

Andrea Stanić

**Fitokemijska i antioksidacijska svojstva
polifenola u vrstama *Juniperus oxycedrus* L. i
Juniperus phoenicea L.**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom više asistentice-poslijedoktorandice dr. sc. Marije Kindl.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Mariji Kindl na odabiru teme, stručnim savjetima, velikoj pomoć i trudu uloženom u izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Zavoda za farmakognoziju, posebno Mateji i Luciji.

Neizmjereno hvala mojim roditeljima i braći te ostalim članovima obitelji na svoj podršci, ljubavi, strpljenju, vjeri i molitvama tokom ovih godina studiranja. Hvala mojim prijateljima i kolegama Anamariji, Ivanu, Josipi i Maji na svim zajedničkim trenucima, potpori, smijehu i suzama. Uz vas je sve sve bilo lakše.

Posebno hvala mom Dominiku na potpori, razumijevanju, strpljivosti i bezuvjetnoj ljubavi.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Botanička obilježja vrsta roda <i>Juniperus</i> L.	2
1.1.1. <i>Juniperus communis</i> L.	3
1.1.2. <i>Juniperus oxycedrus</i> L.	4
1.1.3. <i>Juniperus phoenicea</i> L.	5
1.2. Bioaktivne sastavnice roda <i>Juniperus</i>	6
1.2.1. Eterična ulja	6
1.2.2. Flavonoidi	7
1.2.3. Trjeslovine	8
1.3. Pregled dosadašnjih istraživanja smrekinja vrsta <i>J. oxycedrus</i> i <i>J. phoenicea</i>	9
1.3.1. Fitokemijski sastav	9
1.3.2. Biološki učinci	10
1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	17
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Materijali	20
3.1.1. Istraživani biljni materijal	20
3.1.2. Instrumenti i pribor	21
3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije	21
3.2. Istraživanje flavonoida metodom tankoslojne kromatografije (TLC)	22
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola	23
3.3.1. Određivanje flavonoida	23
3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina	24
3.4. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja	25
3.4.1. Priprema uzoraka i standarda	25
3.4.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala	25
3.4.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)	26
3.4.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)	26
3.5. Statistička analiza	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Flavonoidi	29

4.1.1.	Kvalitativna analiza flavonoida	29
4.1.2.	Kvantitativna analiza flavonoida	32
4.2.	Ukupni polifenoli i trjeslovine	33
4.3.	Antioksidacijsko djelovanje	34
4.3.1.	Sposobnost hvatanja DPPH radikala	34
4.3.2.	Redukcijska sposobnost	36
4.3.3.	Kelirajuća aktivnost	38
4.3.4.	Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata smrekinja vrsta roda <i>Juniperus</i>	40
5.	ZAKLJUČCI	42
6.	LITERATURA	44
7.	SAŽETAK/SUMMARY	51
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

U novije vrijeme prisutan je sve veći znanstveni interes za istraživanjem ljekovitih biljnih vrsta kao potencijalnih novih fitoterapeutika ili izvora vodećih spojeva u otkrivanju novih lijekova. Hrvatska flora obiluje brojnim biljnim vrstama s ljekovitim potencijalom, među kojima su i vrste roda *Juniperus* L. (Cupressaceae). Iako se mnoge koriste u pučkoj medicini brojnih naroda, u suvremenoj farmaciji i medicini samo je vrsta *Juniperus communis* L. (borovica) službeno priznata kao ljekovita i služi za dobivanje oficinalnih droga *Juniperi galbulus* i *Juniperi aetheroleum*. Smrekinje i eterično ulje borovice se primjenjuju kod blagih urinarnih tegoba za poticanje diureze te kod probavnih tegoba dispepsije i nadutosti, a njihova uporaba temelji se na prisutnosti eteričnog ulja te drugih bioaktivnih sastavnica kao što su trjeslovine, flavonoidi i diterpenske kiseline (EMA/HMPC, 2010; EMA/HMPC, 2008; Wichtl, 2004). Znanstvenim je istraživanjima također utvrđeno da borovica djeluje hipoglikemijski, antimikrobno, protuupalno i antioksidacijski (Fierascu i sur., 2018; EMA/HMPC, 2008). Budući da dosadašnje znanstvene spoznaje upućuju na veliki biomedicinski potencijal vrsta roda *Juniperus*, u okviru ovog diplomskog rada istražene su odabrane vrste tog roda koje rastu u Hrvatskoj.

1.1. Botanička obilježja vrsta roda *Juniperus* L.

Rod *Juniperus* L. pripada porodici Cupressaceae, a čine ga zimzelena drvenasta stabla ili grmovi. Dvodomne ili jednodomne biljke. Listovi su nasuprotni ili skupljeni po 3 u pršljenu, igličasti ili ljuskavi (mladi listovi uvijek igličasti, dok su kod odraslih biljaka najčešće ili svi ljuskavi ili svi igličasti). Češeri smješteni u pazuškima listova ili vršno, sazrijevaju prvu, drugu ili treću godinu, obično okruglasti, nalik na bobu. Bobičasti češer sadrži 1-12 jajolikih ili duguljastih sjemenki (Tutin i sur., 1972).

1.1.1. *Juniperus communis* L.

Obična borovica je vazdazeleni grm ili stablo uspravnog rasta, visoko do 15 m (Slika 1). Listovi su dugi 10-20 mm, kruti, linearno bodljasti, strše, pri dnu odijeljeni, skupljeni po 3 u pršljenu, bez smolaste žlijezde. S gornje strane su plitko žlijebasti, s donje strane tupo hrptasti, a na licu imaju bijelu prugu. Dvodomna je biljka, ženska jedinka nosi ženske češere koji se sastoje od 3 sjemena zametka smještena na 3 plodnička lista, a obavijena su velikim brojem sterilnih ovojnih listova. Na muškoj se jedinki razvijaju muški češeri koji su građeni od brojnih ljuskastih prašničkih listova koji nose 3-4 peludnice. Na donjem dijelu osi muškog češera poredani su ljuskasti ovojni listovi. Cvate od travnja do lipnja. Oprašuje se vjetrom, a nakon oplodnje, iz 3 sjemena zametka razvijaju se 3 sjemenke, a 3 plodna lista srastu u mesnati ovoj pri čemu nastaje bobičasti češer (galbulus ili smrekinja). Češeri su okruglasti, promjera do 10 mm, a sazrijevaju u drugoj ili trećoj godini. Prvu godinu su zeleni, a kad sazriju su plavocrni. Na gornjoj strani uočljiv je trokraki šav nastao sraštavanjem plodničkih listova (Wichtl, 2004; Domac, 2002; Tutin i sur., 1972).

U Hrvatskoj ova biljka veoma je rasprostranjena u kopnenom podnožju velebitskog brdskog masiva. Raste u šikarama, na zapuštenim pašnjacima i travnjacima, ali i na kamenitim staništima (Forenbacher, 1990).



Slika 1. *Juniperus communis* L. (preuzeto s <http://calscape.org>)

1.1.2. *Juniperus oxycedrus* L.

Oštroigličasta borovica u narodu poznata kao primorska šmrika ili smrič je grm ili drvo visoko do 14 m (Slika 2). Naziv vrste potječe od grčke riječi *oxys* što u prijevodu znači bodljikav, dok *cedros* označava stablo. Krošnja je obično okruglasta, odrasle grane tvrde, a grančice bridaste. Listovi su dugi 15-20 mm, te su kao i kodobične borovce igličasti, strše, pri dnu odijeljeni, po 3 u pršljenu, bez smolaste žlijezde. S gornje strane imaju dvije odvojene blijedosive pruge, a s donje strane su oštro hrptasti. Često su žućkastozeleni s po više bobičastih češera zajedno. Dvodomna je biljka koja cvate u travnju i svibnju. Češer dozrijeva u drugoj godini i nosi po 3 duguljaste sjemenke. Sastavljen je od 3-6 sraslih ljusaka. Oblikom je okruglast do obrnuto jajast, promjera 6-15 mm, u početku zelene boje, no kad je zreo poprima crvenkasto-smeđubojnu i sjaj (Kovačević, 2008; Domac, 2002; Forenbacher, 1990; Tutin i sur., 1972).

Submediteranska i mediteranska vrsta, karakteristična za kamenjarske travnjake, bušike i makiju i manje šume. Prodire i duboko u kopno, gdje raste na toplim staništima. Mjestimično je veoma rasprostranjena tvoreći glavni sastav zimzelenog raslinja (Kovačević, 2008; Forenbacher, 1990).



Slika 2. *Juniperus oxycedrus* L. (preuzeto s <https://www.plantea.com.hr>)

1.1.3. *Juniperus phoenicea* L.

Fenička borovica poznata pod nazivom primorska somina ili gluhač je gusti grm ili nisko stablo visine do 8 m (Slika 3). Krošnja je okruglasto piramidalna, grane su brojne, isprepletene i izvijene na sve strane, a grančice duge i tanke. Mladi listovi su igličasti s malim oštrim vrhom i dvije pruge s obje strane, većinom su po 3 u pršljenu. Listovi odraslih biljaka ljuskasti, jajoliko-romboidni, tupi ili blago zašiljeni, prilegnuti uz grane. Često imaju smolastu žlijezdu na gornjoj strani. Fenička borovica je jednodomna, rijetko dvodomna biljka. Cvate od veljače do travnja. Bobičasti češerje okruglast, promjera 8-14 mm, sastavljen od 6-8 međusobno sraslih plodnih listića te sadrži 3-9 jajastih sjemenki. Sazrijeva u drugoj godini, a u zreloj fazi je sjajan, crvenkastosmeđe ili žućkastosmeđe boje (Kovačević, 2008; Domac, 2002; Tutin i sur., 1972).

Raste najčešće u obalnom, eumediteranskom vazdazelenom području, u sastavu kamenjarskih travnjaka, bušika i makije. U Hrvatskoj prevladava u Kvarnerskom primorju, sjevernoj, srednjoj i južnoj Dalmaciji (Kovačević, 2008).

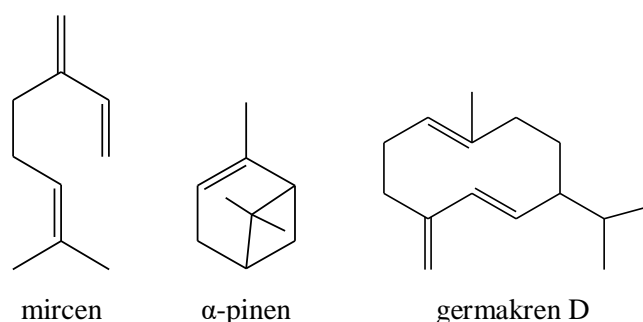


Slika 3. *Juniperus phoenicea* L. (preuzeto s <https://www.plantea.com.hr>)

1.2. Bioaktivne sastavnice roda *Juniperus*

1.2.1. Eterična ulja

Eterična ulja su hlapljivi i intezivno aromatični sekundarni biljni produkti. Smjese su velikog broja kemijskih spojeva od kojih su najzastupljeniji terpeni (90 %). Prema broju ugljikovih atoma terpeni se mogu svrstati u sedam skupina, a u eteričnim uljima su uglavnom prisutni monoterpeni (C₁₀) i seskviterpeni (C₁₅) (Slika 4). Ostale sastavnice pripadaju uglavnom fenilpropanskim derivatima, lančanim ugljikovodicima te spojevima s dušikom i sumporom. No, uvijek je samo nekoliko sastavnica prisutno u većoj količini, a one određuju mirisna i fizikalno-kemijska svojstva eteričnog ulja i njegovo farmakološko djelovanje. Eterična ulja se dobivaju destilacijom, ekstrakcijom ili tiještenjem iz različitih biljnih droga. Svježe izolirana eterična ulja su većinom bistre, bezbojne do blijedožučkaste tekućine, a samo manji dio njih je obojen. Najčešće ih karakterizira vrlo jak i oštar paleći okus koji razrjeđivanjem postaje ugodan. Dobro se otapaju u lipofilnim otapalima, a teško su topljiva u vodi i većinom lakša od vode. Eterična ulja optički su aktivna (Hänsel i Sticher, 2004).

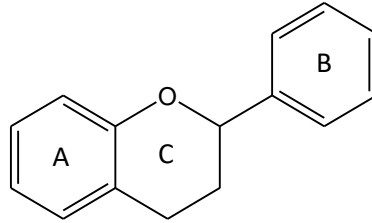


Slika 4. Terpenske sastavnice eteričnih ulja

Znanstvenim istraživanjima utvrđen je širok spektar bioloških učinaka eteričnih ulja što ukazuje na njihov veliki terapijski potencijal. Eterična ulja pokazuju antibakterijski, antifungalni, antiviralni, anthelmintični i repelentni učinak. Mogu se primijeniti kao ekspektoransi, mukolitici i spazmolitici. Imaju sedativni, antinociceptivni, protuupalni, analeptični, kao i antioksidacijski, antikancerogeni i antimutageni učinak. Međutim, eterična ulja pokazuju i neke neželjene učinke. Mogu izazvati alergiju, djelovati abortivno, nefrotoksično ili hepatotoksično, a nekim se eteričnim uljima pripisuju kancerogena, narkotična i fotosenzibilizirajuća svojstva (Saad i sur., 2013; Adorjan i Buchbauer, 2010; Pisseri i sur., 2008).

1.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu biljnih polifenola s više od 6000 identificiranih struktura. Osnovnu strukturu flavonoida čine dvije benzenske jezgre povezane s propanskim lancem (C₆-C₃-C₆) koji uglavnom s atomom kisika čini piranski prsten (Slika 5).



Slika 5. Osnovna struktura flavonoida

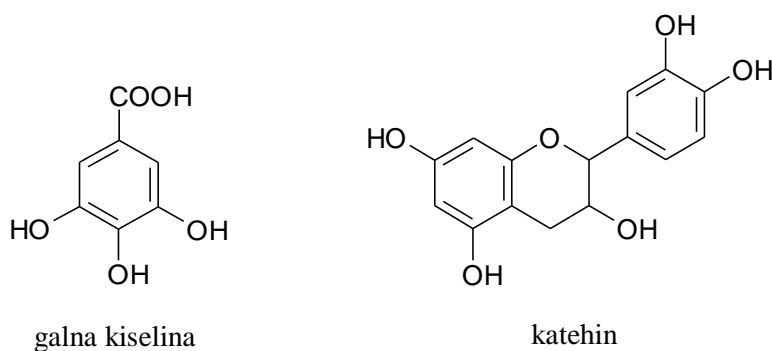
Biosintetiziraju se kombinacijom puta šikiminske kiseline i acilpolimalonatnog puta. Ovisno o tipu heterocikla koji je uključen u strukturi flavonoida, možemo ih podijeliti u 6 podskupina: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavonoidi. Navedena podjela se primarno temelji na prisutnosti (ili odsutnosti) dvostruke veze na položaju 4 središnjeg (C) prstena, zatim dvostrukoj vezi između C2 i C3 središnjeg (C) prstena te hidroksilnim skupinama na B prstenu. Flavone karakterizira prisutnost dvostruke veze između C2 i C3 atoma heterocikličkog prstena. Benzenski prsten (B) vezan je na C2 atom dok C3 uglavnom nije supstituiran. Flavonoli na položaju C3 središnjeg prstena imaju hidroksilnu skupinu, dok flavononi imaju zasićeni heterociklički prsten. Oba navedena svojstva su prisutna u strukturi flavanola. Antocijanidini su pozitivno nabijeni u kiselom pH i taj ravnotežni oblik se naziva flavilium kation. Za razliku od flavonoida kod kojih je benzenski prsten (B) vezan s piranskim prstenom preko C2 atoma, kod izoflavonoida je smješten na C3 atomu.

Flavonoidi se u prirodi rjeđe pojavljuju u slobodnom obliku, uglavnom su glikozidno vezani i dolaze najčešće kao O-glikozidi, kod kojih je šećerna komponenta (glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza, rutinoza, neohesperidoza, itd.) vezana na hidroksilnu skupinu aglikona na poziciji C3 ili C7 (Vladimir-Knežević i sur., 2012).

U skladu s raznolikom kemijskom strukturom flavonoida, dokazani su i brojni biološki učinci na kojima se temelji uporaba droga s flavonoidima. Pojednim flavonoidima znanstveno je dokazano antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno, antivirusno, protutumorsko, antidijabetično, kardioprotektivno, antitrombozno, estrogeno te spazmolitičko djelovanje (Chen i sur., 2015; Kumar i Pandey, 2013; Romano i sur., 2013).

1.2.3. Trjeslovine

Trjeslovine su su izrazito heterogena skupina polifenolnih spojeva prisutna u gotovo svim biljnim vrstama. One čine dvije osnovne skupine, trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini, elagnatanini) i kondenzirane (katehinske) trjeslovine. Prva skupina trjeslovina obuhvaća tanine i depside. Tanini su esteri galne kiseline (Slika 6) ili esterskih anhidrida više galnih kiselina sa šećerom, dok depsidi predstavljaju esterski vezane fenolne kiseline. Proantocijanidini ili kondenzirane trjeslovine su flavanski polimeri u kojima su jedinice flavan-3-ola povezane C-C vezom, najčešće 4→8 ili 4→6. Glavni strukturni elementi proantocijanidina su primjerice katehin (Slika 6), epikatehin, galokatehin, epigalokatehin te fisetidin (Bruneton, 1999).



Slika 6. Osnovni strukturni elementi galotanina i katehinskih trjeslovina

Droge s trjeslovinama se najčešće primjenjuju kao adstrigensi i antidijsaroići (Bruneton, 1999). Također je znanstveno dokazano da su trjeslovine biološki vrlo aktivni spojevi koji posjeduju antivirusnu, antibakterijsku, antioksidacijsku, antidijabetsku i protutumorsku aktivnost (Serrano i sur., 2009; Zhang i sur., 2009).

1.3. Pregled dosadašnjih istraživanja smrekinja vrsta *J. oxycedrus* i *J. phoenicea*

1.3.1. Fitokemijski sastav

Eterična ulja

Dosadašnjim istraživanjima eteričnog ulja vrste *J. oxycedrus* obuhvaćen je jedan uzorak sa Sardinije i više uzoraka s pet lokacija na Kosovu (Hajdari i sur., 2014; Cosentino i sur., 2003). Glavni spojevi talijanskog uzorka su bili α -pinen (70 %), germakren D (11 %) i mircen (10 %) dok su u eteričnim uljima sa Kosova najzastupljenije sastavice redom bile: mircen (46-57 %), α -pinen (10-37 %), limonen (4-14 %) i germakren D (2-9 %). Sastava eteričnog ulja taksona *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* bio je predmetom najvećeg broja istraživanja. Uzorci iz jugozapadnog dijela Azije (Turska i Libanon) su sadržavali najviše mircena, α - i β -pinena i germakrena D (Alan i sur., 2016; Hayta i Bagci, 2014; Loizzo i sur., 2007; Valentini i sur., 2003). Eterična ulja izolirana iz smrekinja sakupljenih na dva susjedna otoka Sredozemnog mora, Korzici i Sardiniji, te u Portugalu pokazali su međusobno sličan sastav te su glavni spojevi bili α -pinen, mircen i germakren D (Cavaleiro i sur., 2006; Boti i sur. 2004.; Angioni i sur., 2003). Marongiu i sur. (2003) su izolirali eterično ulje iz smrekinja sa Sardinije superkritičnom ekstrakcijom te su α -pinen, mircen i germakren D također bili najzastupljenije sastavnice, ali njihov udio (8-14 %) se razlikovao od sadržaja u eteričnim uljima dobivenim destilacijom vodenom parom. Također je istražen sastav eteričnih ulja drugih taksona vrste *J. oxycedrus*. α -pinen i mircen su bili glavni spojevi ulja izoliranog iz smrekinja taksona *J. oxycedrus* subsp. *badia* španjolske flore (Velasco-Negueruela i sur., 2003). Eterično ulje smrekinja vrste *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* talijanskog porijekla je sadržavalo najviše α -pinena (Valentini i sur., 2003), dok je uzorak iz Tunisa uz α -pinen sadržavao i značajnu količinu germakrena D (Hanene i sur., 2012).

Istražen je sastav eteričnog ulja smrekinja vrste *J. phoenicea* sakupljenih u Tunisu i Egiptu. Najzastupljeniji spoj svih eteričnih ulja je bio α -pinen (39-81 %), a ostale zastupljene sastavnice su bile sabinen, kamfen, trans-verbenol, δ -3-karen, γ -kadinen i germakren B (Yvon i sur., 2012; Medini i sur., 2011; Ennajar i sur., 2009; El-Sawi i sur., 2007). Ennajar i sur. (2010) su ispitali utjecaj vegetacijskog razdoblja i načina sušenja na udio i sastav eteričnog ulja vrste *J. phoenicea* te se pokazalo da najviše α -pinena imaju smrekinje sakupljene u rujnu.

Najveći udio α -pinena također je određen u eteričnom ulju smrekinja taksona *J. phoenicea* subsp. *turbinata* sa Sardinije i iz Portugala. Među ostalim zastupljenim sastavnicama su bili δ -3-karen, mircen i β -felandren (Cavaleiro i sur., 2006; Angioni i sur., 2003; Cosentino i sur., 2003).

Polifenolni spojevi

Polifenolne sastavnice smrekinja vrsta *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* vrlo su slabo istražene. Primjenom HPLC-TOF-MS analize utvrđeno da su rutin i katehin bili glavne fenolne sastavnice metanolnih ekstrakata listova i smrekinja taksona *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* (Sahin Yaglioglu i Eser, 2017). Taviano i sur. (2013) su ispitali fitokemijski sastav metanolnih ekstrakata zrelih smrekinja dvaju taksona *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* iz turske flore. Kupresoflavon i amentoflavon su bili najzastupljeniji spojevi u ispitivanim ekstraktima (HPLC-DAD-ESI-MS). Šikiminska kiselina, glukozidi ferulične i oleuropeinske kiseline su izolirani iz n-butanolne aktivne frakcije smrekinja vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Orhan i sur., 2012). Lesjak i sur. (2014.) su ispitali fitokemijski sastav vrste *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* sakupljene na Hvaru. LC-MS-MS analizom je utvrđeno da su u ekstraktima najzastupljenije polifenolne sastavnice flavonoidi. U smrekinjama je određen najveći udio amentoflavona, apigenina i rutina.

Aboul-Ela i sur. (2005) su u sklopu istraživanja hepatoprotektivnog učinka smrekinja vrste *J. phoenicea* izolirali 2 flavonoida skutelarein, izoskutelarein, šikiminsku kiselinu i jedan derivat palmitinske kiseline.

1.3.2. Biološki učinci

Antioksidacijski učinak

Ispitano je antioksidacijsko djelovanje polarnih ekstrakata i eteričnih ulja smrekinja i listova vrste *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* sakupljene na Hvaru. Listovi su pokazali bolju djelotvornost u odnosu na smrekinje. Ekstrakt smrekinja je pokazao slabu antiradikalnu aktivnost (DPPH \cdot , OH \cdot , O $_2^{\cdot-}$, NO \cdot) i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije, a dobru redukcijsku moć dok je eterično ulje smrekinja učinkovito inhibiralo lipidnu peroksidaciju (Lesjak i sur., 2014).

Ispitana je antioksidacijska aktivnost metanolnih ekstrakata zrelih smrekinja dvaju taksona vrste *J. oxycedrus* iz turske flore. Ekstrakt vrste *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* je pokazao bolju sposobnost hvatanja DPPH radikala i inhibicije lipidne peroksidacije, dok je za vrstu *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* ustanovljena bolja kelirajuća aktivnost i redukcijaska moć (Taviano i sur., 2013).

Hanène i sur. (2012) su ispitali antiradikalnu aktivnost eteričnog ulja zrelih i nezrelih smrekinja vrsta *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* i *J. oxycedrus* subsp. *rufescens* sakupljenih na četiri lokacije u Tunisu. Eterično ulje zrelih smrekinja je pokazalo bolju sposobnost hvatanja DPPH i ABTS⁺ radikala nego eterično ulje nezrelih plodova.

Öztürk i sur. (2011) su istražili antioksidacijski učinak različitih ekstrakata smrekinja šest vrsta roda *Juniperus* iz turske flore u sustavu β-karoten-linolna kiselina. Acetonski ekstrakt vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i metanolni ekstrakt vrste *J. phoenicea* su učinkovito inhibirali oksidaciju linolne kiseline s IC₅₀ vrijednostima 31 μg/mL i 36 μg/mL.

Ispitana je sposobnost hvatanja DPPH radikala eteričnih ulja vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* sakupljene u Libanonu. Eterično ulje izolirano iz kore pokazalo je bolju aktivnost (IC₅₀ = 1,4 μL/mL) nego eterično ulje smrekinja (IC₅₀ = 7,4 μL/mL) (Loizzo i sur., 2007).

Antioksidativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata različite polarnosti smrekinja i listova vrste *J. phoenicea* iz Tunisa ispitana je koristeći metode hvatanja DPPH i ABTS⁺ radikala. Općenito su listovi pokazali bolju antiradikalnu aktivnost te je najbolje djelovao metanolni ekstrakt s IC₅₀ vrijednošću 6,5 μg/mL. Jedino je eterično ulje smrekinja pokazalo bolju sposobnost hvatanja ABTS⁺ radikala (IC₅₀ = 87 μg/mL) u odnosu na ulje listova. (Ennajar i sur., 2009). Dodatno je ispitan utjecaj vegetacijskog razdoblja i načina sušenja na antiradikalnu aktivnost eteričnih ulja smrekinja i listova vrste *J. phoenicea*. Najbolju sposobnost hvatanja ABTS⁺ radikala (IC₅₀ = 42 μg/mL) je pokazalo eterično ulje smrekinja sakupljenih u lipnju i osušenih na sobnoj temperaturi uz zaštitu od svjetlosti (Ennajar i sur., 2010).

Antimikrobni učinak

Cavalerio i sur. (2006) su ispitali antifungalnu aktivnost smrekinja i/ili listova tri vrste roda *Juniperus* s područja Portugala te sastavnica eteričnog ulja vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, α-pinena i δ-3-karena. Metodom makrodilucije su ispitali učinak na nekoliko komercijalno dostupnih te na većem broju kliničkih izolata dermatofita, *Candida* i *Aspergillus*

vrsta. Sva testirana eterična ulja su inhibirala rast dermatofita, dok je samo eterično ulje listova vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* pokazalo sposobnost inhibicije *Candida* i *Aspergillus* sojeva.

Cosentino i sur. (2003) su ispitali antimikrobni učinak eteričnih ulja smrekinja vrsta roda *Juniperus* koje rastu na Sardiniji: *J. communis*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* subsp. *turbinata*. Eterična ulja vrsta *J. communis* i *J. oxycedrus* nisu djelovala antimikrobno, dok je eterično ulje vrste *J. phoenicea* subsp. *turbinata* inhibiralo rast gljivica, osobito vrste *Aspergillus flavus*.

Istražen je antimikrobni učinak eteričnih ulja i ekstrakta različite polarnosti vrste *J. phoenicea* sakupljene u Tunisu metodom difuzije. Eterično ulje smrekinja je slabije djelovalo u odnosu na ulje dobiveno iz listova. Zone inhibicije (ZI) za ekstrakte su bile u rasponu od 11 mm do 34 mm, a najbolju aktivnost su pokazali metanolni ekstrakti. Među Gram-pozitivnim mikroorganizmima najosjetljiviji je bio *B. subtilis* dok je najosjetljivija Gram-negativna bakterija bila je *P. aeruginosa*. Najveća vrijednost ZI za gljivice određena je za *M. ramannianus* (Ennajar i sur., 2009).

Ispitana je antimikrobna aktivnost eteričnih ulja vrste *J. phoenicea* s područja Egipta metodom difuzije i dilucije. Uočeno je da eterično ulje listova ima bolju aktivnost od ulja smrekinja. Visoke MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) vrijednosti dobivene za eterično ulje smrekinja (4-111 mg/mL) ukazale su na njegovu slabu sposobnost inhibicije testiranih mikroorganizama (El-Sawi i sur., 2007).

Antiviralni učinak

Eterično ulje smrekinja vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* je pokazalo antiviralni učinak na *Herpes simplex* virus tip 1 ($IC_{50} = 200 \mu\text{g/mL}$) i koronavirus koji uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom ($IC_{50} = 270 \mu\text{g/mL}$) (Loizzo i sur., 2008).

Ekstrakt vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* dobiven superkritičnim CO_2 je djelovao antiviralno na Poliovirus-1. Ekstrakt dobiveno na 90 bara je pokazao učinak dok onaj dobiven na 200 bara nije (Marongiu i sur., 2003).

Protuupalni učinak

Ispitano je protuupalno djelovanje ekstrakata i eteričnih ulja smrekinja i listova vrste *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa* sakupljene na Hvaru. Ekstrakt smrekinja je ostvario najbolji protuupalni učinak na temelju povećanja stvaranja prostaglandina PGE₂ (Lesjak i sur., 2014). Orhan i sur. (2012) su ispitali protuupalni i antinociceptivni učinak smrekinja i listova vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* sakupljene u Turskoj. Frakcije različite polarnosti dobivene iz etanolnog ekstrakta testirane su u dozi od 100 mg/kg na eksperimentalnim modelima u miševa: karagenanom uzrokovan edem šape i test grčenja izazvan p-benzokinonom. Najveću djelotvornost u oba testa pokazala je butanolna frakcija smrekinja bez uzrokovanja oštećenja želuca ili vidljive akutne toksičnosti.

Tumen i sur. (2012) su ispitali učinak na zacjeljivanja rana i protuupalno djelovanje eteričnih ulja češera nekoliko svojiti rodova *Cupressus* i *Juniperus*. Najbolju sposobnost zacjeljivanja rana je pokazala topikalna primjena masti s 1 % eteričnih ulja vrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. phoenicea*. U tkivu životinja tretiranih ovim uljima uočeno je povećanje sadržaja aminokiseline hidroksiprolin koja je važan za sintezu kolagena. Eterična ulja vrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. phoenicea* su također pokazala najbolju protuupalnu aktivnost te su u dozi od 200 mg/kg inhibirali kapiralnu permeabilnost.

Ispitan je protuupalni i antinociceptivni učinak metanolnih i vodenih ekstrakata različitih organa pet vrsta roda *Juniperus* s područja Turske. Protuupalni učinak je ispitan na modelu edema šape dok je antinociceptivni učinak ispitan testom grčanja i vruće ploče. Metanolni ekstrakti smrekinja i listova vrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. communis* var. *saxatillis* u dozi od 100 mg/kg su pokazali najveću djelotvornost (Akkol i sur., 2009).

Antitumorski učinak

Sahin Yaglioglu i Eser (2017) su ispitali antitumorski učinak metanolnih ekstrakata smrekinja i listova vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* u sklopu istraživanja četiri vrste roda *Juniperus* iz turske flore. Ekstrakt smrekinja je pokazao antiproliferacijski učinak na stanicama humanog karcinoma cerviksa (HeLa) (IC₅₀ = 78 µg/mL) i karcinoma mozga štakora (C6) (IC₅₀ = 34 µg/mL).

Ispitan je citotoksični učinak butanolne frakcije polarnog ekstrakta smrekinja vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* na staničnim linijama melonoma(A375), dojke (MCF-7) i pluća (H460). Testirana frakcija je jedino inhibirala rast tumorskih stanica dojke, a za učinak je bila

odgovorna šikiminska kiselina. Osim što je inhibirala rast MCF-7 stanica ($IC_{50} = 30 \mu M$), šikiminska kiselina je također uzrokovala smanjenje razine vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i pet proupalnih citokina što upućuje na njeno protuupalno djelovanje (De Marino i sur., 2014).

Ispitan je citotoksični učinak eteričnih ulja listova i smrekinja vrste *J. phoenicea* sakupljene u Egiptu. Oba eterična ulja su pokazala djelotvornost na svim testiranim tumorskim staničnim linijama. Pokazali su jednaku aktivnost na tumorskim stanica mozga ($IC_{50} = 0,6 \mu g/mL$) i cerviksa ($IC_{50} = 5,0 \mu g/mL$), dok je eterično ulje smrekinja bolje djelovalo na tumorske stanice pluća, jetre i dojke (IC_{50} : 0,6-0,8 $\mu g/mL$) (El-Sawi i sur., 2007).

Hepatoprotektivni učinak

Laouar i sur. (2017) su istražili hepatoprotektivna svojstva smrekinja vrste *J. phoenicea* korištenjem tetraklorougljikom (CCl_4) izazvanog oštećenja jetre u štakora. Vodeni ekstrakt je primijenjen u dozi od 250 mg/kg/dan tijekom 12 dana. Rezultati praćenih biokemijskih parametara u plazmi (aktivnost aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), laktat dehidrogenaze i alkalne fosfataze (ALP), te razina ukupnog bilirubina, albumina i ukupnih proteina) i tkivu jetre (razina lipidne peroksidacije, reduciranog glutaciona, aktivnosti glutacion peroksidaze) kao i histopatoloških ispitivanja pokazala su da tretiranje ekstraktom značajno smanjuje hepatotoksičnost u štakora. Dobiveni rezultati su pokazali da vrsta *J. phoenicea* djeluje hepatoprotektivno i da se taj učinak najvjerojatnije može povezati s njenim antioksidacijskim svojstvima.

Hepatoprotektivno djelovanje vodenog dekokta smrekinja vrste *J. phoenicea* ispitivano je na štakorima čija je jetra oštećena tioacetamidom. Životinje su tijekom 6 tjedana dobivale ekstrakt vrste *J. phoenicea* oralno u dozi od 250 mg/kg/dan. Procijenjen je učinak na aktivnost jetrenih enzima, razinu malonaldehida, ukupnog bilirubina, albumina i dva citokina (TNF- α i TGF- β 1) u krvi. Također je ispitan učinak na biokemijske parametre u tkivu jetre koji ukazuju na razinu lipidne peroksidacije i fibroze jetre. Primjena ekstrakta je dovela do poboljšanja svih praćenih biokemijskih parametara, ukazujući na dobar hepatoprotektivni učinak vrste *J. phoenicea* koji je bio usporediv s djelovanjem silimarina (Aboul-Ela i sur., 2005).

Antidijabetički učinak

Procijenjen je antidijabetički učinak *in vitro* vrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. communis* var. *saxatilis* na temelju inhibicije α -glukozidaze i α -amilaze. Istražena je aktivnost vodenih i vodeno-etanolnih ekstrakata listova i smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus*. Vodeno-etanolni ekstrakt smrekinja vrste *J. communis* var. *saxatilis* je najjače inhibirao aktivnost α -glukozidaze ($IC_{50} = 4,4 \mu\text{g/mL}$), dok je vodeno-etanolni ekstrakt listova vrste *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* pokazao najveći potencijal za inhibiciju α -amilaze (Orhan i sur., 2014).

Antidijabetičko djelovanje ekstrakta smrekinja vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* ispitano je na modelu dijabetesa u štakora nakon primjene streptozotocina. Biotestovima vođena izolacija je pokazala da se učinak u velikoj mjeri može pripisati šikiminskoj kiselini, glavnoj sastavnici aktivne subfrakcije dobivene iz etanolnog ekstrakta smrekinja. Nakon 8 dana uzimanja šikiminske kiseline značajno je snižena razina glukoze u krvi, malondialdehida u bubrežnom tkivu kao i razina jetrenih enzima (ALT, AST i ALP). Šikiminska kiselina je u dozi od 30 mg/kg pokazala bolji učinak od referentnog lijeka glipizida (Orhan i sur., 2012).

Orhan i sur. (2011) su ispitali antidijabetičko djelovanje ekstrakata smrekinja i listova vrste *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* u *in vivo* uvjetima na modelu dijabetesa induciranog streptozotocinom u štakora. Ekstrakti su primjenjeni u dozama od 500 mg/kg i 1000 mg/kg te su razine glukoze u krvi izmjerene prvi, četvrti, sedmi i deseti dan eksperimenta. Utvrđeno je da primjena istraživanih ekstrakata ima povoljan učinak na dijabetes kod štakora što je vidljivo na temelju smanjene razine glukoze u krvi, lipidne peroksidacije u jetri i bubregu te povećane koncentracije Zn u jetri.

Neuroprotektivni učinak

Öztürk i sur. (2011) su usporedno ispitali učinak različitih ekstrakata smrekinja šest vrsta roda *Juniperus* iz turske flore na aktivnost enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Najbolju sposobnost inhibicije enzima su pokazali heksanski ekstrakti vrsta *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* i *J. phoenicea* ostvarujući učinak iznad 75 % pri koncentraciji od 200 $\mu\text{g/mL}$. Sposobnost inhibicije kolinesteraza je ukazala na potencijal u prevenciji i liječenju Alzheimerove i drugih neurodegenerativnih bolesti.

1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi

U posljednje vrijeme veliki interes znanstvenika usmjeren je na istraživanje ljekovitih biljnih vrsta kao izvora novih antioksidansa. Smatra se da njihova primjena ima potencijal u prevenciji i liječenju oboljenja povezanih s oksidacijskim stresom. Oksidacijski stres se definira kao neravnoteža između stvaranja i eliminacije slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva koji nastaju redoks reakcijama tijekom normalnog staničnog metabolizma ili kao rezultat negativnih utjecaja vanjskih čimbenika. Znanstveno je dokazano da upravo ta neravnoteža vodi do oksidacije biološki važnih makromolekula (proteini, lipidi, ugljikohidrati i DNA), a posljedično i do oštećenja i smrti stanica. Oksidacijski stres ima ključnu ulogu u nastanku i razvoju brojnih bolesti kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne i upalne bolesti, karcinom i dijabetes te i samog procesa starenja.

Tijekom evolucije organizam je razvio sustav antioksidacijske obrane, koji može biti enzimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) i neenzimski (vitamin C i E, glutation). S obzirom da endogeni zaštitni sustav ne može uvijek obraniti organizam od oksidacijskog stresa kojem je izložen, u novije vrijeme veliku popularnost stječu egzogeni antioksidansi prirodnog porijekla. Velik broj znanstvenih radova objavljenih u posljednjih nekoliko godina ističu polifenole kao prirodne spojeve snažnih antioksidacijskih svojstava. Glavni mehanizmi putem kojih polifenoli ostvaruju svoj antioksidacijski učinak i na taj način sprječavaju oštećenja biološki značajnih molekula su sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, sprječavanje njihovog nastajanja putem keliranja metalnih iona, redukcijaska sposobnost, inhibicija lipidne peroksidacije, regulacija obrambenih enzima i djelovanja na stanične signalne puteve i ekspresiju gena (Kindl i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Hrvatska flora obiluje brojnim biljnim vrstama s velikim ljekovitim potencijalom, od kojih su mnoge znanstveno vrlo slabo ispitane. Među njima su i vrste roda *Juniperus* koje se koriste u pučkoj medicini brojnih naroda, a samo je vrsta *J. communis* službeno priznata kao ljekovita. Farmakopejske droge Juniperi galbulus i Juniperi aetheroleum (smrekinje i eterično ulje vrste *J. communis*) koriste se u suvremenoj fitoterapiji za poticanje diureze te kod probavnih tegoba. U okviru ovog diplomskog rada po prvi put je istražen fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje polifenola u smrekinjama vrsta *J. oxycedrus* L. i *J. phoenicea* L. koje rastu u Hrvatskoj te su sva ispitivanja provedena u usporedbi s drogom Juniperi galbulus.

Provedena su istraživanja sa sljedećim ciljevima:

- ➔ provesti usporedno fitokemijsko istraživanje polifenolnih sastavnica u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus*
 - primjenom tankoslojne kromatografije (TLC) provesti kvalitativnu analizu flavonoida,
 - spektrofotometrijskim metodama odrediti sadržaj ukupnih polifenola, trjeslovina i flavonoida,
- ➔ ispitati antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus* primjenom spektrofotometrijskih metoda:
 - odrediti sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala,
 - ispitati moć redukcije iona željeza(III),
 - istražiti sposobnost keliranja iona željeza(II).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Istraživani biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korištene su zrele smrekinje triju vrsta roda *Juniperus* L. (Cupressaceae) (Tablica 1). Češeri vrsta *Juniperus oxycedrus* L. i *Juniperus phoenicea* L. sakupljeni su u studenom 2017. godine na Dugom otoku. Bobičasti češeri borovice (*Juniperus communis* L.) dobiveni su od tvrtke Suban (Strmec Samoborski). Identifikacija biljnog materijala provedena je na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 2002; Tutin i sur., 1972). Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku pri sobnoj temperaturi, uz zaštitu od svjetlosti.

Tablica 1. Istraživani biljni materijal

Biljna vrsta	Fotografija zrelih smrekinja
<i>Juniperus communis</i> L.	
<i>Juniperus oxycedrus</i> L.	
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	

3.1.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- inkubator (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) silikagel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakuum uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar *Helios γ* (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2-aminoetil-difenilborat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- butanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- etanol 96 % p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etilformijat ≥ 97 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ferozin (dinatrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev heksacijanoferat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kloridna kiselina 37 % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- mravlja kiselina 98-100 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina $\geq 99,5$ % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- pirogolol 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska)
- trikloroctena kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija)
- troloks ≥ 98 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- željezov(III) klorid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- željezov(II) klorid (Fluka, Buchs, Švicarska)

3.2. Istraživanje flavonoida metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

Na zraku osušene smrekinje vrsta roda *Juniperus* samljevene su u prah. Uzeto je po 1 g praškastog uzorka i ekstrahirano 10 minuta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 60 °C, uz povratno hladilo. Dobiveni filtrati korišteni su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti flavonoida. Otopine standardnih flavonoidnih glikozida (rutin, izokvercitrin i kvercitrin) i flavonoidnih aglikona (luteolin i apigenin) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05 % (Wagner i Blatt, 2009).

TLC analiza flavonoida provedena je na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄, na koje su pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) naneseni uzorci i otopine standarda (10 μ L). Kao pokretna faza za odjeljivanje flavonoidnih glikozida korištena je smjesa etil-acetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1 (V/V/V) (Blažeković i sur., 2006). Također, ispitana je prisutnost flavonoidnih aglikona primjenom smjese otapala toluen-etil-formijat-mravlja kiselina 5:4:1 (V/V/V). Odjeljene sastavnice detektirane su prije i nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff-reagensom (1 %-tna metanolna otopina 2-aminoetil-difenilborata i 5 %-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000, NST/PEG), promatranjem ploče pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i Blatt, 2009).

3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola

3.3.1. Određivanje flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u istraživanim biljnim uzorcima provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku (EDQM, 2018). Biljni materijal usitnjen u prah (1,000-4,000 g) stavljen je u tikvicu okruglog dna od 100 mL. Dodano je 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L), te je sadržaj zagrijavan 30 minuta na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Hidrolizat je filtriran preko malo pamuka, a ostaci droge u tikvici i na pamuku ponovno su ekstrahirani dva puta s 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati filtrirani su preko filter-papira uz ispiranje tikvice i filter-papira, te je otopina razrijeđena acetonom do 100,0 mL. U lijevak za odjeljivanje preneseno je 20,0 mL acetonskog ekstrakta i pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku prvo je izmućkivan s 15 mL etil-acetata, a zatim još tri puta s po 10 mL etil-acetata. Sjedinjeni etil-acetatni slojevi isprani su dva puta s 50 mL vode. Nakon toga sjedinjeni etilacetatni sloje filtrirani su preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te je sadržaj nadopunjen etil-acetatom do oznake. Ispitivana otopina rađena je miješanjem 10,0 mL dobivenog etil-acetatnog ekstrakta s 1,0 mL reagensa aluminijevog klorida (2,0 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline) u odmjernoj tikvici od 25,0 mL i razrijeđenjem s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake. Za pripremu poredbene otopine 10,0 mL etil-acetatnog ekstrakta je razrjeđeno do 25,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je nakon 30 minuta na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je prema izrazu:

$$\% \textit{flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

gdje *A* predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 425 nm, a *m* masu droge u gramima.

3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina

Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u plodovima ispitivanih vrsta roda *Juniperus* određen je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku opisanom u literaturi (EDQM, 2018). Po 2,000 g (*J. communis* i *J. phoenicea*) ili 4,000 g (*J. oxycedrus*) praškasto usitnjenog biljnog materijala pomiješano je u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode. Sadržaj tikvice ekstrahiran je 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt ohlađen je pod tekućom vodom, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu, razrijeđen destiliranom vodom do 250,0 mL te profiltriran. Prvih 50 mL filtrata se baci dok se ostatak filtrata uzima za analizu. Za određivanje ukupnih polifenola 5,0 mL filtrata se razrijedi vodom do 25 mL. Potom se 2,0 mL te otopine pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL. Sadržaj se nadopni otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Apsorbacija se mjeri nakon 30 minuta na 760 nm (A_1), uz vodu kao poredbenu otopinu. Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninskih polifenola), u 10,0 mL filtrata dodano je 0,1000 g kožnog praška i sadržaj tikvice snažno je mućkan tijekom 60 minuta na laboratorijskoj tresilici. Nakon filtriranja, 5,0 mL dobivenog filtrata razrijedi se vodom do 25,0 mL. Potom se 2,0 mL te otopine pomiješa u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode. Sadržaj tikvice se zatim nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Apsorbancija je izmjerena nakon 30 min na 760 nm (A_2), uz vodu kao poredbenu otopinu. Standardna otopina pirogalola pripravljena je otapanjem 50,0 mg pirogalola u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100,0 mL. Zatim je 5,0 mL dobivene otopine razrijeđeno vodom do 100,0 mL. U odmjernoj tikvici od 25,0 mL, alikvot od 2 mL dobivene otopine pomiješan je s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode te je sadržaj tikvice nadopunjen do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbancija na 760 nm (A_3), uz vodu kao poredbenu otopinu. Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ trjeslovina} = 62,5 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je m_1 masa ispitivanog uzorka u gramima, a m_2 masa pirogalola u gramima.

3.4. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja

3.4.1. Priprema uzoraka i standarda

U svrhu istraživanja antioksidacijskog djelovanja 10,00 g praškasto usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 100 mL 70 %-tnog etanola i ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 minuta. Nakon filtriranja preko Büchnerovog lijevka biljnom materijalu je dodana nova porcija od 100 mL istog otapala te je ekstrakcija ponovljena. Dobiveni filtrati su sjedinjeni, a otapalo je upareno pomoću rotacijskog vakuum-uparivača. Tikvica s ekstraktom ostavljena je još jedan dan u eksikatoru, potom izvagana te ekstrakt čuvan u hladnjaku na 4 °C. Iskorištenja dobivenih ekstrakata bila su prema navedenom nizu: *J. communis* (48,1 %), *J. oxycedrus* (35,1 %) i *J. phoenicea* (22,0 %).

Neposredno prije ispitivanja pripremljene su osnovne otopine *Juniperus* ekstrakata iz kojih su dvostrukim serijskim razrjeđivanjem dobiveni nizovi testiranih koncentracija. Na isti način su pripremljene otopine standarda kvercetina, troloksa i etilendiamin tetraoctene kiseline (EDTA).

3.4.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (antiradikalna aktivnost) istražena je spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Kindl i sur. (2015). U tu svrhu *Juniperus* ekstrakti te troloks i kvercetin, kao referentni antioksidansi, otopljeni su u etanolu (96 % V/V) te su pripremljeni nizovi testiranih koncentracija u rasponu od 1,6 µg/mL do 100 (800) µg/mL za ekstrakte i od 0,2-100 µg/mL za čiste spojeve. U epruvete s 1,5 mL etanolnih otopina uzoraka različitih koncentracija dodano po 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM etanolne otopine DPPH radikala i sadržaj je snažno promućkan. Reakcijska smjesa je inkubirana pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu tijekom 30 min, a potom je izmjerena apsorbancija ispitivanih otopina na valnoj duljini od 517 nm, uz 96 % etanol kao slijepu probu. Niža vrijednost apsorbancije upućivala je na veće antioksidacijsko djelovanje. Sposobnost hvatanja DPPH radikala, izražena u postocima, izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ DPPH antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (etanola), dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za apsorbanciju samog uzorka.

3.4.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)

Sposobnost redukcije iona željeza(III) za ekstrakte biljnih vrsta roda *Juniperus* te referentne antioksidanse troloks i kvercetin ispitana je primjenom metode opisane u radu Kindl i sur. (2015). Serijskim razrjeđivanjem priređen je koncentracijski niz biljnih uzoraka u rasponu od 3,1-200 $\mu\text{g/mL}$, dok su za troloks i kvercetin rađeni koncentracijski nizovi od 0,8-50 $\mu\text{g/mL}$. U 1,0 mL uzorka dodano je 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 2,5 mL 1 %-tne otopine kalijeva heksacijanoferata, a potom je smjesa inkubirana 20 minuta na 50 °C. Zatim je u smjesu dodano 2,5 mL 10 %-tne trikloroetene kiseline te je uzeto 2,5 mL te otopine i pomješano s 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1 %-tne otopine željezovog(III) klorida. Apsorbancija dobivene zelenoplave otopine izmjerena je na 700 nm, uz destiranu vodu kao slijepu probu. Koncentracija ispitivanog uzorka koja je uzrokovala apsorbanciju od 0,500 odgovara 50 %-tnoj redukcijskoj sposobnosti (IC_{50}).

3.4.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)

Sposobnost keliranja iona željeza(II) *Juniperus* ekstrakata i kvercitrina, određena je spektrofotometrijskom metodom prema ranije opisanom postupku uz male modifikacije (Kindl i sur., 2015). Serijskim razrjeđivanjem u 70 %-tnom etanolu pripremljen je niz ispitivanih uzoraka u rasponu koncentracija od 12,5-800 $\mu\text{g/mL}$. U 400 μL ispitivanog uzorka dodano je 50 μL 2mM otopine željezovog(II) klorida i 3,35 mL 96 % etanola (V/V). Potom je dodano 200 μL 5mM otopine ferozina, otopina je snažno promućkana i ostavljena stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija ružičaste otopine izmjerena je na 562 nm, uz etanol kao slijepu probu. Usporedno je testirana EDTA kao referentni kelator. Postotak inhibicije formiranja ferozin- Fe^{2+} kompleksa, odnosno učinak keliranja metalnih iona, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ keliranja željeza(II)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine bez uzorka, a A_I označava apsorbanciju ispitivane otopine korigiranu za vrijednost apsorbancije samog uzorka.

3.5. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Exel 2010 programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju određivanja. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak (IC_{50}) dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

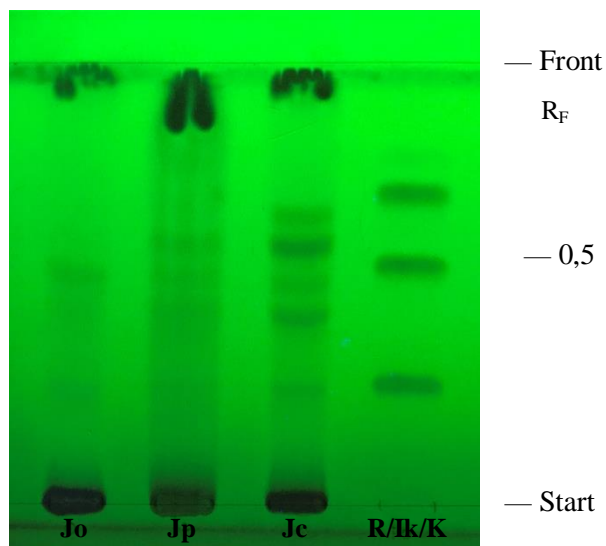
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Flavonoidi

4.1.1. Kvalitativna analiza flavonoida

Kvalitativna analiza metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Juniperus* provedena je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Ispitana je prisutnost flavonoida (glikozida i aglikona) na tankom sloju silikagela primjenom odgovarajućih pokretnih faza te NST/PEG reagensa za detekciju. Sastavnice su vizualizirane pod UV svjetlom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče, a dobiveni rezultati su prikazani na Slikama 7 i 8. Flavonoidi su karakterizirani prema položaju odijeljenih zona tj. faktoru zaostajanja (R_F) te boji i intenzitetu obojenja tih zona, u usporedbi s odgovarajućim referentnim spojevima ili literaturnim podacima.

U svrhu ispitivanja prisutnosti flavonoidnih glikozida provedeno je kromatografsko odjeljivanje metanolnih ekstrakata primjenom etil-acetata, mravlje kiseline i vode kao pokretne faze u volumnom omjeru 8:1:1. Nakon prskanja i promatranja kromatograma na 365 nm u svim biljnim vrstama uočeno je nekoliko zona narančaste i narančastožute fluorescencije u R_F području od 0,22 do 0,94 (Slika 8). Na temelju boje fluorescencije odjeljenih flavonoidnih sastavnica mogla se pretpostaviti njihova pripadnost kvercetinским derivatima, što je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima (Vasilijević i sur., 2018; Keskes i sur., 2017; Lesjak i sur., 2014). Najveći broj zona detektiran je na kromatogramu farmakopejske droge (*Juniperi galbulus*), dok se vrsta *J. oxycedrus* pokazala kao najsiromašniji izvor flavonoida. Usporedbom kromatograma istraživanih vrsta i poredbenih supstancija ustanovljena je prisutnost rutina ($R_F = 0,22$) u ekstraktima vrsta *J. communis* i *J. oxycedrus* te kvercitrina ($R_F = 0,64$) kod vrsta *J. communis* i *J. phoenicea*. U svim je vrstama detektirana zona koja je kromatografski odgovarala izokvercitrinu ($R_F = 0,47$). Intenzitet navedenih zona bio je najveći u ekstraktu borovičinih smrekinja. U svim je vrstama bila vidljiva nepolarna zona intenzivne narančastožute fluorescencije ($R_F = 0,94$) koja je ukazala na prisutnost flavonoidnih aglikona.



Slika 7. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih glikozida u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

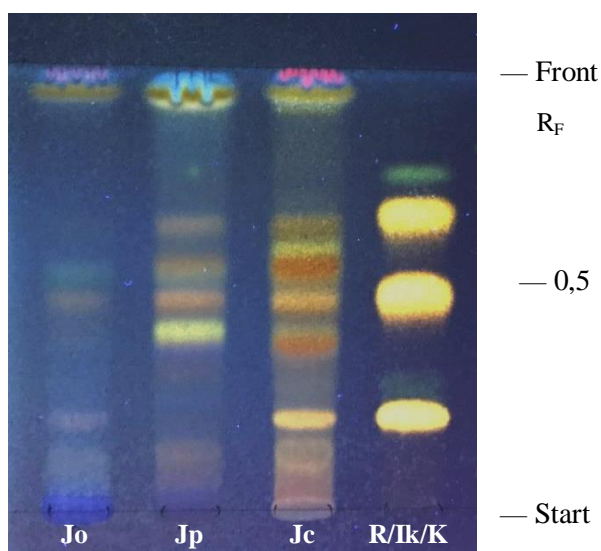
Pokretna faza: etil-acetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **R** - rutin ($R_F = 0,22$), **Ik** - izokvercitrin ($R_F = 0,47$),

K - kvercitrin ($R_F = 0,64$)



Slika 8. Kromatogram flavonoidnih glikozida u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: etil-acetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

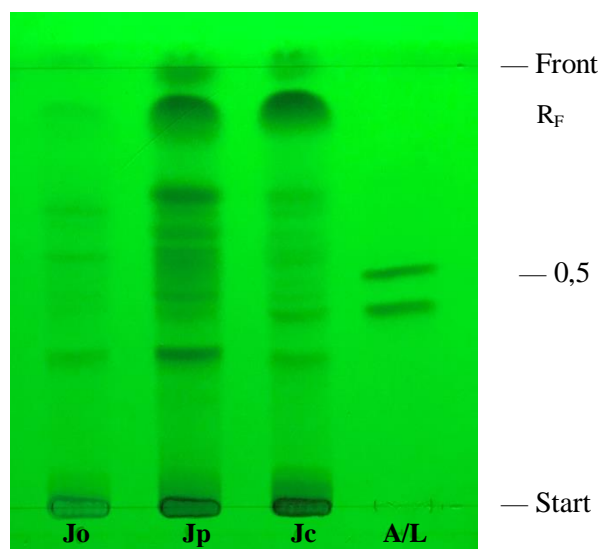
Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **R** - rutin ($R_F = 0,22$), **Ik** - izokvercitrin ($R_F = 0,47$),

K - kvercitrin ($R_F = 0,64$)

Odjeljivanje flavonoidnih aglikona iz metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Juniperus* provedeno je primjenom mobilne faze toluen-etil-formijat-mravlja kiselina 5:4:1 (V/V/V) na tankom sloju silikagela. Pod UV svjetlom na 254 nm u svim biljnim vrstama uočena je zona gašenja fluorescence faktora zaostajanja $R_F = 0,38$ (Slika 9). Nakon prskanja NST/PEG reagensom i promatranjem pod UV svjetlom na 365 nm ta zona je fluorescirala narančastožuto, a intenzitet fluorescence detektirane zone bio je najveći na kromatogramu vrste *J. phoenicea* (Slika 10). Prema literaturnim podacima ta zona najvjerojatnije pripada amentoflavonu, biflavonoidu karakterističnom za vrste roda *Juniperus* (Keskes i sur., 2017; Taviano i sur., 2013; Ravishankara i sur., 2003). Dodatno je u svim biljnim vrstama uočena i žuta zona s $R_F = 0,43$ koja je bojom i položajem odgovarala luteolinu koji je korišten kao poredbena supstancija.



Slika 9. Zone gašenja fluorescence na kromatogramu flavonoidnih aglikona u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus*

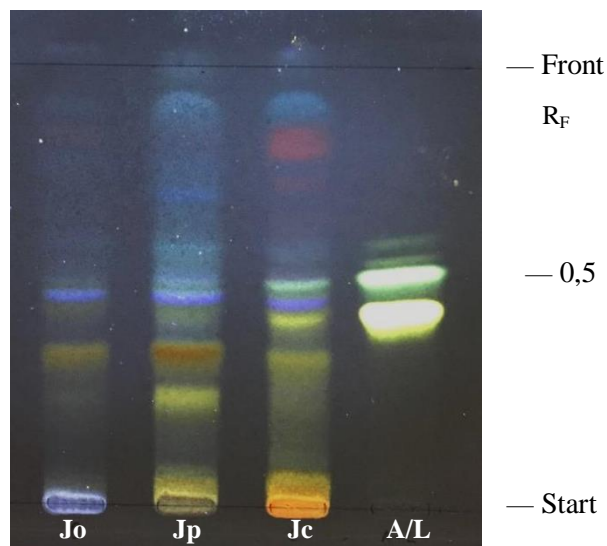
Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: toluen-etil-formijat-mravlja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

Detekcija: UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **L** - luteolin ($R_F = 0,43$), **A** - apigenin ($R_F = 0,52$)



Slika 10. Kromatogram flavonoidnih aglikona u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: toluen-etil-formijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Jc** - *J. communis*, **Jo** - *J. oxycedrus*, **Jp** - *J. phoenicea*

Poredbene supstancije: **L** - luteolin ($R_F = 0,43$), **A** - apigenin ($R_F = 0,52$)

4.1.2. Kvantitativna analiza flavonoida

Sadržaj flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom, a princip određivanja obuhvaćao je hidrolizu flavonoidnih glikozida i odjeljivanje aglikona izmućkavanjem s etil-acetatom. Žuto obojeni kompleksni spojevi koji nastaju dodatkom reagensa aluminijevog klorida imaju maksimumom apsorbancije u vidljivom području (425 nm). Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercetrozid izračuna se pomoću specifične apsorbancije koja za izokvercetrozid iznosi 500. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 2 su pokazali da je sadržaj flavonoida u istraživanim vrstama bio u rasponu od 0,01 % (*J. oxycedrus*) do 0,08 % (*J. communis*). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima tankoslojne kromatografije koji su također pokazali da je među istraživanim biljnim vrstama farmakopejska droga (*Juniperi galbulus*) najbogatiji izvor flavonoida.

Tablica 2. Sadržaj flavonoida u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus*

Biljna vrsta	Flavonoidi (%)
<i>J. communis</i>	0,084 ± 0,005
<i>J. oxycedrus</i>	0,010 ± 0,001
<i>J. phoenicea</i>	0,044 ± 0,003

4.2. Ukupni polifenoli i trjeslovine

Određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina provedeno je također spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na određivanju polifenola u ekstraktu biljne droge prije i nakon obrade kožnim praškom na koji se vežu trjeslovine. S Folin-Ciocalteuovim reagensom polifenolne sastavnice formiraju plavo obojene kompleksne spojeve, a apsorbancija nastalih plavih otopina mjeri se na 760 nm. Sadržaj trjeslovina, izražen kao pirogalol, određen je iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 3. Sadržaj ukupnih polifenola u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus* iznosio je od 0,3 % do 1,1 %, dok je udio trjeslovina bio u rasponu od 0,1 % do 0,6 %. Najniži udio ukupnih polifenola kao i trjeslovina sadržavala je vrsta *J. oxycedrus* dok su najveći udjeli određeni u vrsti *J. phoenicea*. Farmakopejska droga je sadržavala nešto manje ukupnih polifenola i trjeslovina u odnosu na vrstu *J. phoenicea*.

Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u smrekinjama odabranih vrsta roda *Juniperus*

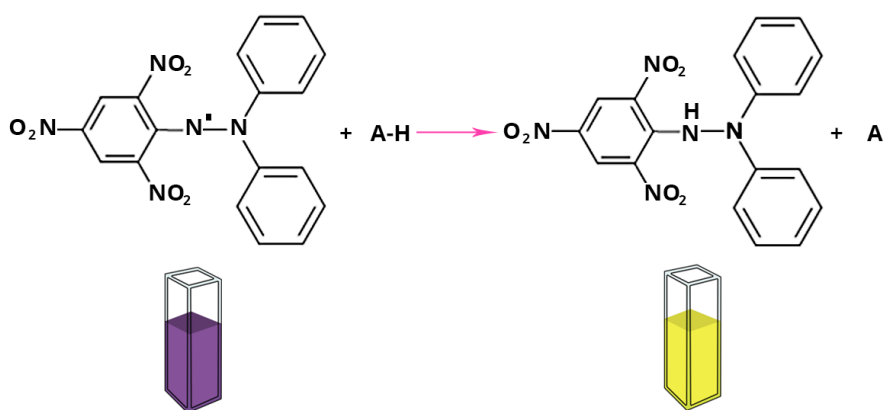
Biljna vrsta	Ukupni polifenoli (%)	Trjeslovine (%)
<i>J. communis</i>	0,92 ± 0,02	0,47 ± 0,02
<i>J. oxycedrus</i>	0,30 ± 0,01	0,11 ± 0,01
<i>J. phoenicea</i>	1,07 ± 0,02	0,57 ± 0,01

4.3. Antioksidacijsko djelovanje

U okviru ovog diplomskog rada ispitan je antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus* i kvercetina. Usporedno je ispitan učinak troloksa kao referentnog antioksidansa. Korištene su tri različite spektrofotometrijske metode, da bi se mogli pretpostaviti mogući mehanizmi njihovog antioksidacijskog djelovanja.

4.3.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

Jedna od najčešće korištenih metoda za ispitivanje antioksidacijskog djelovanja je upravo mjerenje sposobnosti hvatanja DPPH radikala. Kao i u mnogim znanstvenim istraživanjima i u ovom je diplomskom radu korištena ta metoda za ispitivanje sposobnosti smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus* da neutraliziraju slobodne radikale. Primjenjeni DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) je komercijalno dostupan stabilni slobodni radikal koji zbog svog nesporenog elektrona značajno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm, dajući ljubičasto obojenje. Antioksidansi, donirajući ili atom vodika ili elektron, reduciraju DPPH radikale što dovodi do nastanka stabilnih dijamagnetičnih molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina svijetlo žute boje (Slika 11). Antiradikalna aktivnost ispitivanog spoja očituje se obezbojenjem otopine DPPH[•] koje nastaje kao posljedica njegove redukcije. Upravo smanjenje intenziteta obojenja reakcijske smjese očituje se smanjenjem apsorbancije koja se mjeri spektrofotometrijski i direktno je proporcionalna antiradikalnoj aktivnosti ispitivanog uzorka (Kindl i sur., 2015).



Slika 11. Prikaz reakcije DPPH radikala i antioksidansa (<http://chimactiv.agroparistech.fr/en>)

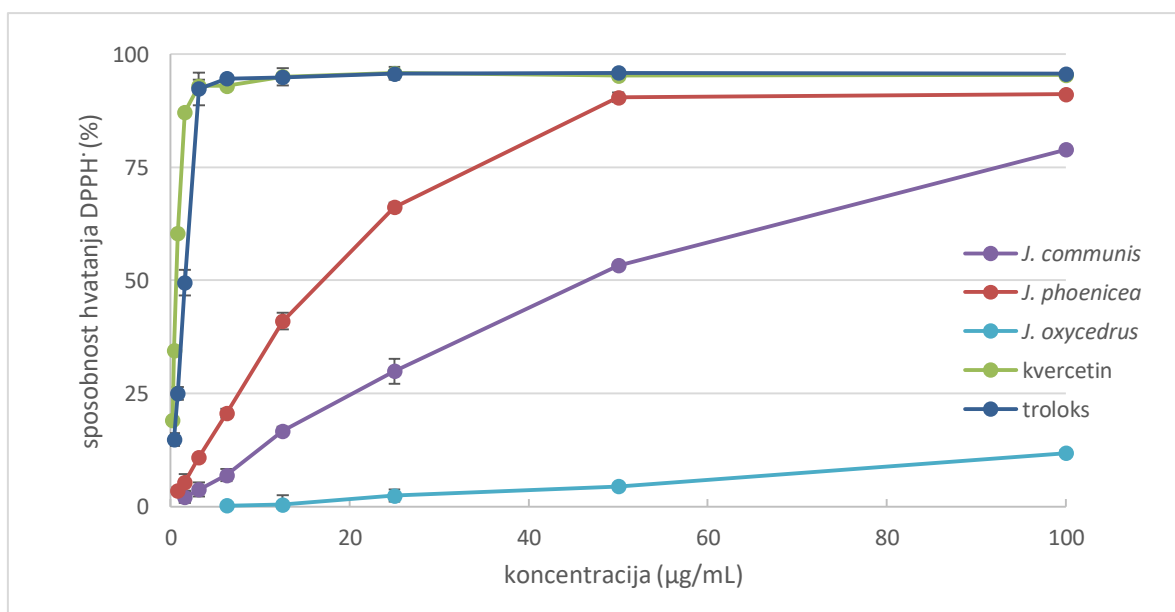
Za ispitivanje antioksidacijskog djelovanja odabranih vrsta roda *Juniperus*, kvercetina i troloksa pripremljeni su koncentracijski nizovi razrjeđenja u rasponu od 1,6 µg/mL do 100 µg/mL za ekstrakte te 0,2-100 µg/mL za čiste spojeve. Izračunata je inhibicija slobodnih DPPH radikala za pojedine koncentracije uzoraka izražena u postocima (%), a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4. Utvrđena aktivnost bila je ovisna o primijenjenoj koncentraciji te se značajno razlikovala među ekstraktima. Najbolju antiradikalnu sposobnost pokazala je vrsta *J. phoenicea*, dok je najslabije djelovao ekstrakt vrste *J. oxycedrus*. Primjerice pri koncentraciji od 50 µg/mL učinak ekstrakata vrsta *J. communis*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* je iznosio 53 %, 4 % i 91 %. Budući da je ekstrakt vrste *J. oxycedrus* pri testiranim koncentracijama pokazao vrlo slab učinak dodatno je ispitana antiradikalna aktivnost za koncentracije 200 µg/mL, 400 µg/mL i 800 µg/mL te su izračunati postoci inhibicije DPPH radikala iznosili 20 %, 35 % i 50 %.

Tablica 4. Sposobnost hvatanja DPPH^{*} etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus*, kvercetina i troloksa

konc. (µg/mL)	Sposobnost hvatanja DPPH [*] (%)				
	<i>J. communis</i>	<i>J. oxycedrus</i>	<i>J. phoenicea</i>	kvercetin	troloks
100	78,9 ± 0,3	11,8 ± 0,5	91,2 ± 0,5	95,4 ± 0,1	96,8 ± 0,7
50	53,3 ± 0,4	4,4 ± 0,5	90,4 ± 1,0	95,2 ± 0,3	95,7 ± 0,4
25	29,9 ± 2,8	2,4 ± 1,3	66,2 ± 1,0	95,8 ± 0,1	95,9 ± 0,1
12,5	16,7 ± 0,9	0,4 ± 2,1	41,0 ± 1,8	95,0 ± 0,5	95,7 ± 0,4
6,3	6,9 ± 1,3	0,2 ± 0,3	20,6 ± 1,0	93,0 ± 0,4	94,9 ± 0,7
3,1	3,4 ± 1,6	na	10,9 ± 0,3	93,0 ± 0,4	94,6 ± 0,4
1,6	2,1 ± 1,3	na	5,3 ± 1,8	92,5 ± 0,4	92,4 ± 3,6
0,8	nt	nt	nt	75,8 ± 4,8	56,8 ± 0,1
0,4	nt	nt	nt	44,3 ± 2,2	25,0 ± 1,4
0,2	nt	nt	nt	23,2 ± 0,4	14,8 ± 1,4

nt: nije testirano; na: nije aktivno; Rezultati su izraženi u postocima (%), kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 3).

Na Slici 12 grafički je prikazana antiradikalna aktivnost testiranih uzoraka. Iz prikaza je vidljivo da je iznad koncentracije od 50 $\mu\text{g/mL}$ vrsta *J. phoenicea* ušla u tzv. plato-fazu, što znači da se daljnjim povećanjem koncentracije uzorka sposobnost hvatanja DPPH radikala nije značajno mijenjala. Ekstrakti vrsta *J. communis* i *J. oxycedrus* nisu dosegli plato-fazu. Troloks i kvercetin su pokazali značajno bolju aktivnost u odnosu na testirane ekstrakte te su već pri koncentraciji od 0,8 $\mu\text{g/mL}$ neutralizirali više od 50 % slobodnih DPPH radikala. Pri koncentraciji od 1,6 $\mu\text{g/mL}$ i kvercetin i troloks ulaze u plato-fazu tj. postižu svoj maksimalni učinak.

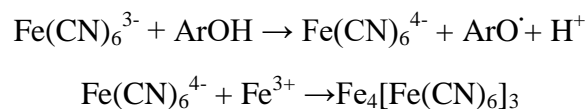


Slika 12. Usporedni grafički prikaz sposobnosti hvatanja DPPH* za različite koncentracije etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus*, kvecetina i troloksa

4.3.2. Redukcijska sposobnost

Reduktivna svojstva biljnih ekstrakata usko su povezana s njihovom antioksidacijskom moći koja se ostvaruje sa prisustvom reducensa koji otpušta elektrone i na taj način zaustavlja lančane reakcije stvaranja štetnih slobodnih radikala. Također, u reakcijama s određenim prekursorima peroksida, reducirajuće tvari sprječavaju nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (Kindl i sur., 2015). S obzirom da se sposobnost redukcije neke tvari može upotrijebiti za vrjednovanje njezinog antioksidacijskog potencijala, u okviru ovog diplomskog rada istražena je redukcijska moć *Juniperus* ekstrakata primjenom metode redukcije kalijevog heksacijanoferata. Redukcijska moć ekstrakata biljnih vrsta roda *Juniperus* je uspoređena s

aktivnošću kvercetina i troloksa. Primijenjena metoda temeljila se na redukciji Fe^{3+} u Fe^{2+} , nastalog u prisutnosti reducensa u reakcijskoj smjesi s kalijevim heksacijanoferatom u kiselom mediju, pri čemu dodatak soli trovalentnog željeza stvara plavu otopinu (Berlinsko modriilo). Navedena reakcija se može prikazati na sljedeći način:



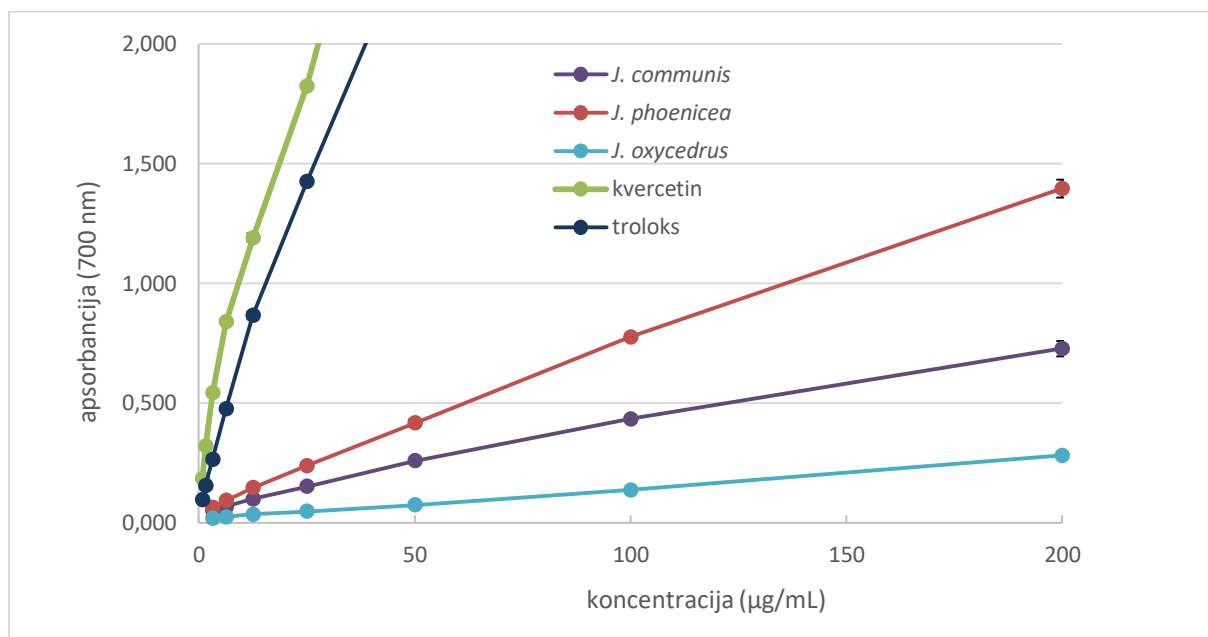
Žuta boja ispitivanih otopina mijenja se u različite nijanse zelene i plave, ovisno o redukcijskoj sposobnosti ispitivanih antioksidansa. Intenzitet obojenja se može kvantificirati spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na 700 nm. Veće vrijednosti apsorbancija su ukazale na snažniju moć redukcije (Sun i sur., 2011). Ekstrakti su testirani u rasponu koncentracija od 3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dok je učinak kvercetina i troloksa ispitan u rasponu 0,8-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. U Tablici 5 prikazane su izmjerene vrijednosti apsorbancija pri različitim koncentracijama odabranih biljnih vrsta i čistih spojeva. Redukcijska moć ekstrakata se međusobno značajno razlikovala. Među istraživanim biljnim vrstama najbolju sposobnost redukcije pokazala je vrsta *J. phoenicea* dok je ekstrakt vrste *J. oxycedrus* imao najslabiji učinak te u testiranom koncentracijskom nizu jedini nije dosegao vrijednost apsorbancije 0,500 koja odgovara 50 %-tnoj redukcijskoj sposobnosti.

Tablica 5. Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus*, kvercetina i troloksa

konc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Apsorbancija na 700 nm				
	<i>J. communis</i>	<i>J. oxycedrus</i>	<i>J. phoenicea</i>	kvercetin	troloks
200	0,729 \pm 0,032	0,282 \pm 0,011	1,397 \pm 0,037	nt	nt
100	0,435 \pm 0,003	0,138 \pm 0,003	0,776 \pm 0,004	3,586 \pm 0,001	3,666 \pm 0,022
50	0,259 \pm 0,010	0,076 \pm 0,002	0,417 \pm 0,016	3,480 \pm 0,005	2,480 \pm 0,001
25	0,153 \pm 0,003	0,049 \pm 0,001	0,240 \pm 0,001	1,823 \pm 0,002	1,426 \pm 0,009
12,5	0,100 \pm 0,001	0,037 \pm 0,002	0,147 \pm 0,001	1,191 \pm 0,018	0,867 \pm 0,060
6,3	0,069 \pm 0,004	0,026 \pm 0,001	0,094 \pm 0,002	0,840 \pm 0,001	0,476 \pm 0,011
3,1	0,052 \pm 0,001	0,019 \pm 0,002	0,066 \pm 0,002	0,544 \pm 0,006	0,265 \pm 0,004
1,6	0,036 \pm 0,001	na	0,049 \pm 0,003	0,321 \pm 0,006	0,155 \pm 0,001
0,8	0,026 \pm 0,002	na	0,036 \pm 0,004	0,187 \pm 0,001	0,098 \pm 0,002

nt: nije testirano; na: nije aktivno; Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Slika 13 predstavlja grafički prikaz ovisnosti sposobnosti redukcije iona Fe(III) o primjenjenoj koncentraciji testiranih *Juniperus* ekstrakata i čistih spojeva. Uočena je linearna ovisnost aktivnosti svih ekstrakata o primijenjenoj koncentraciji ($R = 0,9903-0,9978$). Troloks i kvercetin su pri svim testiranim koncentracijama pokazali znatno snažniju sposobnost redukcije u odnosu na ispitivane ekstrakte.



Slika 13. Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije Fe^{3+} iona za različite koncentracije etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus*, kvercetina i troloksa

4.3.3. Kelirajuća aktivnost

Ioni željeza(II) i bakra(I) su ioni prijelaznih metala koji pokazuju izravno prooksidativno djelovanje katalizirajući stvaranje visoko reaktivnih kisikovih spojeva. Zbog svoje visoke reaktivnosti željezo je najvažniji prooksidans lipidne oksidacije. U obliku Fe^{2+} iona reagira s vodikovim peroksidom, pri čemu dolazi do Fentonove reakcije u kojoj nastaje hidroksilni radikal ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$), koji ima izraženu sposobnost uzrokovanja lipidne peroksidacije u organizmu. Nadalje, željezo reagira i s lipidnim hidroperoksidima dajući reaktivne lipidne alkoksilne radikale koji dalje mogu sudjelovati u širenju oksidativnih oštećenja lipida ($Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + LO^{\bullet} + OH^-$) (Štefan i sur., 2007). Kompleksacija metalnih iona predstavlja jedan od mogućih mehanizama antioksidacijskog djelovanja polifenola.

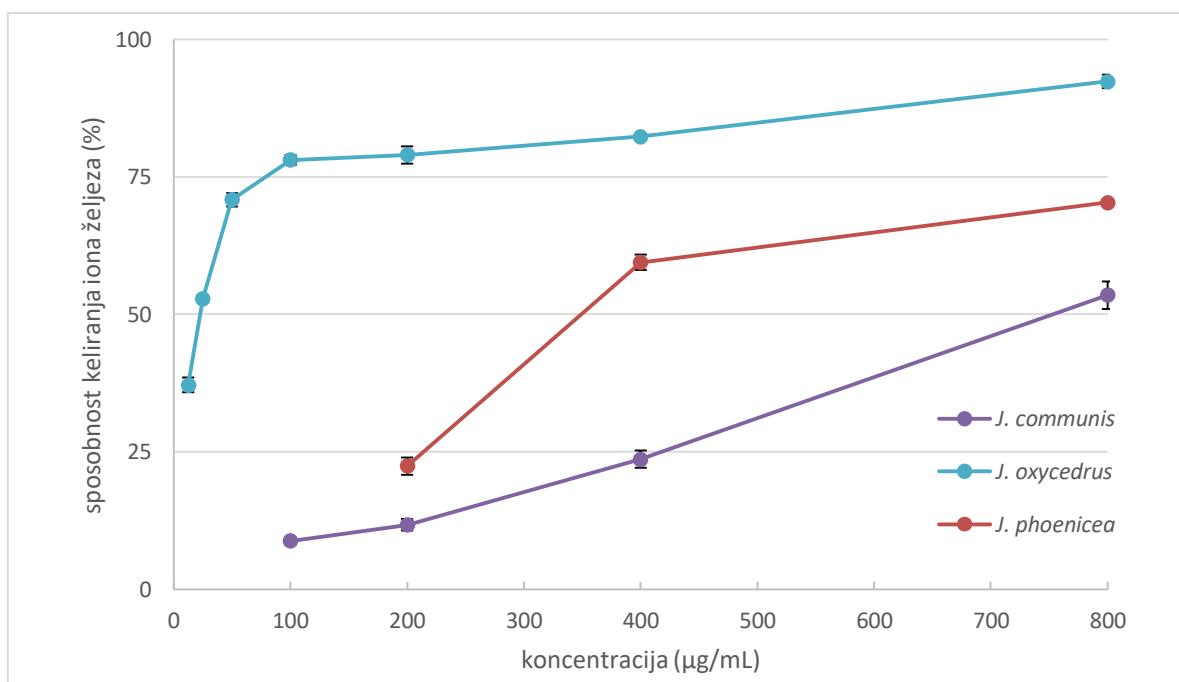
Sposobnost etanolnih ekstrakata smrekinja vrsta roda *Juniperus* da keliraju ione željeza(II) ispitana je kolorimetrijskom metodom s ferozinom koji kvantitativno stvara komplekse s Fe^{2+} , pri čemu nastaje ružičasto obojeni kompleks. Ukoliko su prisutni kelatori u reakcijskoj smjesi, sprječiti će se nastajanje kompleksa ferozina s Fe^{2+} . Kelirajuća svojstva ispitivanih tvari mogu se procijeniti na temelju smanjenja intenziteta obojenja reakcijske smjese. Nakon mjerenja apsorbancija reakcijskih smjesa na 562 nm, izračunata je inhibicija formiranja ferozin- Fe^{2+} kompleksa za pojedine koncentracije uzoraka i izražena je u postotcima (%). U Tablici 6 prikazane su izračunate vrijednosti keliranja iona željeza(II) pri različitim koncentracijama testiranih ekstrakata. Dobiveni rezultati pokazuju da najveću aktivnost ima vrsta *J. oxycedrus* koja pri koncentraciji od 25 $\mu\text{g/mL}$ kelira 53 % iona željeza(II). Učinak ekstrakata ostale dvije vrste bio je znatno slabiji. Aktivnost veću od 50 % ekstrakt vrste *J. phoenicea* ostvario je pri koncentraciji 400 $\mu\text{g/mL}$, a ekstrakt vrste *J. communis* tek pri najvećoj testiranoj koncentraciji (800 $\mu\text{g/mL}$). Kvercetin nije pokazao sposobnost keliranja. Kao referentni kelator testirana je EDTA koja je pokazala puno bolju aktivnost u odnosu na sve tri ispitane biljne vrste. Učinak EDTA u koncentracijama 0,8 $\mu\text{g/mL}$, 1,6 $\mu\text{g/mL}$ i 3,1 $\mu\text{g/mL}$ iznosio je 27 %, 69 % i 89 %.

Tablica 6. Sposobnost keliranja iona željeza(II) etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus* i referentnog kelatora EDTA

konc. ($\mu\text{g/mL}$)	Sposobnost keliranja iona željeza(II)		
	<i>J. communis</i>	<i>J. oxycedrus</i>	<i>J. phoenicea</i>
800	53,5 \pm 2,5	92,3 \pm 1,2	70,3 \pm 0,1
400	23,7 \pm 1,6	82,3 \pm 0,5	59,5 \pm 1,4
200	11,7 \pm 1,1	79,0 \pm 1,6	22,4 \pm 1,6
100	8,8 \pm 0,7	78,1 \pm 0,9	na
50	17,5 \pm 0,1	70,9 \pm 1,2	na
25	na	52,9 \pm 0,6	na
12,5	na	37,2 \pm 1,3	na

na: nije aktivno; Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$).

Na Slici 14 grafički je prikazana ovisnost sposobnosti keliranja iona željeza(II) testiranih ekstrakata o koncentraciji ($\mu\text{g/mL}$) te je vidljivo da se aktivnost odabranih vrsta roda *Juniperus* pri istim koncentracijama znatno razlikovala.



Slika 14. Usporedni grafički prikaz sposobnosti keliranja iona željeza(II) za različite koncentracije etanolnih ekstrakata smrekinja vrsta roda *Juniperus*

4.3.4. Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata smrekinja vrsta roda *Juniperus*

U okviru ovog diplomskog rada antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata smrekinja vrsta *J. communis*, *J. oxycedrus* i *J. phoenicea* ispitano je koristeći tri različite spektrofotometrijske metode. Usporedno s biljnim vrstama ispitan je učinak kvercetina, troloksa kao referentnih antioksidansa i EDTA kao referentnog kelatora. Za procjenu antioksidacijskog učinka najčešće se koriste IC_{50} vrijednosti koje označavaju koncentraciju ispitivane tvari pri kojoj se ostvaruje 50 %-tni učinak (inhibicija 50 % DPPH radikala, keliranje 50 % iona željeza). Za metodu redukcije IC_{50} vrijednost odgovara koncentraciji pri kojoj ispitani uzorci postižu vrijednost apsorbancije od 0,500. U Tablici 7 dan je usporedni prikaz izračunatih IC_{50} vrijednosti za primjenjene metode. Najbolju antiradikalnu i redukcijsku sposobnost pokazao je ekstrakt smrekinja vrste *J. phoenicea* s IC_{50} vrijednostima 17 µg/mL i 65 µg/mL. Ekstrakt vrste *J. oxycedrus* je pokazao najslabiju sposobnost hvatanja DPPH i redukcije iona željeza(II) te u obje metode pri testiranim koncentracijama nije bilo moguće odrediti IC_{50} vrijednosti. Nasuprot tome smrekinje vrste *J. oxycedrus* su pokazale daleko najbolju kelirajuću aktivnost ($IC_{50} = 25$ µg/mL). Ekstrakt vrste *J. phoenicea* je kao i u

prethodno navedenim metodama pokazao bolju sposobnost keliranja iona željeza(II) ($IC_{50} = 349 \mu\text{g/mL}$) u odnosu na farmakopejsku drogu Juniperi galbulus ($IC_{50} = 754 \mu\text{g/mL}$). U svim provedenim ispitivanjima testirani ekstrakti su djelovali slabije u odnosu na referentne antioksidanse.

Tablica 7. Usporedni prikaz IC_{50} vrijednosti etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus*, kvercetina i referentnih antioksidansa (troloks i EDTA)

uzorak	IC_{50}^* ($\mu\text{g/mL}$)		
	Sposobnost hvatanja DPPH'	Redukcijska sposobnost	Kelirajuća aktivnost
<i>J. communis</i>	$46,5 \pm 0,8$	$128,0 \pm 4,7$	$753,8 \pm 32,6$
<i>J. oxycedrus</i>	–	–	$25,0 \pm 0,1$
<i>J. phoenicea</i>	$16,9 \pm 0,4$	$65,1 \pm 1,7$	$349,0 \pm 7,8$
kvercetin	$0,5 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	na
troloks	$0,9 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,1$	nt
EDTA	nt	nt	$1,2 \pm 0,1$

nt: nije testirano; na: nije aktivno; –: pri testiranim koncentracijama uzorak nije postigao 50 %-tni učinak; Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju ($n = 3$).

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada po prvi put je provedena fitokemijska karakterizacija smrekinja vrsta *Juniperus oxycedrus* L. i *Juniperus phoenicea* L. hrvatske flore te je ispitan antioksidacijski učinak njihovih etanolnih ekstrakata. Sva istraživanja provedena su u usporedbi s vrstom *Juniperus communis* L., kao službeno priznatom ljekovitom biljkom iz roda *Juniperus*.

Prisutnost flavonoidnih glikozida i aglikona u metanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Juniperus* dokazana je tankoslojnom kromatografijom. Usporedbom kromatograma ispitivanih biljnih droga i poredbenih supstancija ustanovljena je prisutnost kvercetinских derivata (rutina, kvercitrina i izokvercitrina). Spektrofotometrijski je utvrđeno da smrekinje ispitanih biljnih vrsta sadrže 0,3-1,1 % ukupnih polifenola među kojima je 0,01-0,08 % flavonoida i 0,1-0,6 % trjeslovina. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize su pokazali da farmakopejska droga Juniperi galbulus sadrži najviše flavonoida. Najveći udio ukupnih polifenola i trjeslovina određen je u smrekinjama vrste *J. phoenicea* dok je najmanji udio ukupnih polifenola, flavonoida i trjeslovina sadržava vrsta *J. oxycedrus*.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata smrekinja odabranih vrsta roda *Juniperus* istražen je primjenom tri različite spektrofotometrijske metode u usporedbi s kvercetinom i troloksom. Utvrđena antioksidacijska aktivnost ekstrakata značajno se razlikovala, a najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala kao i redukcije iona željeza(III) ostvario je ekstrakt vrste *J. phoenicea* s IC_{50} vrijednostima 17 $\mu\text{g/mL}$ i 65 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakt vrste *J. oxycedrus* je pokazao najslabiju antiradikalnu i redukcijsku sposobnost te pri testiranim koncentracijama nije bilo moguće izračunati IC_{50} vrijednosti. Međutim ekstrakt smrekinja vrste *J. oxycedrus* je u odnosu na druge dvije droge značajno bolje keliralo ione željeza(II) ($IC_{50}= 25 \mu\text{g/mL}$).

Dobiveni rezultati pružaju nove znanstvene spoznaje o bioaktivnim sastavnicama odabranih vrsta roda *Juniperus* hrvatske flore.

6. LITERATURA

- Aboul-Ela M, El-Shaer N, El-Azim TA. Chemical constituents and antihepatotoxic effect of the berries of *Juniperus phoenicea* Part II. *Nat Prod Sci*, 2005, 11, 240-247.
- Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Frag J*, 2010, 25, 407-426.
- Akkol EK, Güvenç A, Yesilada E. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125, 330-336.
- Alan S, Kürkçüoğlu M, Şener G. Composition of the essential oils of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* growing in Turkey. *Turk J Pharm Sci*, 2016, 13, 300-303.
- Angioni A, Barra A, Russo MT, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity, *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 3073-3078.
- Blažeković B, Stanić G, Vladimir-Knežević S. Morfološko-anatomska i fitokemijska obilježja biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. i *Thymus pulegioides* L.. *Farm Glas*, 2006; 62, 121-130.
- Boti JB, Bighelli A, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casanova J. Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC-MS and ¹³C-NMR. *Flavour Fragr J*, 2006, 21, 268-273.
- Bruneton J. Pharmacognosy (Phytochemistry, Medicinal Plants). Paris-New York-London, Editions TEC & DOC, Lavoisier Publishing, Intercept, 1999, str. 370-388.
- Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves MJ, Salgueiro L. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J Appl Microbio*, 2006, 100, 1333-1338.
- Chen J, Mangelinckx S, Adams A, Wang ZT, Li WL, De Kimpe N. Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Nat Prod Commun*, 2015, 10, 187-200.
- Cosentino S, Barra A, Pisano B, Cabizza M, Pirisi FM, Palmas F. Composition and antimicrobial properties of Sardinian *Juniperus* essential oils against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *J Food Protect*, 2003, 66, 1288-1291.
- De Marino S, Festa C, Zollo F, Rusolo F, Capone F, Guerriero E, Costantini S, De Felice V, Iorizzi M. Phytochemical profile of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berries: A new monoterpene glucoside and evaluation of the effects on cancer cell lines. *Phytochem Lett*, 2014, 10, 152-159.
- Domac R. Flora Hrvatske. Zagreb, Školska knjiga, 2002, str. 25-26.

- EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 9. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2018, str. 288., 1384-1385.
- El-Sawi SA, Motawae HM, Ali AM. Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *Afr J Trad CAM*, 2007, 4, 417-426.
- EMA/HMPC (European Medicines Agency/Committee on Herbal Medicinal Products). EMA/HMPC/441930/2008 - Assessment report on *Juniperus communis* L., pseudofructus. <http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 1. 5. 2018.
- EMA/HMPC (European Medicines Agency/Committee on Herbal Medicinal Products). EMA/HMPC/12401/2010 - Assessment report on *Juniperus communis* L., aetheroleum. <http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 1. 5. 2018.
- Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Abderraba M, Raies A, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *J Food Sci*, 2009, 74, 364-371.
- Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Savagnac A, Abderraba M, Raies A, Romdhane M. The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Juniperus phoenicea* L. essential oils. *J Sci Food Agric*, 2010, 90, 462-470.
- Fierascu I, Ungureanu C, Avramescu SM, Cimpeanu C, Georgescu MI, Fierascu RC, Ortan A, Sutan AN, Anuta V, Zanfirescu A, Dinu-Pirvu CE, Velescu BS. Genoprotective, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory evaluation of hydroalcoholic extract of wild-growing *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) native to Romanian southern sub-Carpathian hills. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18, 14. str.
- Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 324-327.
- Hajdari A, Mustafa B, Gashi V, Nebija D, Ibraliu A, Novak J. Chemical composition of the essential oils of ripe berries of *Juniperus oxycedrus* L., growing wild in Kosovo. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 57, 90-94.
- Hanène M, Ameur E, Med Larbi K, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Marongiu B, Farhat F, Chemli R. Chemical composition of the essential oils of the berries of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *rufescens* (L. K.) and *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* (S. & m.) Ball. and their antioxidant activities. *Nat Prod Res*, 2012, 26, 810-820.

- Hänsel R, Sticher O. *Pharmacognosie-Phytofarmazie*, 7 izd. Heidelberg, Springer Verlag, 2004, str. 594-595.
- Hayta S, Bagci E. Essential oil constituents of the leaves, bark and cones of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. from Turkey. *Acta Bot Gallica*, 2014, 161, 201-207.
- Juniperus communis* L., <http://calscape.org>, pristupljeno 15. 6. 2018.
- Juniperus oxycedrus* L., <https://www.plantea.com.hr>, pristupljeno 15. 6. 2018.
- Juniperus phoenicea* L., <https://www.plantea.com.hr>, pristupljeno 15. 6. 2018.
- Keskes H, Belhadj S, Jlail L, El Feki A, Damak M, Sayadi S, Allouche N. LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian *Juniperus phoenicea* leaves. *Pharm Biol*, 2017, 55, 88-95.
- Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015, ID 403950, 10 str.
- Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D, Jasprica N, Bogdanović S, Topić J. Flora jadranske obale i otoka, Zagreb, Školska knjiga, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2008, str. 48-51.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*, 2013, 2013, ID 162750, 16 str.
- Laouar A, Klibet F, Bourogaa E, Benamara A, Boumendjel A, Chefrou A, Messarah M. Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of *Juniperus phoenicea* berries against CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10, 263-269.
- Lešjak MM, Beara IN, Orčić DZ, Knežević NP, Simin NĐ, Svirčev ĐE, Mimica-Dukić NM. Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm. *J Funct Food*, 2014, 7, 257-268.
- Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Lamprontic I, Gambari R, Cinatl J, Doerr HW. Phytochemical analysis and *in vitro* antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chem Biodivers*, 2008, 5, 461-470.
- Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem*, 2007, 105, 572-578.

- Marongiu B, Porcedda S, Caredda A, De Gioannis B, Vargiu L, La Colla P. Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour Fragr J*, 2003, 18, 390-397.
- Medini H, Elaissi A, Khouja ML, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Marongiu B, Chemli R. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. berries. *Nat Prod Res*, 2011, 25, 1695-1706.
- Orhan N, Aslan M, Pekcan M, Deliorman Orhan D, Bedir E, Ergun F. Identification of hypoglycaemic compounds from berries of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* through bioactivity guided isolation technique, *J Ethnopharmacol*, 2012,139, 110-118.
- Orhan N, Berkkanb A, Deliorman Orhan D, Aslan M, Ergun F. Effects of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133, 759-764.
- Orhan N, Hoşbaş S, Deliorman Orhan D, Aslan M, Ergun F. Enzyme inhibitory and radical scavenging effects of some antidiabetic plants of Turkey. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17, 426-432.
- Öztürk M, Tümen İ, Uğur A, Aydoğmuş-Öztürk F, Topçu G. Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric*, 2011, 91, 867-876.
- Pisseri F, Bertoli A, Pistelli L. Essential oils in medicine: principles of therapy. *Parassitologia*, 2008, 50, 89-91.
- Prikaz reakcije DPPH^{*} i antioksidansa, <http://chimactiv.agroparistech.fr/en>, pristupljeno 15. 6. 2018.
- Ravishankara MN, Pillai AD, Padh H, Rajani M. A sensitive HPTLC method for estimation of amentoflavone, a bioactive principle from *Biophytum sensitivum* (Linn.) DC. and *Putranjiva roxburghii* Wall. *JPC J Planar Chromat*, 2003, 16, 201-205.
- Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother Res*, 2013, 27, 1588-1596.
- Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr J*, 2013, 28, 269-279.
- Sahin Yaglioglu A, Eser F. Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *S Afr J Bot*, 2017, 113, 29-33.

- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53, 2:S310-329.
- Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49, 2689-2696.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.
- Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Güvenç A, De Pasquale R, Miceli N. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58, 22-29.
- Tumen I, Süntar I, Keleş H, Küpeli Akkol E. A therapeutic approach for wound healing by using essential oils of *Cupressus* and *Juniperus* species growing in Turkey. *Evid-Based Compl Alt*, 2012, 2012, ID 728281, 7 str.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea*, Vol 3. Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 38-39.
- Valentini G, Bellomaria B, Maggi F, Manzi A. The leaf and female cone oils of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* and *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Ball. from Abruzzo. *J Essent Oil Res*, 2003, 15, 418-421.
- Vasiljević B, Knežević-Vukčević J, Mitić-Ćulafić D, Orčić D, Francišković M, Srdic-Rajic T, Jovanović M, Nikolić B. Chemical characterization, antioxidant, genotoxic and *in vitro* cytotoxic activity assessment of *Juniperus communis* var. *saxatilis*. *Food Chem Toxicol*, 2018, 112, 118-125.
- Velasco-Negueruela, Pérez-Alonso MJ, Palá-Paúl J., Íñigo A., Cervera M., Lopez G. Essential oil analyses of the leaves and berries of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *badi* (H. Gay) Debeaux. *Bot Complut*, 2003, 27, 147-154.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: *Phytochemicals as nutraceuticals - global approaches to their role in nutrition and health*. Venketeshwer Rao A, urednik, Rijeka, InTech, 2012, str. 155-158.

- Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas, 2. izd. Berlin-Heidelberg, Springer, 2009, str. 195-197., 362.
- Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals, 3. izd. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, 2004, str. 320-323.
- Yvon Y, Guy Raelison E, Razafindrazaka R, Randriantsoa A, Romdhane M, Chabir N, Guedri Mkaddem M, Bouajila J. Relation between chemical composition or antioxidant activity and antihypertensive activity for six essential oils. *J Food Sci*, 2012, 77, 184-191.
- Zhang J, Li L, Kim S-H, Hagerman AE, Lü J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm Res*, 2009, 26, 2066-2080.

7. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada po prvi put je istražen fitokemijski sastav smrekinja vrsta *Juniperus oxycedrus* L. i *Juniperus phoenicea* L. hrvatske flore te je ispitan antioksidacijski potencijal njihovih etanolnih ekstrakata. Istraživanja su provedena usporedno s farmakopejskom drogom Juniperi galbulus (smrekinje vrste *Juniperus communis* L.). Prisutnost flavonoidnih glikozida i aglikona dokazana je metodom tankoslojne kromatografije. Primjenom spektrofotometrijskih metoda određeno je da zrele smrekinje istraživanih *Juniperus* vrsta sadrže 0,3-1,1 % ukupnih polifenola među kojima 0,01-0,08 % flavonoida i 0,1-0,6 % trjeslovina. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je različitim spektrofotometrijskim metodama u usporedbi s kvercetinom i troloksom. Među istraživanim vrstama utvrđeno je da ekstrakt vrste *J. phoenicea* posjeduje najbolju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$) i redukcije iona željeza(III) ($IC_{50} = 65 \mu\text{g/mL}$) dok su smrekinje vrste *J. oxycedrus* pokazale najbolju sposobnost keliranja iona željeza(II) ($IC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$). Dobiveni rezultati doprinose znanstvenim spoznajama o polifenolnim sastavnicama smrekinja istraživanih vrsta roda *Juniperus* te njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti.

The phytochemical composition of the berries of *Juniperus oxycedrus* L. and *Juniperus phoenicea* L. from the Croatian flora and the antioxidant potential of their ethanolic extracts were studied in this thesis for the first time. The investigations were carried out in comparison with the pharmacopoeial drug Juniperi galbulus (the berries of *Juniperus communis* L.) Flavonoid glycosides and aglycones were detected with thin-layer chromatography. The content of 0.3-1.1 % of total polyphenols, out of which 0.01-0.08 % of flavonoids and 0.1-0.6 % of tannins, were determined spectrophotometrically in the ripe berries of selected *Juniperus* species. The antioxidant activity of the ethanolic extracts was tested by using various spectrophotometric methods in comparison with quercetin and trolox. Our study revealed that among investigated species the extract of *J. phoenicea* possessed the best DPPH free-radical scavenging activity ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$) and ferric reducing ability ($IC_{50} = 65 \mu\text{g/mL}$) while the berries of *J. oxycedrus* showed the highest chelating activity ($IC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$). The obtained results contribute to the scientific knowledge of the polyphenolic compounds in the berries of selected *Juniperus* species as well as their antioxidant activity.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

FITOKEMIJSKA I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA POLIFENOLA U VRSTAMA *JUNIPERUS OXYCEDRUS* L. I *JUNIPERUS PHOENICEA* L.

Andrea Stanić

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada po prvi put je istražen fitokemijski sastav smrekinja vrsta *Juniperus oxycedrus* L. i *Juniperus phoenicea* L. hrvatske flore te je ispitan antioksidacijski potencijal njihovih etanolnih ekstrakata. Istraživanja su provedena usporedno s farmakopejskom drogom Juniperi galbulus (smrekinje vrste *Juniperus communis* L.). Prisutnost flavonoidnih glikozida i aglikona dokazana je metodom tankoslojne kromatografije. Primjenom spektrofotometrijskih metoda određeno je da zrele smrekinje istraživanih *Juniperus* vrsta sadrže 0,3-1,1 % ukupnih polifenola među kojima 0,01-0,08 % flavonoida i 0,1-0,6 % trjeslovina. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je različitim spektrofotometrijskim metodama u usporedbi s kvercetinom i troloksom. Među istraživanim vrstama utvrđeno je da ekstrakt vrste *J. phoenicea* posjeduje najbolju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$) i redukcije iona željeza(III) ($IC_{50} = 65 \mu\text{g/mL}$) dok su smrekinje vrste *J. oxycedrus* pokazale najbolju sposobnost keliranja iona željeza(II) ($IC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$). Dobiveni rezultati doprinose znanstvenim spoznajama o polifenolnim sastavnicama smrekinja istraživanih vrsta roda *Juniperus* te njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti.

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

Rad sadrži: 52 stranice, 14 grafičkih prikaza, 7 tablica i 62 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Juniperus communis*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, smrekinje, flavonoidi, trjeslovine, antioksidacijsko djelovanje

Mentor: **Dr. sc. Marija Kindl**, viša asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Kindl**, viša asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Maja Bival Štefan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah, viša asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

PHYTOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF POLYPHENOLS OF *JUNIPERUS OXYCEDRUS* L. AND *JUNIPERUS PHOENICEA* L.

Andrea Stanić

SUMMARY

The phytochemical composition of the berries of *Juniperus oxycedrus* L. and *Juniperus phoenicea* L. from the Croatian flora and the antioxidant potential of their ethanolic extracts were studied in this thesis for the first time. The investigations were carried out in comparison with the pharmacopoeial drug Juniperi galbulus (the berries of *Juniperus communis* L.) Flavonoid glycosides and aglycones were detected with thin-layer chromatography. The content of 0.3-1.1 % of total polyphenols, out of which 0.01-0.08 % of flavonoids and 0.1-0.6 % of tannins, were determined spectrophotometrically in the ripe berries of selected *Juniperus* species. The antioxidant activity of the ethanolic extracts was tested by using various spectrophotometric methods in comparison with quercetin and trolox. Our study revealed that among investigated species the extract of *J. phoenicea* possessed the best DPPH free-radical scavenging activity ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$) and ferric reducing ability ($IC_{50} = 65 \mu\text{g/mL}$) while the berries of *J. oxycedrus* showed the highest chelating activity ($IC_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$). The obtained results contribute to the scientific knowledge of the polyphenolic compounds in the berries of selected *Juniperus* species as well as their antioxidant activity.

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

Thesis includes: 52 pages, 14 figures, 7 tables and 62 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Juniperus communis*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, cone berries, flavonoids, tannins, antioxidant activity

Mentor: **Marija Kindl, Ph.D.** Assistant-postdoctorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Kindl, Ph.D.** Assistant-postdoctorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Višnja Drinovac Vlah, Ph.D. Assistant-postdoctorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.