika 21. strukture 5-8) [63, 64] i fenantropini (Slika 21., strukture 9-10) [59, 65].

Među njima, glavni pigmenti u *Phalaenopsis* orhidejama su antocijanini, koji su predmet brojnih istraživanja. Griesbach (1990) je pročistio sinapil cijanidni 3,7,3-triglukozid iz cvijeta *P. schilleriana* Rchb.f., ali njegova struktura nije detaljno razjašnjena [66]. Tatsuzawa i sur. (1997) izolirali su četiri acilirana antocijanina izolirana su iz crveno--ljubičastih cvjetova kultivara *Phalaenopsis* orhideja. Uz to su i spoznali distribuciju ovih pigmenta u cvjetovima *P. equestris*, *P. intermedia*, *P. leucorrhoda*, *P. sanderiana* i *P. schilleriana* Rchb.f. i dokazali da su upravo ti antocijanini (strukture 5 i 7 na Slici 21.) glavne komponente ovih vrsta orhideja [64].

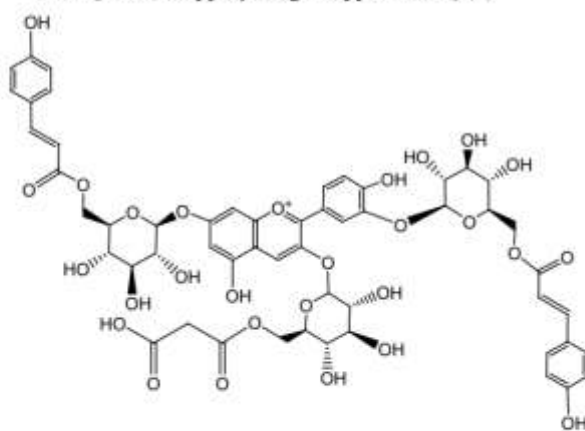
U studiji Chen (2009), korišteni su spektrometrijski podaci i podaci o masi kako bi se okarakterizirali antocijanini strukture 5 i 7 (Slika 21.) kao glavni pigmenti u svježim cvjetovima hibrida *Phalaenopsis*. Prema tim rezultatima, cijanidin 3-*O*-[β -D-glukopiranozid]-7,3'-[6-*O*-(sinapil)- β -D-glukopiranozid] (struktura 5) i njegov malonilni derivat (struktura 7) su odgovorni za crvene do ljubičaste boje u cvjetovima kultivara *Phalaenopsis* [67].



Slika 21. Strukture spojeva utvrđenih u Phalaenopsis orhidejama [65].



cyanidin 3-*O*-[6-*O*-(malonyl)- β -*D*-glucopyranoside]-7,3'-
di-*O*-[6-*O*-(sinapyl)- β -*D*-glucopyranoside] (7)



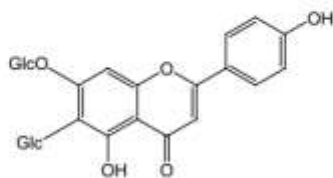
cyanidin 3-*O*-[6-*O*-(malonyl)- β -*D*-glucopyranoside]-7,3'-
di-*O*-[6-*O*-(hydroxycinnamyl)- β -*D*-glucopyranoside] (8)



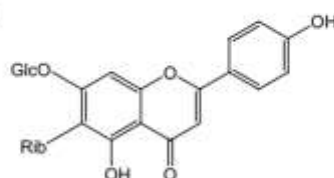
3-methoxy-2,7-dihydroxy-5*H*-
phenanthro[4,5-*bcd*]pyran (9)



2,3,7-trihydroxy-5*H*-
phenanthro[4,5-*bcd*]pyran (10)



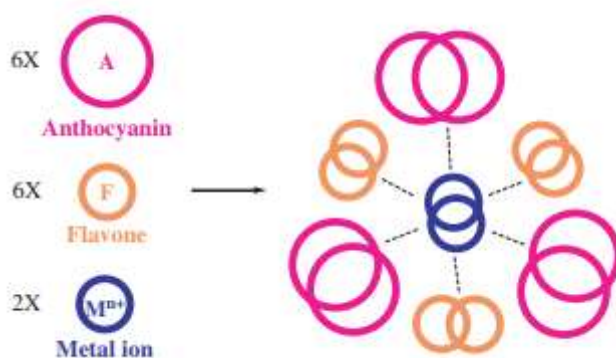
saponarin (11)



6-*C*- β -*D*-ribofuranosyl-7-*O*- β -*D*-
glycopyranosyl apigenin (12)

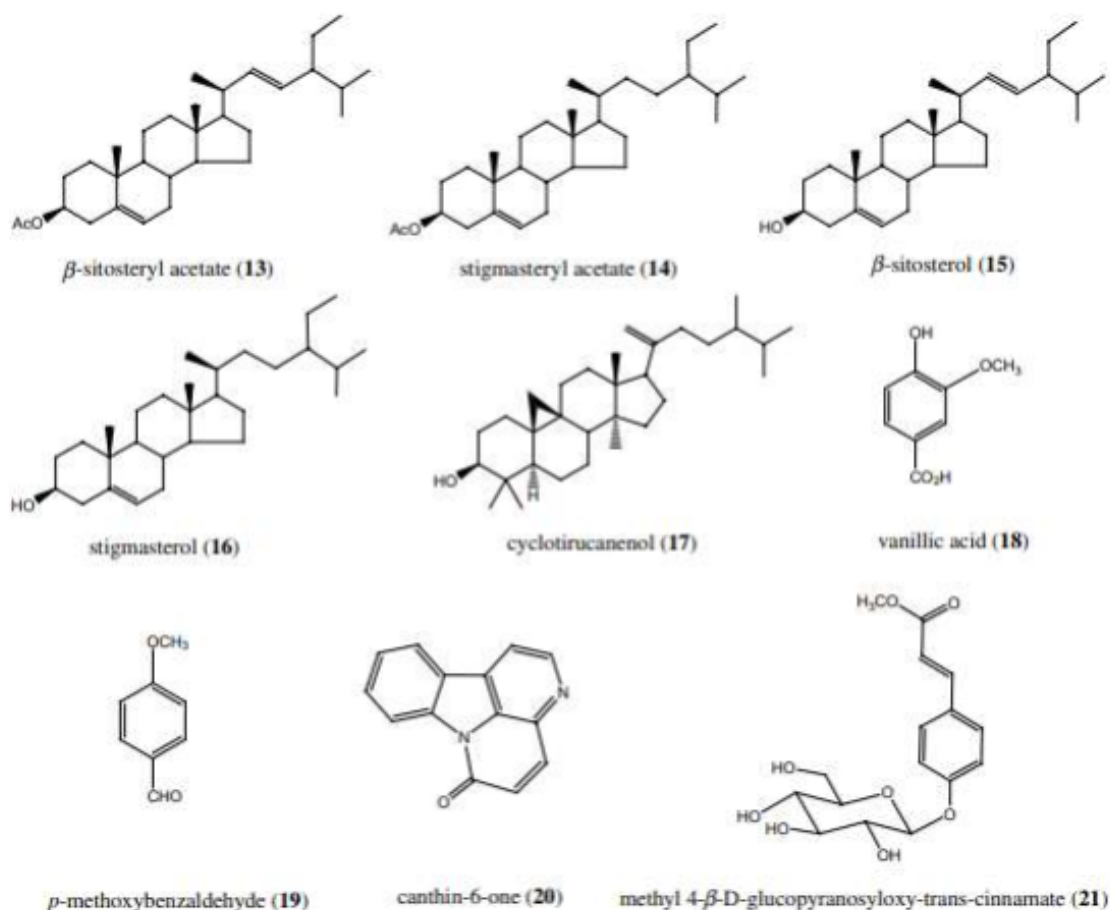
Slike 21. Strukture spojeva utvrđenih u *Phalaenopsis* orhidejama [65]. (nastavak)

Yoshida i sur. (2009) su proučavali metaloantocijanin, supramolekularni, samoorganizirani pigment metalnog kompleksa koji se sastoji od antocijanina, flavona i metalnih iona u stehiometrijskom omjeru. Većina dostupnih ionizacijskih metoda u masenoj spektrometriji su uništile supramolekule i dale samo masu monomernih molekularnih iona [68]. Samo je elektrosprej ionizacijska masena spektrometrija (engl., *Electrospray Ionisation – Mass Spectrometry*, ESI-MS) odredila točnu molekulsku masu supramolekula (Kondo i sur. (1994)). Iako istraživanja o antocijaninima u vrstama *Phalaenopsis* nisu ukazala na prisutnost supramolekula metaloantocijanina, pretpostavlja se da se glavni pigmenti nakupljaju na sličan način kao metaloantocijanini u drugim vrstama (Slika 22.) [69].



Slika 22. Formiranje metaloantocijanina [65].

Iako su flavonoidi čest predmet ispitivanja, objavljenih studija o sadržaju flavonoida u *Phalaenopsis* orhideja ima jako malo. Chen (2009) utvrdio je da su dva flavonoida, saponarin (struktura 11, Slika 21.) i 6-C- β -D-ribofuranozil-7-O- β -D-glikopiranozil apigenin (struktura 12, Slika 21.), glavni sastojci cvjetova kultivara *Phalaenopsis*, umjesto antocijanina. Obzirom da su flavonoidi prekursori antocijanina u biosintetskom putu, ovaj rezultat je shvatljiv [67]. Uz to, Chen (2009) je okarakterizirao smjese β -sitosteril acetata (struktura 13, Slika 23.) i sigmasteril acetata (struktura 14, Slika 23.) [70], smjese β -sitosterola (struktura 15, Slika 23.) i stigmasterola (struktura 16, Slika 23.) [71], ciklotirokanenola (struktura 17, Slika 23.) [72], vanilin kiseline (struktura 18, Slika 23.) [71], *p*-metoksibenzaldehida (struktura 19, Slika 23.) [73], katin-6-ona (struktura 20, Slika 23.) [71] i metil 4- β -D-glokupiranozilski-trans-cinamata (struktura 21, Slika 23.) [74].



Slika 23. Spojevi okarakterizirani u *Phalaenopsis* orhidejama [65].

Šest vrsta (*P. schilleriana*, *P. equestris*, *P. intermedia*, *P. aphrodite* var. *Formosana*, *P. aphrodite* i *P. stuartiana*) su kvantitativno analizirane kako bi se odredio sastav i količina flavonoida i antocijanina. Među njima, *P. schilleriana* i *P. equestris* imaju ružičasto-crvene cvjetove, dok ostale vrste imaju bijele cvjetove. U crvenim vrstama *Phalaenopsis* orhideja mogu se uočiti samo tragovi antocijanina, a glavni konstituenti utvrđeni HPLC analizom su flavonoidi strukture 11 i 12 (Slika 21.). Utvrđeno je da su svi ispitani kultivari sadržavali antocijanin strukture 5 i flavonoide strukture 11 i 12 (Slika 21.) kao glavne pigmente, osim bijele vrste *P. aphrodite* var. *Fomosana*, koja nije pokazala prisutnost antocijanina [65].

Kako bi se proučile varijacije boja pri različitim pH vrijednostima, snimljeni su i uspoređeni UV-VIS spektri cvjetnih ekstrakata i mješavina koje čine glavne pigmente (Chen, 2009). Vidljivi spektri sirovog ekstrakta hibrida *Phalaenopsis* sastavljeni su od dvije frakcije: frakcija pigmenta antocijanina, koja je bila plava, i frakcija flavonoidnog kopigmenta, koja je bila žuta, pri visokim pH vrijednostima [67].

Tan i sur. (2014) utvrdili su da je antocijanin glavni pigment u orhidejama *Mokara Pink*, *M. Aranda*, *M. Gold Nugget*, *Ascocenda Dong Tarn* i *Dendrobium Sonia*. Što je rezultat morfoloških karakteristika i boja cvijeta budući da akumuliraju antocijanine u laticama u odnosu na *D. Shavin White* koji je bijele boje. Razlika u sadržaju antocijanina među orhidejama može biti posljedica genetskih čimbenika [75]. Mizuta i sur. (2009) također su primijetili da su cvjetovi s bijelim laticama lišeni antocijanina, a sastav antocijanina u cvjetovima ljubičaste skupine je raznolikiji nego u cvjetovima crvene skupine [76].

Nguyen i sur. (2018) ispitali su antioksidacijsko djelovanje metanolnih ekstrakata četiri dijela (korijen, peteljka, list i cvijet) tri hibrida bijele, žute i ljubičaste *Phalaenopsis* orhideje. Rezultati su pokazali da su najviše razine klorofila *a* i klorofila *b* utvrđene u ekstraktima listova bijele i ljubičaste orhideje, dok je karotenoid ima najveći sadržaj u ekstraktu cvijeta žute orhideje. Od svih ispitanih ekstrakata, flavonoidi i antocijanini su imali najveću koncentraciju u ekstraktu cvijeta ljubičaste orhideje, dok je najveća razina polifenola tvrdena u ekstraktu cvijeta žute orhideje [77].

Klorofil je otkriven u svim proučavanim orhidejama u rasponu 0,01-0,07 mg/g. Utvrđeno je da nije nužno da samo zeleni dio biljke ima klorofil, nego i latice imaju fotosintetski aktivne kloroplaste ali pigmenti koji boje latice maskiraju boju klorofila. Kada latica cvijeta sadrži manje antocijanina, ukupni sadržaj klorofila ima veću vrijednost [75].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Korišteni biljni materijal, kemikalije i pribor

Za potrebe ovog rada korišteni biljni materijal bile su latice orhideja roda *Phalaenopsis* različitih boja. Boje latica su bile bijela (Slika 24. a)), žuta (Slika 24. b)), ljubičasta (Slika 24. c)), roza (Slika 24. d)), bijela s ljubičastim pjegicama (Slika 24. e)), bijela s ljubičastim i žutim pjegicama (Slika 24. f)) te žuta s roza pjegicama (Slika 24. g)).



Slika 24. a) Bijela, b) žuta, c) ljubičasta, d) roza, e) bijela s ljubičastim pjegicama, f) bijela s ljubičastim i žutim pjegicama i g) žuta orhideja s roza pjegicama.

Sve kemikalije korištene tijekom izvođenja ovog rada su analitičke čistoće, a korištena je demineralizirana i deionizirana voda. Od kemikalija korištene su:

- klorovodična kiselina, HCl (M = 34,46 g/mol, Kemika)
- natrijev hidroksid, NaOH (M = 39,99 g/mol, Kemika)
- otapala: aceton, C₃H₆O (M = 58,08 g/mol, Kemika), etanol, C₂H₅OH (M = 46,07 g/mol, Kemika), metanol, CH₃OH (M = 32,04 g/mol, Kemika)

Od pribora, u radu su korištene: jažice, keramički tarionik s tučkom, kapalice, odmjerne tikvice, epruvete, stalak za epruvete, satno staklo, staklene bočice sa čepom, automatska pipeta. Uređaji koji su korišteni u radu su: analitička vaga, vortex miješalica, pH metar (Mettler Toledo, SevenEasy), uređaj za ultračistu vodu (TKA, WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME).

3.3. Priprema otopina, plan rada i postupak

Otopine su pripremljene prema prethodno opisanom postupku [78]. Nakon pripreme otopina, idući korak u ispitivanju bila je priprema biljnog materijala. Prikupljene latice orhideje su bile svježije, čiste i koristile su se odmah nakon branja. Latice su usitnjene u tarioniku uz dodatak otapala tako da omjer mase latica i volumena otapala bude 1 g : 10 mL. Kao potencijalna otapala ispitani su voda, etanol, metanol i aceton. Tako pripremljenom indikatoru odmah po pripremi ispitan je potencijal primjene kao kiselo-baznog indikatora.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Indikator pripremljen s vodom

Indikator pripremljen od cvijeta odabranih predstavnika porodice Orchidaceae i vode pokazuje promjene boje pri određenim pH vrijednostima. Rezultati su prikazani su na Slikama 25.-31.



Slika 25. Indikator od latica bijele orhideje i vode.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje i vodom dolazi do promjene boje u žuto rasponu $\text{pH} = 11-14$. Najintenzivnija promjena boje je na $\text{pH} = 11$, a intenzitet prema $\text{pH} = 14$ slabi (Slika 25.).



Slika 26. Indikator od latica žute orhideje i vode.

Kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje i vodom (Slika 26.) pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 2$ vidljivo je svijetlo narančasto obojenje, u rasponu $\text{pH}=3-11$ obojenje je svijetlo žuto, a pri $\text{pH}=12-14$ obojenje je intenzivno žuto, s time da je pri $\text{pH} = 14$ najintenzivnije.



Slika 27. Indikator od latica roza orhideje i vode.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama roza orhideje i vodom (Slika 27.) pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 2$ je crvenkasto, od $\text{pH} = 3-10$ obojenje je ljubičasto, pri $\text{pH} = 11$ je plavo, pri $\text{pH} = 12$ je sivozeleno, pri $\text{pH} = 13$ je zeleno, a pri $\text{pH} = 14$ obojenje je bilo zeleno, ali je s vremenom požutilo. Uočene boja jasno ukazuju na antocijanine.



Slika 28. Indikator od latica ljubičaste orhideje i vode.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama ljubičaste orhideje i vodom (Slika 28.) pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 2$ je crveno, u rasponu $\text{pH} = 3-10$ obojenje je ljubičasto, pri $\text{pH} = 11$ je plavo, pri $\text{pH} = 12$ je sivozeleno, pri $\text{pH} = 13$ je zeleno, a pri $\text{pH} = 14$ obojenje je bilo zeleno, ali je s vremenom požutilo. I u ovom slučaju uočena obojenja ukazuju na antocijanine.



Slika 29. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i vode.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i vodom (Slika 29.) pri pH = 1 i pH = 2 obojenje je crvenkasto, pri pH = 3-10 je ljubičasto, a pri pH = 11-13 sivozeleno, a pri pH = 14 obojenje je prvo zelenkasto, zatim žuto. Ovakvi rezultati upućuju na antocijanine.



Slika 30. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i vode.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i vodom (Slika 30.) pri pH = 1 i pH = 2 je crvenkasto, od pH = 3-10 je ljubičasto, u rasponu pH = 11-13 sivozeleno, a pri pH = 14 obojenje je prvo zelenkasto, zatim požuti. I u ovom slučaju, dobiveni rezultati upućuju na antocijanine.



Slika 31. Indikator od latica žute orhideje s roza pjegicama i vode.

Kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje s roza pjegicama i vodom (Slika 31.) dolazi do promjene boje u žuto u rasponu od pH = 11-14, najintenzivnija promjena boje je na pH = 14, a intenzitet boje prema pH = 11 slabi.

Na temelju provedenog ispitivanja, vidljivo je da je bijela orhideja dobar indikator u rasponu pH = 11-14, dok je žuta orhideja dobar indikator u izrazito kiselim i izrazito bazičnim uvjetima. Roza i ljubičasta orhideja daju slične rezultate, samo su obojenja kod

ljubičaste orhideje intenzivnija. Također, bijela orhideja s ljubičastim pjegicama i bijela orhideja s ljubičastim i žutim pjegicama daju slične rezultate, ali su obojenja kod bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama intenzivnija. Žuta orhideja je dobar indikator u rasponu od pH= 12-14. Uočene promjene boje u slučaju obojanih orhideja rezultat su prisutnih antocijanina. U slučaju bijele i žutih orhideja, dobiveni rezultat ukazuju na flavonoide, odnosno spomenute flavonoidne kopigmente [67], budući da dolazi do pojave žute boje pri visokom pH. Iako su neka istraživanja ukazala na prisutnost karotenoida u cvijetu žute orhideje, nije uočena promjena boja koju karotenoidi pokazuju (žuta boja u kiselom, narančasta u neutralnom i crvena u bazičnom mediju). Moguće da je sadržaj karotenoida bio nizak, da su drugi pigmenti maskirali karotenoide ili korišteno otapalo nije odgovaralo za karotenoide.

4.2. Indikator pripremljen s acetonom

Indikator pripremljen od cvijeta odabranih predstavnika porodice Orchidaceae i acetona pokazuje promjene boje pri određenim pH vrijednostima, a rezultati su prikazani na Slikama 32.-38.



Slika 32. Indikator od latica bijele orhideje i acetona.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje i acetonom (Slika 32.) dolazi do promjene boje u rasponu pH= 11-14, ali je intenzitet žute boje pri svim pH vrijednostima jednak.



Slika 33. Indikator od latica žute orhideje i acetona.

Kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje i acetonom (Slika 33.) u rasponu pH = 1-11 obojenje je svjetlo žuto, a od pH = 12-14 je intenzivno žuto.



Slika 34. Indikator od latica roza orhideje i acetona.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama roza orhideje i acetonom (Slika 34.) je pri pH = 1 i pH = 2 crvenkasto, pri rasponu pH = 3-10 obojenje je ljubičasto, pri pH = 11 je svjetlo zelenosivo, pH = 12-13 je zelenosivo, a pri pH = 14 obojenje je zelenkasto ali vrlo brzo požuti. Uočene boje upućuju na antocijanine.



Slika 35. Indikator od latica ljubičaste orhideje i acetona.

Kod indikatora pripremljenog s laticama ljubičaste orhideje i acetonom (Slika 35.) obojenje je pri pH = 1-3 crvenkasto, pri rasponu pH = 4-10 je ljubičasto, pri pH = 11 je vidljivo plavosivo obojenje, pri pH = 12 i pH = 13 je zelenosivo s time da je pri pH = 13 obojenje intenzivnije, a pri pH = 14 je zelenožuto. I u ovom slučaju uočena obojenja upućuju na pigmente antocijanine.



Slika 36. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i acetona.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i acetonom (Slika 36.) je pH = 1-3 crveno obojenje, od pH = 3-10 je ljubičasto, od pH = 11-13 obojenje je zeleno, a pri pH = 14 je vidljivo žuto obojenje. Dobiveni rezultati upućuju na prisutnost antocijanina.



Slika 37. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i acetona.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i acetonom (Slika 37.) je pri pH = 1-3 crveno, pri rasponu pH = 3-10 je ljubičasto, pri pH = 11-13 obojenje je zeleno, a pri pH = 14 je žuto. Dobiveni rezultati upućuju na antocijanine.



Slika 38. Indikator od latica žute orhideje s roza pjegicama i acetona.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje s roza pjegama i acetonom (Slika 38.) je u rasponu pH = 1-10 svijetložuto, a u rasponu pH = 11-14 je vidljivo malo intenzivnije žuto obojenje.

Na temelju provedenog ispitivanja, vidljivo je da je bijela orhideja dobar indikator u rasponu pH = 11-14. Žuta orhideja je dobar indikator u izrazito bazičnom mediju, s tim da je pri pH = 1-11 obojenje jednako, slično kao kod indikatora pripremljenog od žute orhideje s rozim pjegama. Roza i ljubičasta orhideja daju slične rezultate, dok bijela orhideja s ljubičastim pjegicama i bijela orhideja s ljubičastim i žutim pjegicama daju gotovo identične rezultate. Dobiveni rezultati ukazuju na značaj prisutnih antocijanina, odnosno na flavonoidni kopigment u slučaju žute boje u jako bazičnom mediju.

4.3. Indikator pripremljen s etanolom

Rezultati ispitivanja potencijala indikatora pripremljenog od cvijeta orhideje i etanola kao otapala prikazani su na Slikama 39.- 45.



Slika 39. Indikator od latica bijele orhideje i etanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje i etanolom (Slika 39.) u slučaju cijelog raspona pH = 11-14 vidljivo je jako svijetložuto obojenje.



Slika 40. Indikator od latica žute orhideje i etanola.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje i etanolom (Slika 40.) pri pH = 1 i pH = 2 je svijetlo narančasto, u rasponu pH = 3-10 je svijetložuto, a pri rasponu pH = 11-14 je intenzivnije žuto.



Slika 41. Indikator od latica roza orhideje i etanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama roza orhideje i etanolom (Slika 41.) obojenje pri pH = 1-3 je svijetlo roza, pri pH = 4-7 je svijetlo ljubičasto, pri pH = 8-10 je malo tamnije ljubičasto, pri pH = 11-13 je zelenkasto, a pri pH = 14 obojenje. Uočena obojenja upućuju na antocijanine.



Slika 42. Indikator od latica ljubičaste orhideje i etanola.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama ljubičaste orhideje i etanolom (Slika 42.) je pri $\text{pH} = 1-3$ crvenkasto, pri $\text{pH} = 4-10$ je ljubičasto, pri $\text{pH} = 11$ je sivozeleno. Pri $\text{pH} = 12$ i $\text{pH} = 13$ je vidljivo manje intenzivno sivozeleno obojenje, a na $\text{pH} = 14$ obojenje je zeleno pa nakon kratkog vremena žuto. Dobiveni rezultati ponovo upućuju na antocijanine.



Slika 43. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i etanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i etanolom (Slika 43.) obojenje je pri $\text{pH} = 1-3$ crvenkasto, u rasponu $\text{pH} = 4-10$ je ljubičasto, pri $\text{pH} = 11-13$ je zeleno, dok je pri $\text{pH} = 14$ je vidljivo zeleno pa žuto obojenje. Rezultati upućuju na antocijanine.



Slika 44. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i etanola.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i etanolom (Slika 44.) pri pH =1-3 je crvenkasto, u slučaju pH = 4-10 je ljubičasto, pri pH = 11-13 je svijetlo zeleno, dok je pri pH = 14 žuto. I u ovom slučaju rezultati upućuju na antocijanine.



Slika 45. Indikator od latica žute orhideje s roza pjegicama i etanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje s roza pjegicama i etanolom u rasponu pH = 11-14 vidljivo je izrazito svijetlo žuto obojenje (Slika 45.).

Na temelju provedenog ispitivanja, vidljivo je da je bijela orhideja dobar indikator u rasponu pH = 11-14, iako je obojenje jako svijetlo. Slični su rezultati i za žutu orhideju s roza pjegicama. Žuta orhideja je dobar indikator u izrazito kiselom i izrazito bazičnom mediju. Roza i ljubičasta orhideja daju slične rezultate, a bijela orhideja s ljubičastim pjegicama i bijela orhideja s ljubičastim i žutim pjegicama daju gotovo identične rezultate. Dobiveni rezultati slični su rezultatima dobivenima s vodom i acetonom te se može pretpostaviti da su rezultat antocijanina (prisutnih u roza i ljubičastim cvjetovima) i flavonoida (u slučaju bijele i žutih orhideja).

4.4. Indikator pripremljen s metanolom

Rezultati ispitivanja mogućnosti primjene indikatora pripremljenog od cvijeta orhideje i metanola kao otapala prikazani su na Slikama 46.-52.



Slika 46. Indikator od latica bijele orhideje i metanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje i metanolom (Slika 46.) pri pH = 11-14 vidljivo je žuto obojenje, ali je ono na pH = 14 najintenzivnije.



Slika 47. Indikator od latica žute orhideje i metanola.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje i metanolom (Slika 47.) je pri pH = 11-14 žuto, s time da je pri pH = 12 obojenje najintenzivnije.



Slika 48. Indikator od latica roza orhideje i metanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama roza orhideje i metanolom (Slika 48.) pri pH = 1 i pH = 2 vidljivo je crvenkasto obojenje, pri pH = 4-10 obojenje je ljubičasto. Obojenje pri pH = 11 je sivozeleno, pri pH = 12 zeleno, na pH = 13 žutozeleno, dok je na pH = 14 svijetlo žuto obojenje. Rezultati ponovo upućuju na antocijanine.



Slika 49. Indikator od latica ljubičaste orhideje i metanola.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama ljubičaste orhideje i metanolom (Slika 49.) je pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 2$ crveno, između $\text{pH} = 3-10$ je ljubičasto, pri $\text{pH} = 11$ je plavkasto, pri $\text{pH} = 12$ je sivozeleno, na $\text{pH} = 13$ obojenje je zeleno, a na $\text{pH} = 14$ je zeleno obojenje koje brzo požuti. Ovdje dobiveni rezultati upućuju na antocijanine.



Slika 50. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i metanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim pjegicama i metanolom (Slika 50.) obojenje je pri $\text{pH} = 1-3$ crveno, između $\text{pH} = 4-10$ je ljubičasto, pri $\text{pH} = 11$ je sivozeleno. Pri $\text{pH} = 12$ uočeno je zeleno obojenje, na $\text{pH} = 13$ obojenje je žutozeleno, a na $\text{pH} = 14$ je zeleno ali brzo požuti. Radi se o rezultatima koji upućuju na antocijanine.



Slika 51. Indikator od latica bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i metanola.

Obojenje kod indikatora pripremljenog s laticama bijele orhideje s ljubičastim i žutim pjegicama i metanolom (Slika 51.) je pri pH = 1-3 crvenkasto, pri pH = 4-10 je ljubičasto, pri pH = 11 je svijetlo plavo. Pri pH = 12 vidi se zelenkasto obojenje, pri pH = 13 svijetlo zeleno, dok je na pH = 14 obojenje je svijetlo žuto. Rezultati ponovo upućuju na antocijanine.



Slika 52. Indikator od latica žute orhideje s roza pjegicama i metanola.

Kod indikatora pripremljenog s laticama žute orhideje s roza pjegicama i metanolom (Slika 52.) obojenje je pri pH = 11-12 zelenkasto, a na pH = 13 i pH = 14 je žuto. Pri rasponu pH = 1-10 vidi se blago narančasto obojenje.

Na temelju provedenog ispitivanja, vidljivo je da je bijela orhideja dobar indikator u rasponu pH = 11-14, tj. dobar je indikator u jako bazičnom mediju, slično kao i žuta orhideja. Roza i ljubičasta orhideja daju slične rezultate, ali su obojenja kod ljubičaste orhideje intenzivnija. Također, bijela orhideja s ljubičastim pjegicama i bijela orhideja s ljubičastim i žutim pjegicama daju slične rezultate. Žuta orhideja s roza pjegicama daje dobre rezultate u bazičnom mediju. Rezultati su u skladu s onima dobivenima s preostalim otapalima i ukazuju na antocijanine i potencijalno na flavonoide (flavonoidne kopigmente).

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu ispitana je mogućnost primjene latica cvijeta odabranih predstavnika porodice Orchidaceae kao kiselo-baznog indikatora. Istraživanje je provedeno na sedam raznobojnih cvjetova orhideja roda *Phalaenopsis*. Indikatori su pripremljeni upotrebom usitnjenih latica i odabranih otapala (voda, aceton, etanol, metanol). Ispitivanjem je utvrđeno da se većina ispitanih latica *Phalaenopsis* orhideja može koristiti kao kiselo-bazni indikator, s tim da neke daju dobre rezultate samo u bazičnom dijelu, a neke u cijelom pH spektru.

Za uočene promjene boja pripremljenih indikatora pri različitim pH vrijednostima zaslužni su biljni pigmenti, antocijanini i potencijalno flavonoidi. Dobiveni rezultati za pojedinu boju cvijeta su u svim ispitanim otapalima slični, razlika je samo u intenzitetu dobivenih obojenja. Odnosno, latice istih cvjetova u različitim otapalima daju slične rezultate, s manjim odstupanjima u intenzitetu obojenja.

Bijela orhideja, žuta orhideja i žuta orhideja s roza pjegicama su se pokazale kao dobar indikator u bazičnom mediju. Kod navedenih orhideja je u svim otapalima bila vidljiva promjena boje u žutu u rasponu $\text{pH} = 11-14$, dok je u preostalom dijelu pH skale boja prozirna (bijela orhideja) ili nježno žućkasta (žuta orhideja i žuta orhideja s roza pjegama). Time je uočena jedna boja specifična za jako bazičan medij, ali izostanak te boje ne može poslužiti kao jasni pokazatelj kiselog ili neutralnog pH medija (jer pokriva $\text{pH} = 1-10$).

Ljubičasta orhideja, roza orhideja, bijela orhideja s ljubičastim pjegicama i bijela orhideja s ljubičastim i žutim pjegicama su se pokazale kao dobar indikator u izrazito kiselom i izrazito bazičnom mediju. U svim otapalima je bila je bila vidljiva promjena boje pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 2$ u crveno, između $\text{pH} = 11-14$ u plavkasto, zelenkasto ili žuto, a između $\text{pH} = 3-10$ u ljubičasto. Za navedene promjene su odgovorni pigmenti antocijanini koji su u kiselom stanju crveni, u neutralnom imaju ljubičastu nijansu, dok se povećanjem pH boja mijenja u plavkasto i zelenu, te pri jako bazičnom mediju u žutu.

Rezultati ispitivanja ukazuju na mogućnost primjene cvijeta odabranih predstavnika porodice Orchidaceae kao kiselo-baznog indikatora. Prednosti ovakvih indikatora naspram konvencionalnih su laka dostupnost i priprema, niska cijena, sigurnost za zdravlje i okoliš. Nedostatak ovako pripremljenih indikatora je ograničena mogućnost primjene i nemogućnost preciznog određivanja pH vrijednost, nego samo raspona. Ipak, u pojedinim slučajevima možemo reći da se ovako pripremljenim indikatorima može dosta precizno odrediti pH medija, što je rezultat profila pigmenata prisutnih u nekim od ispitanih latica.

6. LITERATURNI VIRELA

- [1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613902/>, 21. 9. 2023.
- [2] <https://www.orchidweb.com/phalaenopsis-orchid-care>, 21. 9. 2023.
- [3] <https://www.thoughtco.com/definition-of-ph-indicator-605499>, 21. 9. 2023.
- [4] <https://www.thoughtco.com/definition-of-ph-indicator-605499>, 21. 9. 2023.
- [5] Y. Y. Hsiao, Z. J. Pan, C. C. Hsu, Y. P. Yang, Y. C. Hsu, Y. C. Chuang, H. H. Shih, W. H. Chen, W. C. Tsai, H. H. Chen, *Plant Cell Physiol.*, **52** (2011), 1467-1486.
- [6] S. R. Ramírez, B. Gravendeel, R. B. Singer, C. R. Marshall, N. E. Pierce, *Nature*, **448** (2007), 1042-1045.
- [7] M. G. Simpson, *Plant systematics*, Academic press, London, 2019.
- [8] <https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Orchid#Vanilla>, 21. 9. 2023.
- [9] <https://www.gardeningknowhow.com/wp-content/uploads/2015/03/orchid-roots.jpg>, 21. 9. 2023.
- [10] <https://hr.vomturmhaus.com/znacajke-izgleda-i-rasta-stabljike-u-orhideji>, 21. 9. 2023.
- [11] <https://i0.wp.com/bklynorchids.com/wp-content/uploads/2016/03/Healthy-Phalaenopsis-Leaves.jpg?resize=448%2C252>, 21. 9. 2023.
- [12] <https://www.pinterest.com/pin/426434658466071022/>, 21. 9. 2023.
- [13] B. Gravendeel, A. Dirks-Mulder, *Nat. Plants*, **1** (2015), 1–2.
- [14] K. Obrovac, *Orhideje (por. Orchidaceae) i mogućnosti njihove proizvodnje*, Završni rad, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2015.
- [15] M. W. K. Goh, P. P. Kumar, S. H. Lim, H. T. W. Tan, *Euphytica*, **141** (2005), 11-22.
- [16] <https://www.pinterest.com/pin/phalaenopsis-orchid-leaf--469992911122048346/>, 21. 9. 2023.
- [17] https://www.patrickpolbosorchids.fr/boutique/1994-large_default/phalaenopsis-white-heart-pink-label-pink.jpg, 21. 9. 2023.
- [18] <https://www.thespruce.com/phalaenopsis-orchids-definition-1902866>, 21. 9. 2023.
- [19] https://img.freepik.com/premium-photo/orchid-phalaenopsis-liodoro-home-flowering_593276-286.jpg?w=2000, 21. 9. 2023.
- [20] https://cdn.shopify.com/s/files/1/0570/5488/8099/products/M405_grande.jpg?v=1642279947, 21. 9. 2023.
- [21] https://1.bp.blogspot.com/-rIVTEloOIfA/YAPAUUnJfqsI/AAAAAAAAANmY/N_i323gUrX0Bxkd35QXoubT5GvSBJdn8ACPcBGAsYHg/s725/Phalaenopsis%2Bstuartiana.jpg, 21. 9. 2023.

- [22]https://malvarosaflowers.com/stageM/wp-content/uploads/2021/02/IMG_6114-scaled.jpg, 21. 9. 2023.
- [23] <https://www.thoughtco.com/definition-of-acid-base-indicator-604738>, 21. 9. 2023.
- [24]<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/15cf791a-4c97-4f29-84d9-17c1b47ceccc/content/uploads/kemija-2/m04/j03/skala.jpg>, 21. 9. 2023.
- [25]<https://www.thoughtco.com/what-is-litmus-paper-3976018>, 21. 9. 2023.
- [26] <https://media.sciencephoto.com/image/a5000372/800wm>, 21. 9. 2023.
- [27]https://dbpedia.org/page/Thymol_blue, 21. 9. 2023.
- [28]https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bc/Thymolblau_skeletal.png, 21. 9. 2023.
- [29]https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c1/Thymol_Blue_crystals.jpg/200px-Thymol_Blue_crystals.jpg, 21. 9. 2023.
- [30] <https://abbeycolor.com/stains-and-reagents/phenol-red/>, 21. 9. 2023.
- [31] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a8/Phenol-red-zwitterionic-form-2D-skeletal.png>, 21. 9. 2023.
- [32]https://cdn11.bigcommerce.com/sufhcuzfxw9/images/stencil/1280x1280/products/11414/18932/CH-PHENRED__86626.1647877533.jpg?c=2, 21. 9. 2023.
- [33] <https://www.chemicals.co.uk/blog/what-is-methyl-orange>, 21. 9. 2023.
- [34]<https://www.researchgate.net/profile/Sharifah-Bee-Abd-Hamid/publication/277977827/figure/fig1/AS:1086773652402200@1636118438440/Structural-formula-of-methyl-orange.jpg>, 21. 9. 2023.
- [35]https://cdn11.bigcommerce.com/sufhcuzfxw9/images/stencil/1280x1280/products/13271/13985/CH-METHOR__48861.1503517904.jpg?c=2, 21. 9. 2023.
- [36]https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/4d903566-3e87-45ae-9299-e35942520b45/datastore/18/publication/10966/pictures/2020/03/09/1583784719_C0290946-Methyl_orange-SPL_776.jpg?v=1614591236, 21. 9. 2023.
- [37] <https://www.britannica.com/science/phenolphthalein>, 21. 9. 2023.
- [38] <https://media.sciencephoto.com/c0/30/73/11/c0307311-800px-wm.jpg>,
- [39] P .M. A. Khan, M. Farooqui, *J. Adv. Sci. Res.*, **2** (2011), 20-27.
- [40]https://res.cloudinary.com/melscience/image/upload/fl_progressive:steep,q_auto:good,w_1200/v1/experiments/drinks-v2_tea/image_tapdob.jpg, 21. 9. 2023.

- [41] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/28/Flavon_num.svg/1200px-Flavon_num.svg.png, 21. 9. 2023.
- [42] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cd/Anthocyanidine.svg/220px-Anthocyanidine.svg.png>, 21. 9. 2023.
- [43] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613902/>, 21. 9. 2023.
- [44] B. Gomaz, *San o plavoj ruži*, Završni rad, PMF, Kemijski odsjek, Zagreb, 2018.
- [45] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6949322/>, 21. 9. 2023.
- [46] <https://www.chemspider.com/ImagesHandler.ashx?id=25995493&w=250&h=250>,
- [47] <https://www.britannica.com/science/chlorophyll>, 21. 9. 2023.
- [48] <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQR0qImLiHk4NT2sfogATdexLsrZ45iSKaQtH5e032Tt6wRbrXOnFN9IolWyQtQtS6zd74&usqp=CAU>, 21. 9. 2023.
- [49] P. L. Majumder, M. Basak, *Phytochemistry*, **30** (1991), 321–324.
- [50] P. L. Majumder, S. Pal, *Phytochemistry*, **32** (1993), 1561–1565.
- [51] P. L. Majumder, S. Lahiri, N. Mukhoti, *Phytochemistry*, **42** (1996), 1157–1161.
- [52] Y. W. Leong, C. C. Kang, L. J. Harrison, A. D. Powell, *Phytochemistry*, **44** (1997), 157–165.
- [53] P. L. Majumder, M. Basak, *Phytochemistry*, **30** (1991), 3429–3432.
- [54] P. L. Majumder, S. Ghosal, *Phytochemistry*, **32** (1993), 439–444.
- [55] P. L. Majumder, S. Ghosal, *Phytochemistry*, **35** (1994), 205–208.
- [56] P. L. Majumder, R. C. Sen, *Phytochemistry*, **30** (1991), 2432–2434.
- [57] P. L. Majumder, D. C. Maiti, *Phytochemistry*, **28** (1989), 887–890.
- [58] P. L. Majumder, E. Sabzabadi, *Phytochemistry*, **27** (1988), 1899–1901
- [59] Y. Manako, H. Wake, T. Tanaka, *Phytochemistry*, **58** (2001), 603–605.
- [60] S. Brandange, B. Luning, *Acta Chem. Scand.*, **23** (1969), 1151–1154.
- [61] S. Brandange, B. Luning, C. Moberg, E. Sjostrand, *Acta Chem. Scand.*, **25** (1971), 349–350.
- [62] S. Brandange, B. Luning, C. Moberg, E. Sjostrand, *Acta Chem. Scand.*, **26** (1972), 2558–2560.
- [63] R. J. Griesbach, *Lindleyana*, **5** (1990), 231–234.
- [64] F. Tatsuzawa, N. Saito, H. Seki, *Phytochemistry*, **45** (1997), 173–178.
- [65] P. C. Kuo, T. S. Wu, *Orchid Biotechnology II*, World Scientific, New Jersey, 2011.
- [66] R. J. Griesbach, *Lindleyana*, **6** (1991), 311–315.

- [67] G. F. Chen, *Flower pigment constituents and their quantitative analysis of Phalaenopsis species*, Graduate, Institute of Electro-Optical and Materials Science, Taiwan, 2009.
- [68] K. Yoshida, M. Mori, T. Kondo, *Nat. Prod. Rep.*, **26** (2009), 884–915.
- [69] T. Kondo T, M. Ueda, K. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994), 7457–7458.
- [70] X. Zhang X, P. Geoffroy, M. Miesch, *Steroids*, **70** (2005), 886–895.
- [71] P. C. Kuo, A.G. Damu, K. H. Lee, T. S. Wu, *Bioorg. Med. Chem.*, **12** (2004), 537–544,
- [72] A. Q. Khan, Z. Ahmed, N. H. Kazmi, A. Malik, *Z. Naturforsch. B*, **43** (1988), 1059–1062.
- [73] F. R. Chang, Y. H. Lee, Y. L. Yang, *J. Nat. Prod.*, **66** (2003), 1245–1248.
- [74] T. Yamauchi, F. Abe, M. Taki, *Chem. Pharm. Bull.*, **29** (1981), 3051–3055.
- [75] S. H. Tan, S. A. Manap, R. Karim, S. S. Rashid, M. Mahmood, N. L. Ma, *Adv. Environ. Biol.*, **8** (2014), 20–24.
- [76] D. Mizuta, B. Takuya, M. Ikuo, N. Akira, K, Nobuo, *Sci. Hortic.*, **122** (2009), 594-602.
- [77] H. C. Nguyen, K. H. Lin, M. Y. Huang, C. M. Yang, T. H. Shih, T. C. Hsiung, Y. C. Lin, F. C. Tsao, *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, **46** (2018), 457–465.
- [78] K. Bilić, *Istraživanje biljnog materijala kao potencijalnog kiselo-baznog indikatora*, Završni rad, Odjel za kemiju, Osijek 2020.