

# Fitokemijski sastav i antioksidativno djelovanje ploda drijena (Cornus mas L.)

---

Miholić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:780086>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivana Miholić**

**Fitokemijski sastav i antioksidativno  
djelovanje ploda drijena (*Cornus mas* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Blažeković.

*Hvala izv. prof. dr. sc. Biljani Blažeković na pomoći tijekom izrade diplomskog rada te ostalim djelatnicima Zavoda za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada..*

*Hvala mojim prijateljima što su mi uljepšali ovo životno razdoblje.*

*Hvala Julijanu jer je uvijek bio tu za mene - moj vječni oslonac.*

*Hvala mojoj obitelji na podršci, ljubavi, razumijevanju i vjeri u mene. Bez svojih super žena nikad ne bih uspjela!*

# Sadržaj

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | UVOD  | 1  |
| 1.1.  | Botanička obilježja drijena ( <i>Cornus mas</i> L., Cornaceae)                            | 2  |
| 1.2.  | Fitokemijski sastav drijenovog ploda  | 3  |
| 1.3.  | Biološki, farmakološki i klinički učinci drijenovog ploda                                 | 5  |
| 2.    | OBRAZLOŽENJE TEME   | 10 |
| 3.    | MATERIJALI I METODE   | 11 |
| 3.1.  | Biljni materijal i priprema ekstrakta   | 11 |
| 3.2.  | Aparatura i kemikalije  | 11 |
| 3.3.  | Određivanje gubitka sušenjem  | 13 |
| 3.4.  | Ispitivanje fitokemijskog sastava drijenovog ploda tankoslojnom kromatografijom           | 13 |
| 3.4.1 | Ispitivanje flavonoida i fenolnih kiselina  | 13 |
| 3.4.2 | Ispitivanje antocijana  | 13 |
| 3.5.  | Spektrofotometrijsko određivanje polifenolnih sastavnica drijenovog ploda                 | 14 |
| 3.5.1 | Određivanje fenolnih kiselina   | 14 |
| 3.5.2 | Određivanje antocijana  | 14 |
| 3.5.3 | Određivanje trjeslovina   | 15 |
| 3.5.4 | Određivanje flavonoida  | 16 |
| 3.6.  | Istraživanje antioksidativne aktivnosti etanolnog ekstrakta drijenovog ploda              | 17 |
| 3.6.1 | Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog (II) oksida (NO)                      | 17 |
| 3.6.2 | Određivanje sposobnosti hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala             | 18 |
| 3.7.  | Statistička analiza   | 18 |
| 4.    | REZULTATI I RASPRAVA  | 19 |
| 4.1.  | Gubitak sušenjem  | 19 |
| 4.2.  | TLC karakterizacija polifenolnih sastavnica drijenovog ploda                              | 19 |
| 4.2.1 | TLC profil flavonoida i fenolnih kiselina   | 19 |
| 4.2.2 | TLC profil antocijana   | 20 |
| 4.3.  | Sadržaj polifenolnih sastavnica u drijenovom plodu određen spektrofotometrijskim metodama | 21 |
| 4.3.1 | Sadržaj fenolnih kiselina   | 21 |
| 4.3.2 | Sadržaj antocijana  | 22 |
| 4.3.3 | Sadržaj trjeslovina   | 22 |
| 4.3.4 | Sadržaj flavonoida  | 22 |
| 4.4.  | Antioksidativni učinak ekstrakta drijenovog ploda   | 23 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.4.1 | Sposobnost hvatanja slobodnih NO radikala                     | 23 |
| 4.4.2 | Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala                   | 25 |
| 5.    | ZAKLJUČAK   | 28 |
| 6.    | LITERATURA  | 29 |
| 7.    | SAŽETAK / SUMMARY   | 34 |
| 8.    | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/<br>BASIC DOCUMENTATION CARD |    |

## 1. UVOD

U svijetu rod *Cornus* obuhvaća oko 50 vrsta grmova i stablašica, a većina njih se koristi u dekorativne svrhe. Prema podacima Flora Croatica Database na teritoriju Hrvatske nalazimo četiri vrste iz roda *Cornus* – *Cornus alba* L. (bijeli drijen), *Cornus hungarica* Karpati (mađarski drijen), *Cornus mas* L. (drijen, crveni drijen) i *Cornus sanguinea* L. (svib drijen, svibovina) (<https://hirc.botanic.hr>). Od nabrojanih vrsta jedino se *Cornus mas* koristi u ljudskoj prehrani, dok plodovi i drugi biljni dijelovi ostalih vrsta nisu jestivi (Dujmović Purgar i sur., 2012). Potencijalnu ulogu u prehrani mogu imati usplođe i sjemenke vrste *C. sanguinea* zbog visokog sadržaja ulja (Grlić, 2005). Drijen je prisutan u ljudskoj prehrani već tisućljećima o čemu govore podaci o uzgajanju drijena u samostanskim vrtovima na području Rima, u antičkoj Grčkoj i u srednjem vijeku (Reich, 1996). Plod drijena koristi se za pripremu pekmeza, kompota, voćnih jogurta, voćnih sokova, sirupa, rakija, vina ili brendija (Dujmović Purgar i sur., 2012). Osim ploda, u prehrambene svrhe mogu se koristiti i drugi dijelovi biljke, pa se tako list i kora drijena koriste za pripremu čaja, a sjemenke kao zamjena za kavu (Grlić, 2005). Tradicionalno se drijen koristi u liječenju gastrointestinalnih oboljenja i proljeva, odljeva krvi, groznice i sl. (Kušan, 1938).



*Slika 1. Corni mas fructus*

(preuzeto s <http://herbni.com/eng/cornelian-cherry-dogwood-cornus-mas.html>)

## 1.1. Botanička obilježja drijena (*Cornus mas* L., Cornaceae)

Drijen, drijenak, dren ili drenjina samo su neka od imena pod kojima je poznata biljna vrsta *Cornus mas* L.. Radi se o listopadnom grmu ili nižem stablu koji pripada porodici drijenovki (Cornaceae). Može narasti oko 6 - 9 m visine, a karakterizira ga zaobljena, gusta krošnja. Kora je izgledom raspucana, siva i ljušti se. Mlade grančice su maslinasto-smeđe boje i fino dlakave. Lisni pupoljci su mali i sadrže dvije žućkaste ljuske. Za razliku od njih, cvjetni pupoljci su veći te su pokriveni zelenkasto-žutim ljuskama. Listovi drijena su nasuprotni, jajolikog oblika, široki oko 3 cm, dugi 4 - 8 cm, cjelovitih rubova te s naglašenim žilama koje prate oblik lista (Šilić, 1990). Na naličju listova nalaze se čuperci bijelih dlačica što se smatra važnom karakteristikom na temelju koje se može odrediti vrsta (Dujmović Purgar i sur., 2012). Cvjetovi su dvospolni, sitni, zlatnožuti, skupljeni u štitaste cvatove. Cvjetovi se javljaju u veljači i ožujku, prije listanja, i cvatu oko dva tjedna. Plodovi su crvene oko 12 mm duge koštunice sa elipsoidnom, na površini glatkom, do 10 mm dugom košticom. Poznati su pod nazivom drenjule ili drenjine, a dozrijevaju u kolovozu i rujnu. Kiselkastog su i trpkog okusa (Šilić, 1990). Drijen je rasprostranjen na području južne Europe te Male Azije i Kavkaza. Česta je vrsta u području listopadnih hrastovih šuma, na rubovima šuma, od nizina do pretplaninskog područja oko 1400 m nadmorske visine. Raste na toplim, sunčanim, vapnenačkim staništima (Gelenčir i Gelenčir, 1991).



**Slika 2.** Drijen (*Cornus mas* L.) – biljka, cvijet, plod (preuzeto s <https://www.vitaflora.lt/en/nauji/by-plant-type/fruit-edible/dogwood/cornelian-cherry-dogwood-cornus-mas-detail>)

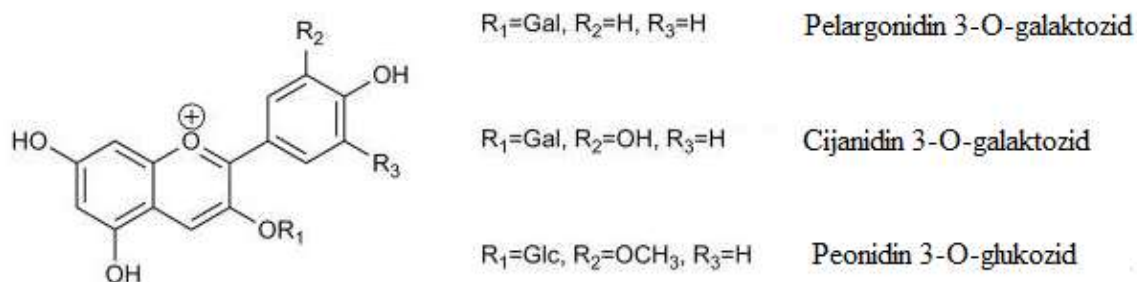
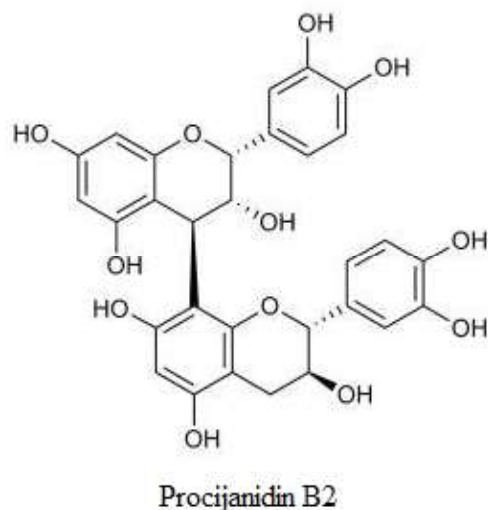
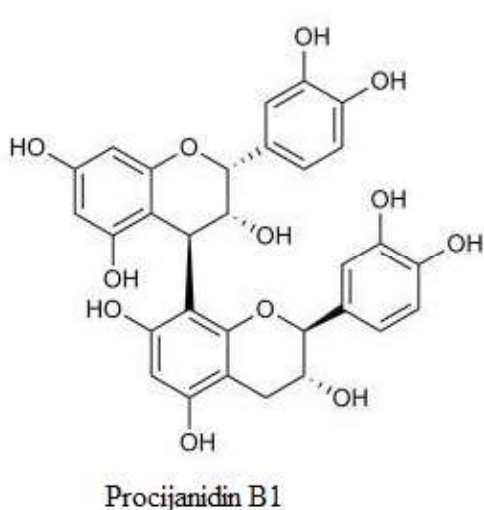
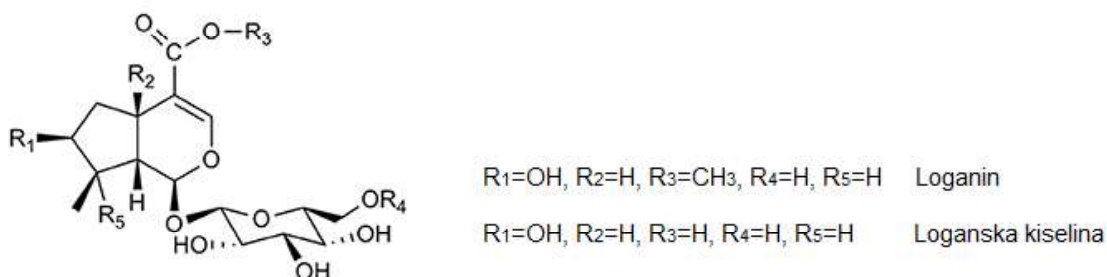
## 1.2. Fitokemijski sastav drijenovog ploda

Kemijski sastav drijena je varijabilan i ovisi o genotipu biljke, klimatsko-pedološkim i drugim uvjetima rasta biljke te zrelosti ploda. Istraživanja su pokazala da su plodovi dobar izvor vitamina C, iridoida i različitih polifenola. Bioaktivne sastavnice drijenova ploda mogu se razvrstati u 5 skupina – iridoidi, antocijanini, fenolne kiseline, flavonoidi i trjeslovine (Szczepaniak i sur., 2019).

Iridoidi su prirodni monoterpenski spojevi među kojima razlikujemo iridoidne glikozide, neglikozidne iridoide, sekoiridoide i bisiridoide (Jurišić Grubešić i Vladimir – Knežević, 2004). Najzastupljeniji su sekundarni metaboliti drijena. Plodovi vrste *C. mas* sadrže iridoidne spojeve poput loganina, loganske kiseline, sverozida i kornuzida. Analiza 26 kultivara vrste *C. mas* pokazala je da je najzastupljeniji spoj loganska kiselina koja čini 88 – 96 % ukupnih iridoida (Czerwinska i Melzig, 2018). Dvije studije navode prisutnost loganina i sverozida u plodu vrste *C. mas* (Perova i sur., 2014; Deng i sur., 2013).

Flavonoidi su prirodni polifenolni spojevi čiju strukturu karakterizira prisutnost dviju benzenskih jezgri povezanih propanskim lancem, tj. C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> struktura (Jurišić Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004). U prirodi se najčešće susreću flavoni i flavonoli, koji zajedno s antocijanidinima, izoflavonoidima i flavanonima čine više od 80 % poznatih flavonoidnih spojeva. Glavne sastavnice ploda vrste *C. mas* su derivati flavonola kvercetina i kempferola (Tenuta i sur., 2022). Flavonoidi su u plodovima drijena prisutni u obliku monoglikozida s glukozom, galaktozom, ramnozom ili glukuronskom kiselinom kao šećernom komponentom. Kvercetin-3-O-glukuronid je glavna sastavnica metanolnog ekstrakta ploda drijena (Pawłowska i sur., 2010). Kvercetin je važan bioaktivni spoj, s potvrđenim brojnim biološkim učincima, kao što su kardioprotektivni, protutumorski, antialergijski, antivirusni i protuupalni (Jurišić Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004). Drijenov plod također sadrži glikozidne derivate miricetina, naringenin-3-O-metilester, aromadendrin te katehin, epikatehin i procijanidin B2 (Milenković-Andelković i sur., 2015). Antocijani (antocijanini) su polifenolni glikozidi koji se hidrolizom razgrađuju na šećer i aglikon antocijanidin. U plodu vrste *C. mas* prisutni su u velikoj količini te im daju crvenu boju. Najzastupljeniji antocijani su derivati pelargonidina i cijanidina, posebno pelargonidin-3-O-galaktozid i cijanidin-3-O-galaktozid (Kucharska i sur., 2015; Sozanski i sur., 2014; Jayaprakasam i sur., 2006). U nekim kultivarima s područja jugoistočne Europe kao glavne sastavnice drijenova ploda navode se peonidin-3-O-glukozid i cijanidin-3-O-galaktozid (Drkenda i sur., 2014). U istraživanju koje su proveli Tural i Koca (2008) najzastupljeniji antocijani bili su pelargonidin 3-O-glukozid,





**Slika 3.** *Kemijske strukture najzastupljenijih bioaktivnih sastavnica drijena, (preuzeto i prilagođeno s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121078/>)*

cijanidin 3-O-glukozid i cijanidin 3-O-rutinozid. Dzydzan i sur. (2019) navode 7 vrsta antocijana u drienovom plodu među kojima su 3 monoglukoza (delfinidin 3-O-galaktozid,

cijanidin 3-O-galaktozid i pelargonidin 3-O-galaktozid), dva diglukozida (cijanidin 3-O-robinobiozid i pelargonidin 3-O-robinobiozid) i dva aglikona (cijanidin i pelargonidin) dobivena hidrolizom prethodno navedenih spojeva.

Važnu skupinu biljnih polifenola čine fenolne kiseline. *C. mas* sadrži fenolne kiseline iz skupine derivata benzojeve kiseline i cimetine kiseline. Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline prisutni u drijenovom plodu su galna, protokatehinska, vanilinska i elaginska kiselina, dok se od derivata hidroksicimetine kiseline javljaju kavena, kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina. One ujedno predstavljaju važne građevne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva te često dolaze u obliku specifičnih estera, kao što su klorogenska kiselina i ružmarinska kiselina koje su također prisutne u plodovima drijena (Czerwinska i Melzig, 2018). Osim toga, plodovi drijena su bogati monosaharidima i polisaharidima, a sadrže i atipična vlakna poput kalcij pektata (Jaćimović i sur., 2015; Bijelić i sur., 2011). Bogati su izvor kalija, kalcija, magnezija i natrija, no studije ukazuju na značajan utjecaj porijekla na njihov sadržaj. Dok plodovi drijena s područja Hrvatske sadrže 4019 mg/kg kalija, 2074 mg/kg kalcija, 288 mg/kg magnezija i 22,9 mg/kg natrija, u grčkim plodovima ustanovljeno je 880 – 1320 mg/kg kalija, 80 – 90 mg/kg fosfora, 40 – 50 mg/kg magnezija, 19 – 45 mg/kg željeza i 20 – 30 mg/kg kalcija (Tenuta i sur., 2022). Plodovi drijena sadrže i triterpenoide, točnije ursoličnu kiselinu. Czerwinska i Melzig (2018) u svom istraživanju su usporedili kemijski sastav vrsta *C. mas* i *C. officinalis* kao dviju vrsta tog roda s najdužom tradicijom korištenja te su kao posebnost istaknuli prisutnost karotenoida, masnih kiselina i derivata flavan-3-ola, poput procijanidina B1 i B2, u vrsti *C. mas*. Najzastupljenijim masnim kiselinama u drijenovom plodu smatraju se linolenska, oleinska i palmitinska kiselina.

### **1.3. Biološki, farmakološki i klinički učinci drijenovog ploda**

#### *Antioksidacijski učinak*

Ekstrakt ploda vrste *Cornus mas* sadrži askorbinsku kiselinu i polifenolne spojeve iz skupine flavonoida i antocijanina koji se smatraju potentnim antioksidansima sposobnim da štite stanične proteine, lipide i DNK od oštećenja uzrokovanih djelovanjem slobodnih radikala. Liofolizirani plodovi drijena (bez sjemenki) primjenjeni oralno tijekom 60 dana protektivno su djelovali na hiperlipidemiju u zečeva potaknutu prehranom bogatom kolesterolom i to tako da su, između ostalog djelovanja, pokazali sposobnost regulacije oksidativnog stresa

(Sozanski i sur., 2014). Na temelju smanjenja razine malondialdehida dokazano je da sprječavaju lipidnu peroksidaciju u jetri, ali djeluju i na aktivnost staničnih antioksidansa i to tako da povećavaju razinu glutaciona, dok na aktivnost superoksid dismutaze i glutation peroksidaze ne utječe. Nadalje, antioksidacijsko djelovanje ekstrakta ploda vrste *Cornus mas*, u štakora kod kojih je ugljikovim tetrakloridom (CCl<sub>4</sub>) izazvano oštećenje jetre očitovano se značajnim smanjenjem koncentracije malondialdehida, markera lipidne peroksidacije, u ispitivanim skupinama životinja koje su prije CCl<sub>4</sub> tretmana preventivno tijekom 16 dana dobivale ekstrakt ploda drijena u dozi 200 mg/kg odnosno 500 mg/kg. Rezultati navedene studije koju su proveli Somi i sur. (2014) također su pokazali da metanolnovodeni ekstrakt ploda drijena pozitivno utječe na razine antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze) do čijeg značajnog smanjenja dovodi samo tretiranje CCl<sub>4</sub>. Protektivno djelovanje drijenova ploda na toksinom-potaknuta oštećenja jetre pripisuje se njegovoj sposobnosti da sprječi peroksidaciju jetrenih lipida, a kao mogući mehanizam predlaže se sposobnost antioksidativnih sastavnica drijena da stabiliziraju membrane i umanje poremećaje uzrokovane ugljikovim tetrakloridom.

Na animalnom modelu dokazano je i da ekstrakt ploda drijena djeluje protektivno na reproduktivni sustav prilikom primjene citotoksičnog lijeka metotreksata te štiti životinje od njegova neželjenog djelovanja. Rezultati studije pokazali su da ekstrakt ploda drijena primijenjen u dozi 500 mg/kg ili 1000 mg/kg sprječava pojavu oksidativnog stresa uzrokovanog primjenom metotreksata u stanicama spermatogeneze. Takav mehanizam djelovanja povezuje se sa sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala i/ili povećanjem antioksidativnog kapaciteta u organizmu. Antioksidativne sastavnice drijenova ploda pozitivno djeluju i na druge parametre kvalitete sperme u životinja koji su narušeni prilikom primjene metotreksata (Zarei i sur., 2015).

#### *Protuupalni učinak*

U animalnoj studiji provedenoj na zečevima koji su dobivali hranu bogatu kolesterolom, što je rezultiralo poremećajem lipidnog statusa, dokazano je da liofilizirani plod drijena pridonosi normalizaciji razine pojedinih lipida djelujući antioksidativno, ali i protuupalno. Drijen je značajno smanjio *in vivo* koncentraciju proupalnih citokina – čimbenika nekroze tumorske alfa (TNF-alfa) i interleukina-6 (Sozanski i sur., 2014).

Moldovan i sur. (2016) proveli su istraživanje na Wistar štakorima kojima su mjerili razinu citokina nakon izazivanja upale karagenanom u mekom tkivu šape. Acetonski ekstrakt plodova vrste *C. mas* pokazao je protuupalno djelovanje inhibirajući proizvodnju TNF-alfa,

interleukina-1 $\beta$  i interleukina-13 te pojačavajući proizvodnju interleukina-10 u tkivu šape. Na temelju histopatoloških nalaza tkiva šape i jetre smatra se da niska doza ekstrakta (15 mg ukupnih fenola drijena/kg tjelesne težine) doprinosi smanjenju početne upalne reakcije, dok visoka doza (30 mg ukupnih fenola drijena/kg tjelesne težine) inhibira eksudaciju upalnih stanica na mjesto upale.

#### *Antimikrobni učinak*

Plodovi biljne vrste *C. mas* sadrže polifenolne spojeve koji se smatraju odgovornim za sposobnost inhibicije rasta različitih enteropatogenih bakterija. Također, neke fitokemijske sastavnice soka ploda drijena mogu smanjiti adheziju bakterijskih sojeva *Asaia spp.* koje uzrokuju kvarenje bezalkoholnih pića (Czerwinska i Melzig, 2018).

U istraživanju kojeg su proveli Milenković-Andelković i sur. (2015) ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakta ploda i lista drijena na 13 mikrobnih sojeva. Disk difuzijskom metodom je dokazano da oba ekstrakta drijena inhibiraju rast Gram – pozitivnih sojeva (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*), Gram – negativnih sojeva (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*) i kvasca (*Candidia albicans*). Ekstrakt lista drijena pokazao je snažnije djelovanje u odnosu na ekstrakt ploda.

Krisch i sur. (2008) ustanovili su da vodeni ekstrakt plodova drijena djeluje antimikrobno na sojeve *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* i *Serratia marcescens*. Metanolni ekstrakt plodova *C. mas* također je inhibirao rast sojeva *B. subtilis* i *E. coli* te je pokazao potentniji antibakterijski učinak od vodenog ekstrakta.

#### *Hipoglikemijski učinak*

*In vitro* studija koju su proveli Jayaprakasam i sur. (2005) pokazuje da antocijani iz plodova vrste *C. mas*, cijanidin-3-glukozid i delfinidin-3-glukozid, potiču sekreciju inzulina iz beta stanica gušterače glodavaca.

S ciljem vrednovanja tradicionalne uporabe drijena kao hipoglikemijskog sredstva, Soltani i sur. (2015) proveli su randomiziranu, dvostruko-slijepu, placebom kontroliranu kliničku studiju na 60 pacijenata oboljelih od dijabetesa tipa 2. Pacijenti, podijeljeni u dvije skupine, tijekom 6 tjedana su dvaput dnevno uzimali po dvije kapsule punjene suhim 70 %-tnim etanolnim ekstraktom plodova drijena, standardiziranim na 150 mg antocijana (600 mg

antocijana/dan) ili placebo. Prije i nakon provedenog ispitivanja pacijentima se određivao indeks tjelesne mase te se uzimala krv za mjerenje razine glukoze natašte, inzulina, triglicerida, glikoziliranog hemoglobina i vrijednosti glukoze 2 sata nakon jela. Također, određene su i vrijednosti jetrenih enzima te kreatinina koje su se pokazale urednima i nakon provedene studije. Rezultati su pokazali da ekstrakt ploda vrste *C. mas* može poboljšati glikemijsku kontrolu snižavanjem razine glikoziliranog hemoglobina (HbA1C) što se smatra iznimno važno jer se time smanjuje rizik od nastanka komplikacija vezanih uz dijabetes. Uz to, primjećene su snižene vrijednosti triglicerida u serumu i veće vrijednost inzulina kod ispitivane skupine koja je uzimala kapsule sa standardiziranim ekstraktom. Razlika vrijednosti indeksa tjelesne mase, glukoze natašte kao i postprandijalno nije statistički značajna u usporedbi s placebo grupom, ali korištenje veće doze ekstrakta tijekom dužeg vremenskog razdoblja može imati značajniji utjecaj na markere kontrole dijabetesa. Pretpostavlja se da su antocijani u plodovima drijena zaslužni za hipoglikemijska i hipolipidemijska svojstva ekstrakta.

#### *Hipolipidemijski učinak*

Rafieian-Kopaei i sur. (2011) izvjestili su o povoljnom terapijskom utjecaju praška drijenovih plodova na aterosklerozu i njene čimbenike rizika u zečeva s hiperkolesterolemijom. Istraživanje u kojem su zečevi tijekom 60 dana dobivali 1 g praška droge/kg rezultiralo je smanjenjem vrijednosti aterogenog indeksa plazme, povećanje HDL-kolesterola te smanjenje ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida u životinja. Kasnije je dokazano da primjena plodova štiti organizam od prehranom-potaknute hiperlipidemije smanjujući razine serumskih triglicerida i sprječavajući stvaranje aterosklerotskih nakupina u torakalnoj aorti (Sozanski i sur., 2014). Hipolipidemijski učinak droge najviše se pripisuje antocijaninima, a doprinosi mu i loganska kiselina (Sozanski i sur., 2016), ursolna kiselina (Asgary i sur., 2014) te flavonoidi (Borradaile i sur., 2002). Antocijani mogu utjecati na aktivnost jetrenih enzima koji su važni u metabolizmu lipida (Lila, 2004).

#### *Učinci na vid i očne bolesti*

Smatra se da antocijanini kao i drugi antioksidansi mogu poboljšati vidnu funkciju i vidno polje kod pacijenata oboljelih od glaukoma normalne napetosti. Takav učinak postižu neuroprotektivnim djelovanjem, inhibicijom lipidne peroksidacije i poboljšanjem prokrvljenosti vidnog živca (Czerwinska i Melzig, 2018). Szumny i sur. (2015) proveli su studiju na zečevima gdje su ispitivali djelovanje antocijano-iridoidne frakcije, dobivene iz

plodova *Cronus mas*, na intraokularni tlak. Rezultat studije je smanjenje (19-25 %) intraokularnog tlaka nakon 2-3 sata intraokularne primjene frakcije ili otopine loganske kiseline (0,7 % vodene otopine koja sadrži 0,15 % natrijevog hijaluronata). Ovo istraživanje upućuje na potencijalno povoljan učinak polifenolnih sastavnica drijena kod dijabetičke i hipertenzivne retinopatije (Czerwinska i Melzig, 2018).

#### *Učinak u postmenopauzalne komplikacije*

Menopauza, koja nastupa nakon smanjene aktivnosti jajnika i razine estrogena, može dovesti do dugoročnih promjena u lipidnom i glikemijskom profilu i povećati rizik od kardiovaskularnih bolesti i osteoporoze. Gholamrezayi i sur. (2019) proveli su interventno, dvostruko slijepo, randomizirano kliničko ispitivanje na 84 žene u dobi od 45 do 60 godina koje su bile u menopauzi, sa ciljem da procjene utjecaj suplementacije ekstraktom ploda drijana na komplikacije kod žena u postmenopauzi. U studiji je sudjelovalo 84 žena podijeljenih u dvije skupine od kojih je jedna skupina uzimala 3 puta dnevno po 1 kapsulu (300 mg) biljnog ekstrakta, dok je druga dobivala placebo (škrob). Osmotjedna suplementacija s 900 mg ekstrakta ploda drijena rezultirala je smanjenom vrijednosti LDL/HDL omjera, TC/HDL omjera, fibrinogena, indeksa tjelesne mase, opsega struka ispitanika te pozitivim učinkom na vrijednost HDL kolesterola i ApoA1 u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok se razine leptina, serumskog inzulina, indeksa inzulinske rezistencije i inzulinske osjetljivosti nisu značajno razlikovale, ukazujući tako na klinički potencijal droge da smanji rizik za postmenopauzalne komplikacije.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Oksidativni stres smatra se glavnim rizikom za razvoj različitih bolesti jer uzrokuje oštećenje stanica. Organizam održava ravnotežu stvarajući antioksidanse koji djeluju kao hvatači reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) te na taj način sprječava oštećenje stanica. Međutim, stres, nezdrava prehrana i zagađenje okoliša rezultirali su povećanoj izloženosti vanjskim izvorima ROS-a. Stoga je primjena prirodnih antioksidansi područje interesa mnogih znanstvenika.

Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- ✓ ispitati prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina i antocijana u plodovima drijena
- ✓ odrediti sadržaj polifenolnih sastavnica u etanolnom ekstraktu plodova drijena
- ✓ istražiti antioksidacijski potencijal ekstrakta plodova drijena određujući sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala i radikala dušikovog (II) oksida

Svrha provedenih istraživanja u okviru ovog diplomskog rada bila je doprinijeti znanstvenim spoznajama o fitokemijskom sastavu i biomedicinskom potencijalu plodova drijena koji samoniklo raste u Hrvatskoj.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Biljni materijal i priprema ekstrakta

Zreli plodovi drijena sakupljeni su u kolovozu 2021., u okolici Zagreba. Plodovi su očišćeni od koštica te potom osušeni i usitnjeni.

Za potrebe daljnjih ispitivanja pripremljen je i etanolni ekstrakt plodova drijena. U tu je svrhu 30 g praškastog materijala preliveno s 300 ml 70 %-tnog etanola te ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 20 minuta. Nakon filtracije, biljni materijal je još jednom ekstrahiran 70 %-tnim etanolom uz iste uvjete, a dobiveni filtrati sjedinjeni. Ekstrakt je uparen do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača. Iskorištenje ekstrakcije bilo je 79,13 %. Ekstrakt je pohranjen u hladnjaku na 4 °C za daljnja ispitivanja.

### 3.2. Aparatura i kemikalije

#### *Instrumenti i pribor*

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći instrumenti i pribor:

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- kapilare za tankoslojnu kromatografiju 10 µL (Hirschmann, Eberstadt, Njemačka)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ploča Silikagel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakuum-uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar *Helios γ* (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

#### *Standardi, reagensi i ostale kemikalije*

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

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- 2-aminoetil-difenilborat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)



- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- askorbinska kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)
- butanol (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etanol 96 % (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Scharlau, Barcelona, Španjolska)
- fosfatom-puferirana otopina soli, PBS (0,01 M; pH 7,4) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- fosforna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kavena kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- kloridna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- kvercetin-3-glukozid (izokvercitrin) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- metanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- mravlja kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- naftiletildiamin hidroklorid, NED (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat dekahidrat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev nitrit (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev nitroprusid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- pirogolol 99 % (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- rutin (Fluka, Buchs, Švicarska)
- sulfanilamid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

### 3.3. Određivanje gubitka sušenjem

Na analitičkoj vagi je izvagana prazna, suha posudica za vaganje te je u nju zatim dodano 1 g droge i posudica je ponovno izvagana. Posudica s drogom potom je stavljena u sušionik i droga sušena na temperaturi 105 °C tijekom 2 sata. Nakon hlađenja u eksikatoru 30 minuta, posudica s drogom je opet izvagana (Vladimir-Knežević i sur., 2019).

Gubitak sušenjem određen je prema formuli:

$$\% \text{ gubitak sušenjem} = ((m_1 - m_2) * 100) / m_1,$$

gdje je  $m_1$  masa droge prije sušenja (g), a  $m_2$  masa droge poslije 2 sata sušenja pri 105 °C (g).

### 3.4. Ispitivanje fitokemijskog sastava drienovog ploda tankoslojnom kromatografijom

#### 3.4.1 Ispitivanje flavonoida i fenolnih kiselina

Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina provedena je metodom tankoslojne kromatografije. 1 g droge u prašku pomiješan je s 10 mL metanola u tikvici i sadržaj potom zagrijavan 10 minuta u vodenoj kupelji te nakon hlađenja filtriran. Dobiveni ekstrakt uzorka služio je kao ispitivana otopina. Poredbena otopina flavonoida pripravljena je otapanjem po 2,5 mg rutina, kvercitrina i izokvercitrin u 10 mL metanola, dok je poredbena otopina fenolnih kiselina pripravljena otapanjem po 2,5 mg klorogenske i kavene kiseline u 10 mL metanola. Kao nepokretna faza korišten je silikagel 60 F<sub>254</sub>, a pokretna faza dobivena je miješanjem etil-acetata, mravlje kiseline i vode u omjeru 80:10:10 (V/V/V). Poredbene otopine i ispitivana otopina linijski su nanosene u volumenu od 10 µL. Kromatogram je razvijan u visini do 8 cm u komori, a ploča osušena na zraku. Detekcija odijeljenih sastavnica provedena je prskanjem ploče s 1 %-tnom metanolnom otopinom 2-aminoetilestera difenilboratne kiseline i 5 %-tnom metanolnom otopinom polietilenglikola (NP/PEG). Ploča je promatrana pod UV svjetlom na 365 nm, a na 254 nm promatrano je gašenje fluorescencije.

#### 3.4.2 Ispitivanje antocijana

Kvalitativna analiza antocijana provedena je metodom tankoslojne kromatografije. 1 g droge u prašku pomiješan je s 10 mL metanola u tikvici i sadržaj potom zagrijavan 10 minuta u vodenoj kupelji te nakon hlađenja filtriran. Dobiveni ekstrakt uzorka služio je kao ispitivana otopina. Kao nepokretna faza korišten je silikagel 60 F<sub>254</sub>, a pokretna faza pripravljena je

miješanjem mravlje kiseline, vode i butanola u omjeru 16:19:65 (V/V/V). Ispitivana otopina linijski je nanjena u volumenu od 10 µL. Kromatogram je razvijan do visine od 8 cm u komori, a ploča osušena na zraku. Detekcija odijeljenih sastavnica provedena je vizualno na dnevnom svjetlu.

### **3.5. Spektrofotometrijsko određivanje polifenolnih sastavnica drijenovog ploda**

#### 3.5.1 Određivanje fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih kiselina u suhom plodu drijena provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (EDQM, 2020). 0,200 g suhog, usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano je s 80 mL 50 %-tnog etanola zagrijavanjem 30 minuta u tikvici na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja, ekstrakt je filtriran, a filtrat razrijeđen 50%-tnim etanolom u odmjernoj tikvici od 100 mL. Ispitivana otopina pripravljena je tako da alikvot od 1,0 mL ekstrakta prenesen u odmjernu tikvicu od 10 mL gdje su potom redom dodani sljedeći reagensi: 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa koji je pripravljen otapanjem 10 g natrijevog nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode, te 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijevog hidroksida. Sadržaj tikvice nadopunjen je vodom do oznake te je odmah izmjerena apsorbancija otopine na 505 nm.

Poredbena otopina dobivena je razrjeđivanjem 1,0 mL ekstrakta destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Određivanje je provedeno u triplikatu.

Maseni udio fenolnih kiselina, izražen kao ružmarinska kiselina, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = A \times 2,5/m,$$

gdje A predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 505 nm, a m masu droge u gramima.

Sadržaj fenolnih kiselina određen je i u etanolnom ekstraktu ploda drijena prema opisanom postupku, uzimajući u analizu manju početnu masu ekstrakta (0,100 g).

#### 3.5.2 Određivanje antocijana

Određivanje antocijana u suhom plodu drijena provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (EDQM, 2020). Usitnjena biljna droga (2 g) pomiješana je s 95 mL metanola i ekstrahirana na mehaničkoj tresilici u trajanju od 30 minuta, a potom u ultrazvučnoj kupelji tijekom 10 minuta. Nakon toga ekstrakt je filtriran u tikvicu od 100,0 mL

te nadopunjen metanolom do oznake. Dobivena otopina razrijeđena je 4 puta s 0,1 % otopinom HCl u metanolu (V/V). Apsorbancija je izmjerena na 528 nm. Kao poredbena otopina korišten je 0,1 % HCl u metanolu. Određivanje je provedeno u triplikatu.

Udio antocijana izračunat je kao cijanidin-3-glukozid klorid prema izrazu:

$$\% \text{ antocijana} = (A \times 400) / (718 \times m),$$

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 528 nm, a m masa droge u gramima.

Određivanje antocijana u etanolnom ekstraktu ploda drijena provedeno je istom metodom uz manje modifikacije: u ispitivanje je uzeto 0,500 g uzorka, te je ekstrakt nakon filtriranja razrijeđen 2 puta s 0,1 % HCl u metanolu. U skladu s time, modificiran je i izraz za izračun.

### 3.5.3 Određivanje trjeslovina

Određivanje trjeslovina u suhom plodu drijena provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (EDQM, 2020). Usitnjeni biljni materijal (1,000 g) preliven je sa 150 mL vode i ekstrahiran 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt je ohlađen te kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 250 mL. U tikvicu je dodana voda do oznake, te sadržaj ostavljen da stoji dok se čestice ne istalože. Potom je ekstrakt profiltriran preko filter papira, a prvih 50 mL filtrata odbačeno.

- Ukupni polifenoli

Kako bi se odredili ukupni polifenoli, 5 mL filtrata razrijeđeno je vodom do 25,0 mL. Zatim je 2,0 mL te otopine pomiješano s 1,0 mL Folin–Ciocalteu reagensom i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25,0 mL. Sadržaj tikvice nadopunjen je otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Određivanje je provedeno u triplikatu. Apsorbancija je izmjerena 30 minuta kasnije na valnoj duljini od 760 nm, uz vodu kao poredbenu otopinu.

- Polifenoli neadsorbirani na kožni prašak (netaninski polifenoli)

Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninski polifenoli) u 10,0 mL filtrata dodano je 0,10 g kožnog praška, a zatim je sadržaj tikvice stavljen na laboratorijsku tresilicu 60 minuta. Nakon završetka mućkanja sadržaj tikvice je filtriran, a 5,0 mL dobivenog filtrata razrijeđeno vodom do 25,0 mL. Potom je 2,0 mL te otopine pomiješano s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensom i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25,0 mL. Sadržaj tikvice nadopunjen je do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Određivanje je provedeno u triplikatu. Apsorbancija je izmjerena nakon 30 minuta na 760 nm, uz vodu kao poredbenu otopinu.

- Standard (pirogalol)

Za pripremu standarda u odmjernoj tikvici od 100,0 mL otopljeno je 50,0 mg pirogalola u vodi. 5,0 mL dobivene otopine razrijeđeno je vodom do 100,0 mL. 2,0 mL te otopine pomiješano je s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensom i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25,0 mL. Sadržaj tikvice nadopunjen je do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Određivanje je provedeno u triplicatu. Apsorbancija je izmjerena nakon 30 minuta na 760 nm, uz vodu kao poredbenu otopinu.

Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

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

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

Određivanje trjeslovina u suhom ekstraktu ploda drijena provedeno je na isti način, uz korištenje 0,500 g suhog ekstrakta ploda drijena za analizu.

#### 3.5.4 Određivanje flavonoida

Određivanje flavonoida u suhom plodu drijena provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (EDQM, 2020). Usitnjeni biljni materijal (0,600 g) prenesen je u tikvicu okruglog dna te su dodani 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L). Tikvica je sa sadržajem zagrijavana 30 minuta na vrućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Zatim je sadržaj filtriran u drugu tikvicu preko malo pamuka, a ostatak droge u tikvici i na pamuku (zajedno s pamukom) još je dva puta ekstrahiran sa po 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Ohlađeni i sjedinjeni filtrati filtrirani su preko filter-papira uz ispiranje tikvice i filter-papira u odmjernu tikvicu od 100 mL. Otopina je razrijeđena acetonom do oznake. 20,0 mL acetonskog ekstrakta preneseno je u lijevak za odjeljivanje i pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku izmućkivan je s etilacetatom, prvi put s 15 mL, a iduća tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjeni etilacetatni ekstrakti isprani su dva puta s po 50 mL vode u lijevku za odjeljivanje. Potom je etilacetatni ekstrakt filtriran preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL i razrijeđen etilacetatom do oznake. Ispitivana otopina pripravljena je tako što je 10,0 mL dobivenog etilacetatnog ekstrakta preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL. U tikvicu je dodan 1,0 mL reagensa aluminijskog klorida te 5 %-tna metanolna otopina octene kiseline do oznake. Poredbena otopina je pripravljena razrijeđivanjem 10,0 mL etilacetatnog ekstrakta 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. Određivanje je provedeno u triplikatu.

Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je prema izrazu

$$\% \text{ flavonoida} = (A \times 1,25)/m,$$

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm, a m masa droge u gramima.

Određivanje flavonoida u ekstraktu ploda drijena provedeno je prema jednakom, gore opisanom postupku.

### **3.6. Istraživanje antioksidativne aktivnosti etanolnog ekstrakta drijenovog ploda**

#### 3.6.1 Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog (II) oksida (NO)

Sposobnost ekstrakta drijenovog ploda i referentnih antioksidansa da hvataju slobodne NO radikale istražena je primjenom metode opisane u literaturi (Harput i sur., 2011). Serijskim razrjeđivanjem u 80 µL etanola pripremljen je koncentracijski niz uzoraka u rasponu od 1600-12,5 µg/mL. U kontrolne jažice umjesto uzorka stavljen je etanol. Određivanje je provedeno u duplikatu. U svaku jažicu dodano je 80 µL otopine natrijeva nitroprusida u PBS-u i sadržaj je promiješan. Potom je reakcijska smjesa inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 120 minuta. Nakon inkubacije u jažice je dodano 40 µL 1 % otopine sulfanilamida u 5 %-tnoj fosfornoj kiselini, a nakon 5 minuta dodano je 40 µL 0,1 % otopine NED-a te je sadržaj promiješan. Odmah potom izmjerena je apsorbancija na 545 nm u odnosu na slijepu probu koja je sadržavala sve reagense osim uzorka.

Sposobnost hvatanja NO radikala, izražena u postotcima, izračunata je prema sljedećem izrazu

$$(\%) \text{ NO antiradikalne sposobnosti} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100,$$

gdje je  $A_0$  apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala, a  $A_1$  je apsorbancija ispitivane otopine. Standardni antioksidansi kvercetin i askorbinska kiselina testirani su za usporedbu.

### 3.6.2 Određivanje sposobnosti hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala

Sposobnost ekstrakta plodova drijena da neutralizira slobodne DPPH radikale ispitana je spektrofotometrijskom metodom prema Bloisu opisanoj u literaturi (Blažeković i sur., 2010). U epruvetama je pripremljen niz serijskih razrjeđenja uzorka u 1,5 mL 70 %-tnog etanola tako da su konačne koncentracije uzorka u reakcijskoj smjesi u rasponu koncentracija od 1600-3,13  $\mu\text{g/mL}$ . Dvije epruvete su bile kontrolne, a sadržavale su 1,5 mL 70 %-tnog etanola umjesto uzorka. Određivanje je provedeno u duplikatu. U svaku epruvetu dodano je 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH radikala pomoću repetitivne pipete kojom je ujedno i promiješan sadržaj u epruveti. Reakcijska smjesa je inkubirana pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Nakon 30 minuta izmjerena je apsorbancija na 517 nm uz 70 %-tni etanol kao slijepu probu. Sposobnost hvatanja DPPH radikala, izražena u postocima, izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$(\%) \text{ DPPH antiradikalne sposobnosti} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100,$$

gdje je  $A_0$  apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (etanola), a  $A_1$  je apsorbancija ispitivane otopine umanjena za apsorbanciju samog uzorka. Standardni antioksidansi kvercetin i askorbinska kiselina testirani su za usporedbu.

### 3.7. Statistička analiza

Statistička obrada rezultata provedena je korištenjem računalnog programa Excel programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni inhibitorni učinak ( $IC_{50}$ ) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Gubitak sušenjem

Određivanje gubitka sušenjem je gravimetrijska metoda kojom se ispituje stupanj čistoće biljnih droga. Svaka droga sadrži određenu količinu vlage. To ovisi o konzistencije droge i vlažnosti atmosfere u kojoj se droga čuva. Voda može uzrokovati razgradnju bioaktivnih tvari, čime se smanjuje ili potpuno gubi njihov sadržaj u drogama. Također, na drogama s većim udjelom vlage lakše se razvijaju mikroorganizmi i insekti. Zbog svega navedenog važno je da vrijednost gubitka sušenjem bude u propisanim granicama (Vladimir-Knežević i sur., 2019). Dobiveni rezultati pokazuju da gubitak sušenjem za Corni mas fructus iznosi 7,71 %.

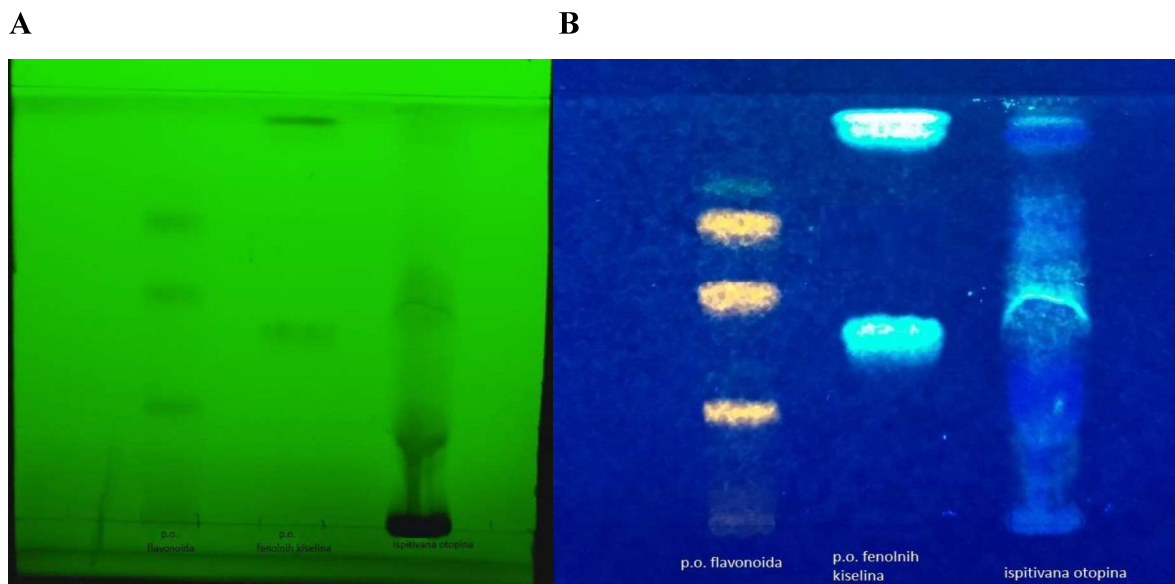
### 4.2. TLC karakterizacija polifenolnih sastavnica drijenovog ploda

Tankoslojnom kromatografijom provedena je kvalitativna analiza fenolnih kiselina, flavonoida i antocijana u plodovima vrste *Cornus mas*. Kao nepokretna faza korišten je silikagel 60 F<sub>254</sub>, a kao pokretna faza odgovarajuće smjese otapala. Sastavnice su karakterizirane prema položaju odijeljenih zona odnosno faktoru zaostajanja (R<sub>f</sub>) te boji i intenzitetu obojenja tih zona, u usporedbi s odgovarajućim referentnim spojevima (Kaštelan-Macan i sur., 2006).

#### 4.2.1 TLC profil flavonoida i fenolnih kiselina

Na tankom sloju silikagela, primjenom smjese otapala etil-acetat, mravlja kiselina i voda (80:10:10) kao pokretne faze, dokazana je prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina u drijenovom plodu. Nakon prskanja NP/PEG reagensom, dobiveni kromatogrami promatrani su pod UV lampom na 254 nm (zona gašenja fluorescencije) i na 365 nm (zone fluorescencije) te prikazani su na slici 5. Uspoređujući položaj (faktor zaostajanja, R<sub>f</sub>), boju i intenzitet odijeljenih zona ispitivane otopine s poredbenom otopinom flavonoida i fenolnih kiselina dokazna je prisutnost više fenolnih kiselina u drijenovom plodu, dok flavonoidne sastavnice pri navedenim uvjetima nisu detektirane.





**Slika 4.** Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u drijenovom plodu

**Pokretna faza:** etil-acetat, mravlja kiselina, voda (80:10:10 V/V/V)

**Nepokretna faza:** Silikagel 60 F<sub>254</sub>

**Detekcija:** A - UV-254 nm, B - NP/PEG reagens, UV-365 nm

**Ispitivana otopina:** metanolni ekstrakt drijenovog ploda

**Poredbena otopina:** kvercetin, izokvercitrin, rutin, kavena kiselina, klorogenska kiselina

Zone narančaste fluorescencije vidljive na kromatogramu pripadaju poredbenim flavonoidima: zona kvercitrina ( $R_f=0,71$ ), a ispod nje zona izokvercitrin ( $R_f=0,53$ ) te zona rutina ( $R_f=0,27$ ). Zone plave fluorescencije u poredbenoj otopini fenolnih kiselina potječu od kavene kiseline ( $R_f=0,92$ ) i klorogenske kiseline ( $R_f=0,44$ ). Uspoređujući kromatograme ispitivane s poredbenim otopinama utvrđena je prisutnost zone koje bojom i  $R_f$  vrijednošću odgovaraju kavenoj i klorogenskoj kiselini što ukazuje na prisutnost fenolnih kiselina u uzorku, dok flavonoidi nisu detektirani.

#### 4.2.2 TLC profil antocijana

Na tankom sloju silikagela, primjenom smjese otapala mravlja kiselina, voda i butanol u omjeru 16:19:65 (V/V/V), u drijenovom plodu je dokazana prisutnost antocijana (Slika 5). Prema literaturnim podacima, plave do ljubičasto-roze zone ( $R_f=0,2-0,5$ ) predstavljaju antocijane (Wagner i Bladt, 2009). Na kromatogramu ispitivane otopine uočene su najmanje dvije obojene zone koje upućuje na prisutnost antocijana u drijenovom plodu.



*Slika 5. Kromatogram antocijana u drijenovom plodu*

*Pokretna faza: mravlja kiselina, voda, butanol (16:19:65 V/V/V)*

*Nepokretna faza: Silikagel 60 F<sub>254</sub>*

*Detekcija: dnevno svjetlo*

*Ispitivana otopina: metanolni ekstrakt drijenovog ploda*

### **4.3. Sadržaj polifenolnih sastavnica u drijenovom plodu određen spektrofotometrijskim metodama**

Provedena je kvantitativna fitokemijska analiza plodova biljne vrste *Cornus mas* koja je obuhvaćala spektrofotometrijsko određivanje sadržaja različitih skupina polifenolnih spojeva - fenolnih kiselina, antocijana, trjeslovina i flavonoida u suhom plodu te njegovom etanolno vodenom ekstraktu.

#### **4.3.1 Sadržaj fenolnih kiselina**

Određivanje fenolnih kiselina provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na reakciji o-dihidroksifenilne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata s nitrit-molibdat reagensom te nastanku žuto obojenih kompleksnih spojeva. Zaluživanjem je žuta boja otopine prešla u narančasto-crvenu, a potom je izmjerena apsorbancija na 505 nm. Kvantitativnom analizom utvrđeno je da suhi plod vrste *Cornus mas* sadrži  $0,29 \pm 0,01$  % fenolnih kiselina, derivata hidroksicimetne kiseline, dok je njihov udio u etanolno vodenom ekstraktu droge iznosio  $0,32 \pm 0,07$  %, izraženo kao ružmarinska kiselina.

Dzydzan i sur. (2019) u svom istraživanju odredili su sadržaj fenolnih kiselina među kojima je osam derivata hidroksicimetne kiseline te jedan derivat hidroksibenzojeve kiseline. U suhom, crvenom plodu drijena utvrđeno je 1183,49 mg/100 g fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata).

#### 4.3.2 Sadržaj antocijana

Sadržaj antocijana određen je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na svojstvu antocijana da u jako kiseljoj sredini (pH=1) povećavaju apsorbciju na valnoj duljini 528 nm. Rezultati analize pokazali su da suhi drijenov plod sadrži  $0,06 \pm 0,002$  % antocijana, izraženih kao cijanidin-3-glukozid klorid. U etanolno vodenom ekstraktu droge utvrđen je istovjetan sadržaj antocijana ( $0,06 \pm 0,001$  %). Prethodna studija koju su proveli Tural i Koca (2008) pokazala je da plodovi vrste *C. mas* sakupljeni na području Turske sadrže ukupno 1,12 – 2,92 mg/g antocijana. Kucharska i sur. (2015) odredili su sadržaj antocijana u svježim drijenovim plodovima sakupljenima na području Ukrajine i Poljske te utvrdili da se vrijednosti kreću u širokom rasponu od 5,59 do 134,57 mg/100 g ( $341,18$  mg/100 g) i da ovise o genotipu (kultivaru/ekotipu) i okolišnim čimbenicima (lokacija i starost biljke).

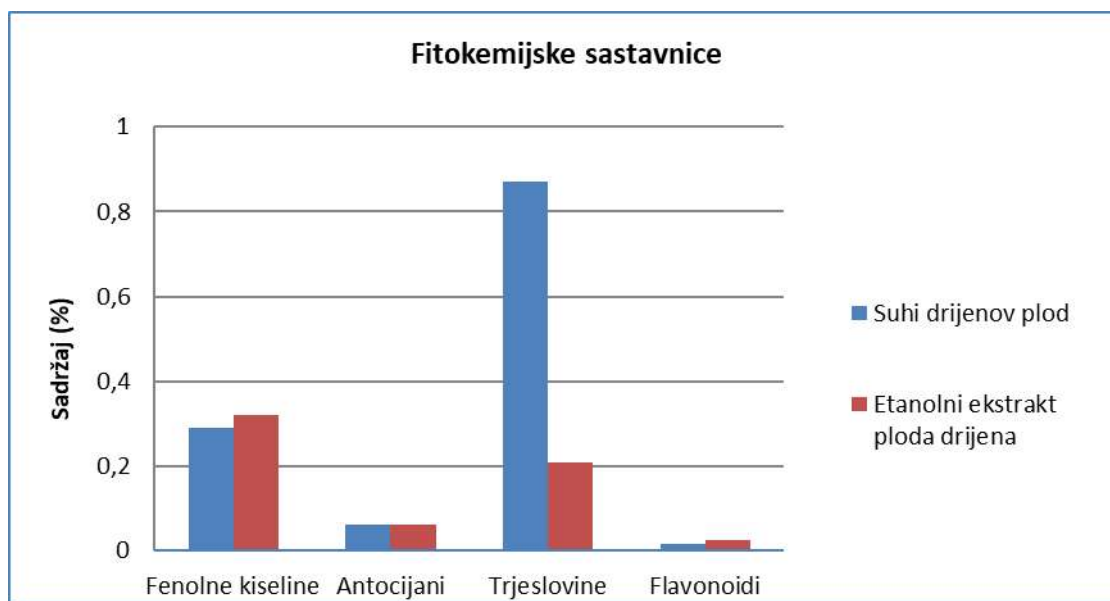
#### 4.3.3 Sadržaj trjeslovina

Određivanje trjeslovina zasniva se na određivanju ukupnih polifenola u ekstraktu biljne droge prije i nakon obrade kožnim praškom na koji se vežu trjeslovine. U analizi je korišten Folin-Ciocalteuov reagens s kojim polifenolne sastavnice stvaraju kompleksne spojeve plave boje. Apsorbancija takvih otopina izmjerena je na 760 nm. Sadržaj trjeslovina određen je iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak. Dobiveni rezultati su pokazali da droga *Corni mas fructus* sadrži  $0,87 \pm 0,03$  % trjeslovina izraženih kao pirogalol. Vodenoetanolni ekstrakt droge sadrži  $0,21 \pm 0,10$  % trjeslovina. Istraživanje koje su proveli Gunduz i sur. (2013) pokazalo je da sadržaj trjeslovina ovisi o zrelosti ploda. Nezreli, žuti plod sadržavao je 0,45 % trjeslovina, a zreli, tamno crveni dvostruko manje (0,19 %).

#### 4.3.4 Sadržaj flavonoida

Određivanje flavonoida provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na hidrolizi flavonoidnih glikozida. Nastali aglikoni odjeljeni su izmućkavanjem s etilacetatom. Otopina aglikona s aluminijskim kloridom stvara žuto obojene kompleksne spojeve čija je

apsorbacija izmjerena na 425 nm. Rezultati analize ukazali su na nizak sadržaj flavonoida u drijenovom plodu i njegovom etanolno-vodenom ekstraktu. Udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, u suhoj drogi iznosio je  $0,016 \pm 0,002$  %, a u ekstraktu  $0,026 \pm 0,001$  %. U istraživanju kojeg su proveli Cosmulescu i sur. (2019) sadržaj flavonoida se razlikovao ovisno o genotipu plodova vrste *C. mas*. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina na 100 grama svježih plodova. Najveća vrijednost ukupnih flavonoida iznosila je 64,48 mg ekvivalenta kvercetina/100 g, a najmanja 12,14 mg ekvivalenta kvercetina/100 g.



*Slika 6. Udio bioaktivnih sastavnica u drijenovom plodu i etanolno-vodenom ekstraktu droge*

#### 4.4. Antioksidativni učinak ekstrakta drijenovog ploda

##### 4.4.1 Sposobnost hvatanja slobodnih NO radikala

U tablici 1. prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti etanolnog ekstrakta plodova drijena, kvercetina i askorbinske kiseline dobiveni na temelju njihove sposobnosti hvatanja reaktivnog dušikovog spoja, dušikovog (II) oksida (NO). Spomenuti uzorci su testirani u rasponu koncentracija od 1600  $\mu\text{g/mL}$  do 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Natrijev nitroprusid korišten je u ovoj metodi kao izvor NO radikala, a radi se o reagensu koji u vodenoj otopini pri fiziološkom pH (7,4) spontano oslobađa NO. Nastali NO radikal reagira s kisikom, a njegovom oksidacijom nastaju nitrit ioni čija se koncentracija određuje u reakcijskoj smjesi na temelju reakcije s Griessovim reagensom (smjesa sulfanilamida i naftilendiamin hidroklorida) s kojim stvaraju azo-boju koja se može kvantificirati spektrofotometrijski (Rai i sur., 2006). Apsorbancija je

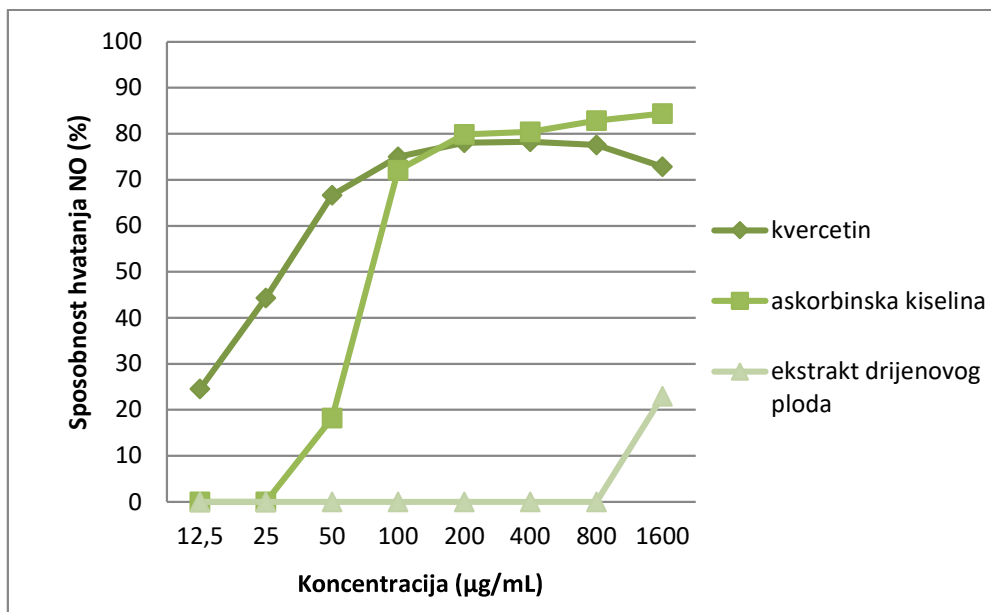
izmjerena pri valnoj duljini od 540 nm te je zatim za svaku koncentraciju uzorka izračunata sposobnost hvatanja NO radikala koja je izražena u postocima (%). Dobiveni rezultati pokazuju vrlo slaba antiradikalna svojstva ekstrakta plodova drijena jer jedino u uzorku najveće koncentracije (1600 µg/mL) uzorak pokazuje sposobnost inhibicije NO radikala. Za razliku od njega, referentni antioksidansi posjeduju značajnu sposobnost hvatanja slobodnih NO radikala. U najvećoj primijenjenoj koncentraciji od 1600 µg/mL, kvercetin je inhibirao 72 % NO radikala, askorbinska kiselina 84 %, dok je etanolno-vodeni ekstrakt plodova drijena pokazao tek 23 %-tnu inhibiciju NO radikala.

**Tablica 1.** Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti etanolno-vodenog ekstrakta plodova drijena, kvercetina i askorbinske kiseline metodom određivanja sposobnosti hvatanja slobodnih NO radikala

| Sposobnost hvatanja NO radikala (%) ± SD |                           |                      |              |
|--|---------------------------|----------------------|--------------|
| koncentracija (µg/mL)                    | ekstrakt drijenovog ploda | askorbinska kiselina | kvercetin    |
| <b>1600</b>                              | 22,97 ± 0,44              | 84,42 ± 0,85         | 72,84 ± 0,52 |
| <b>800</b>                               | nd                        | 82,87 ± 1,07         | 77,57 ± 1,92 |
| <b>400</b>                               | nd                        | 80,4 ± 1,14          | 78,26 ± 2,35 |
| <b>200</b>                               | nd                        | 79,85 ± 0,54         | 78,07 ± 2,62 |
| <b>100</b>                               | nd                        | 72,07 ± 0,94         | 74,98 ± 5,26 |
| <b>50</b>                                | nd                        | 18,22 ± 5,67         | 66,65 ± 8,85 |
| <b>25</b>                                | nd                        | nd                   | 44,29 ± 6,23 |
| <b>12,5</b>                              | nd                        | nd                   | 24,52 ± 0,68 |

Rezultati su izraženi u postocima (%), kao srednja vrijednosti ± standardna devijacija dvaju određivanja; nd - nije djelotvoran

Slika 7. donosi usporedni grafički prikaz odnosa koncentracije testiranih uzoraka i sposobnosti hvatanja NO radikala. Vidljivo je da ekstrakt plodova drijena pokazuje slabu sposobnost hvatanja NO radikala jedino pri najvećoj koncentraciji, dok pri nižim koncentracijama ne pokazuje antioksidativno djelovanje. Referentni antioksidansi posjeduju antiradikalnu aktivnost i pri nižim koncentracija. U koncentraciji do 100 µg/mL najsnažniju sposobnost inhibicije NO radikala ima kvercetin, a pri koncentracijama višim od 100 µg/mL askorbinska kiselina pokazuje nešto jaču NO antiradikalnu aktivnost.



**Slika 7.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti hvatanja slobodnih NO radikala za različite koncentracije etanolnog ekstrakta drijenovog ploda te referentnih antioksidansa

Tablica 4. prikazuje IC<sub>50</sub> vrijednosti ekstrakta plodova drijena i referentnih antioksidansa. Kvercetin ostvaruje 50 %-tno smanjenje stvaranja NO radikala u koncentraciji od 34 µg/mL dok askorbinska kiselina u gotovo dvostruko većoj koncentraciji (78 µg/mL).

#### 4.4.2 Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

Sposobnost ekstrakta ploda drijena da neutralizira slobodne radikale određena je DPPH metodom. DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) je komercijalno dostupan, stabilan, slobodan radikal koji sadrži nesporeni elektron. Upravo zbog toga posjeduje značajnu sposobnost apsorpcije u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm te je ljubičasto obojen. U reakciji DPPH s antioksidansima, antioksidansi doniraju ili atom vodika ili elektron što rezultira nastankom stabilnih dijamagnetičnih molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina svijetlo žute boje. Obezbojenje otopine, koje nastaje zbog redukcije DPPH radikala, očituje se smanjenjem apsorpcije koja je direktno proporcionalna sposobnosti ispitivanog uzorka da hvata slobodne radikale. Tablica 2. prikazuje rezultate određivanja sposobnosti hvatanja DPPH radikala za ekstrakt ploda vrste *Cornus mas* koji je testiran u rasponu koncentracija od 1600 µg/mL do 3,13 µg/mL. Tablica 3. prikazuje antioksidativnu aktivnost referentnih antioksidansa, askorbinske kiseline i kvercetina koji su testirani u rasponu koncentracija od

100 µg/mL do 0,20 µg/mL. Iz dobivenih rezultata uočljivo je da ekstrakt biljne vrste *Cornus mas* pokazuje o koncentraciji ovisnu sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, ali u usporedbi s referentnim antioksidansima ta je sposobnost manje izražena. Askorbinska kiselina i kvercetin u koncentraciji 3,13 µg/mL inhibiraju više od 90 % slobodnih DPPH radikala, dok ekstrakt plodova drijena postiže takav učinak tek u koncentraciji 400 µg/mL.

**Tablica 2.** Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakta drijenovog ploda metodom određivanja sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala

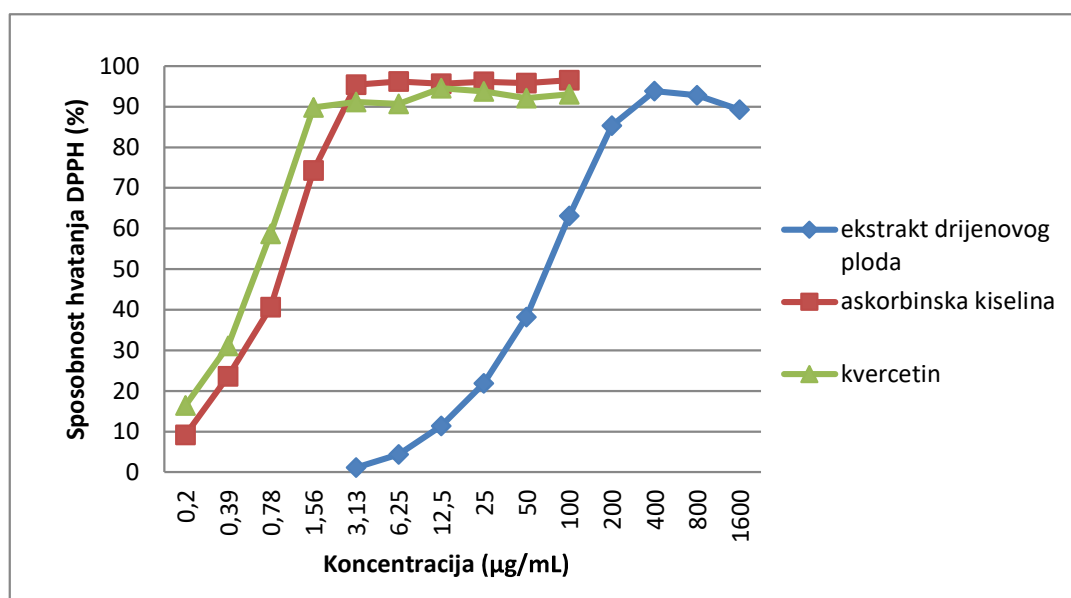
| Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (%) |                           |
|---|---------------------------|
| koncentracija (µg/mL)                           | ekstrakt drijenovog ploda |
| 1600  | 89,23 ± 0,23              |
| 800   | 92,83 ± 0,15              |
| 400   | 93,80 ± 0,13              |
| 200   | 85,32 ± 0,16              |
| 100   | 63,13 ± 0,30              |
| 50  | 38,18 ± 0,79              |
| 25  | 21,86 ± 0,01              |
| 12,5  | 11,42 ± 0,69              |
| 6,25  | 4,4 ± 0,14                |
| 3,13  | 1,13 ± 1,59               |

**Tablica 3.** Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti askorbinske kiseline i kvercetina metodom određivanja sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala

| Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (%) |                      |              |
|---|----------------------|--------------|
| koncentracija (µg/mL)                           | askorbinska kiselina | kvercetin    |
| 100   | 96,48 ± 0,03         | 93,07 ± 1,56 |
| 50  | 95,84 ± 0,93         | 92,11 ± 3,39 |
| 25  | 96,16 ± 0,48         | 93,72 ± 1,11 |
| 12,5  | 95,69 ± 0,18         | 94,52 ± 0,02 |
| 6,25  | 96,17 ± 0,04         | 90,66 ± 4,97 |
| 3,13  | 95,38 ± 0,18         | 91,14 ± 3,49 |
| 1,56  | 74,32 ± 0,18         | 89,84 ± 1,65 |
| 0,78  | 40,65 ± 4,36         | 58,71 ± 0,72 |
| 0,39  | 23,64 ± 17,95        | 31,13 ± 1,45 |
| 0,2   | 9,19 ± 0,66          | 16,45 ± 1,29 |

Slika 8. donosi usporedni grafički prikaz antioksidativne aktivnosti ekstrakta biljne vrste *Cornus mas* i askorbinske kiseline te kvercetina. Referentni antioksidansi pokazuju podjednako snažnu sposobnost hvatanja DPPH radikala, dok je za postizanje istovjetnog

učinka potrebna značajno viša koncentracija ekstrakta.



**Slika 8.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala za različite koncentracije ekstrakta drijenovog ploda te referentnih antioksidansa

Tablica 4. prikazuje  $IC_{50}$  vrijednosti ekstrakta drijenovog ploda i referentnih antioksidansa. Ekstrakt drijenovog ploda inhibira 50 % slobodnih DPPH radikala pri koncentraciji 76,14 µg/mL, a referentni antioksidansi askorbinska kiselina i kvercetin postiže taj učinak pri znatno nižim koncentracijama (0,96 µg/mL i 0,71 µg/mL).

**Tablica 4.** Koncentracije etanolno-vodenog ekstrakta drijenovog ploda i referentnih antioksidansa koje uzrokuju 50 %-tnu inhibiciju slobodnih radikala ( $IC_{50}$ )

| metoda određivanja antioksidativne aktivnosti | $IC_{50}$ koncentracija (µg/mL) |                      |              |
|---|---------------------------------|----------------------|--------------|
|   | ekstrakt drijenovog ploda       | askorbinska kiselina | kvercetin    |
| Sposobnost hvatanja DPPH radikala             | 76,14 ± 1,16                    | 0,95 ± 0,12          | 0,71 ± 1,00  |
| Sposobnost hvatanja NO radikala               | <i>nu</i>                       | 78,68 ± 1,00         | 34,19 ± 5,47 |

*nu* – nije utvrđena



## 5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu provedena je kvalitativna i kvantitativna fitokemijska analiza hrvatskog uzorka ploda drijena (*Cornus mas* L.) te njegova etanolno-vodenog ekstrakta. Tankoslojnom kromatografijom dokazana je prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina i antocijana u istraživanom plodu. Primjenom spektrofotometrijskih metoda utvrđeno je da drijenov plod sadrži 0,29 % fenolnih kiselina, 0,06 % antocijana, 0,87 % trjeslovina i 0,02 % flavonoida, dok je u etanolno-vodenom ekstraktu droge utvrđen sadržaj 0,32 % fenolnih kiselina, 0,06 % antocijana, 0,21 % trjeslovina i 0,03 % flavonoida.

Biomedicinski potencijal drijenova ploda sakupljenog u kontinentalnom dijelu Hrvatske vrednovan je ispitivanjem antioksidativne aktivnosti. Dokazano je da etanolno-vodeni ekstrakt ploda drijena posjeduje sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala te da u koncentraciji 76,14  $\mu\text{g/mL}$  neutralizira 50 % slobodnih DPPH radikala. Uspoređujući antiradikalni učinak s onim referentnih antioksidansa, ekstrakt drijenova ploda djelovao je slabije. Kvercetin je pokazao 50 %-tni inhibitorni učinak na DPPH radikale u koncentraciji 0,71  $\mu\text{g/mL}$ , dok je askorbinska kiselina isti učinak ostvarila pri nešto višoj koncentraciji ( $\text{IC}_{50} = 0,96 \mu\text{g/mL}$ ). Za razliku od čistih antioksidansa, ispitivani ekstrakt drijenovog ploda nije pokazao značajnu sposobnost hvatanja NO radikala. U najvećoj testiranoj koncentraciji (1600  $\mu\text{g/mL}$ ) utvrđena je sposobnost hvatanja 22,97 % NO radikala dok pri nižim koncentracijama nije bio djelotvoran.  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti kvercetina i askorbinske kiseline iznosile su 34,19  $\mu\text{g/mL}$  odnosno 78,68  $\mu\text{g/mL}$ .

Rezultati ovog diplomskog rada doprinose znanstvenim spoznajama o fitokemijskom sastavu i antioksidacijskom potencijalu drijena koji samoniklo raste u Hrvatskoj.

## 6. LITERATURA

Asgary S, Rafieian-Kopaei M, Shamsi F, Najafi S, Sahebkar A. Biochemical and histopathological study of the anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in alloxan-induced diabetic rats. *J Complement Integr Med*, 2014, 11, 63–69.

Bijelić SM, Golšin BR, Ninić Todorović J, Cerović SB, Popović BM. Physicochemical fruit characteristics of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes from Serbia. *Hort Sci*, 2011, 46, 849–853.

Blažeković B, Vladimir-Knezević S, Brantner A, Stefan MB. Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka': a comparative study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules*, 2010, 15(9), 5971-87.

Borradaile NM, De Dreu LE, Barrett PHR, Huff MW. Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters. *J Lipid Res*, 2002, 43, 1544–1554.

Cosmulescu S, Trandafir I, Cornescu F. Antioxidant capacity, total phenols, total flavonoids and colour component of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes. *Not Bot Horti Agrobo*, 2019, 47, 10.15835/nbha47111375.

Czerwinska EM, Melzig FM. *Cornus mas* and *Cornus Officinalis*—Analogies and Differences of two medicinal plants traditionally used. *Front Pharmacol*, 2018,09, 1-28.

Deng S, West BJ, Jensen CJ. UPLC-TOF-MS characterization and identification of bioactive iridoids in *Cornus mas* fruit. *J Anal Methods Chem*, 2013, 710972.

Drkenda P, Spahic A, Begic-Akagic A, Gasi F, Vranac A, Hudina M, Blanke M. Pomological characteristics of some autochthonous genotypes of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Erwerbs-Obstbau*, 2014, 56, 59–66.

Dujmović Purgar D, Duralija B, Mešić A, Vokurka A, Rubeša A. Rasprostranjenost i važnost roda *Cornus* u Hrvatskoj. *Pomol Croat*, 2012, 18, 33-45.

Dzydzan O, Bila I, Kucharska AZ, Brodyak I, Sybirna N. Antidiabetic effects of extracts of

red and yellow fruits of cornelian cherries (*Cornus mas* L.) on rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Food funct*, 2019, 10, 6459-6472.

EDQM, European Pharmacopoeia. The 10th Edition (Ph. Eur. 10.0.), Council of Europe, Strasbourg, 2020.

Flora Croatica baza podataka, <http://hirc.botanic.hr/fcd>, pristupljeno 15.02.2022

Gelenčir J, Gelenčir J. Atlas ljekovitog bilja. Zagreb, Prosvjeta, 1991, str. 199.

Gholamrezayi A, Aryaeian N, Rimaz S, Abolghasemi J, Fallah S, Moradi N, Taghizadeh M. The effect of *Cornus mas* fruit extract consumption on lipid profile, glycemic indices, and leptin in postmenopausal women— A randomized clinical trial. *Phytother Res*, 2019, 33, 2979 – 2988.

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Rijeka, Ex Libris, 2005, str. 212.

Gunduz K, Saracoglu O, Ozgen M, Serce S. Antioxidant, physical and chemical characteristics of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) at different stages of ripeness. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*, 2013, 12, 59-66.

Harput US, Genc Y, Khan N, Saracoglu I. Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Rec Nat Prod*, 2011, 5 (2), 100-107.

<http://herbni.com/eng/cornelian-cherry-dogwood-cornus-mas.html>, pristupljeno 13.07.2022.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121078/>, pristupljeno 09.07.2022.

<https://www.vitaflora.lt/en/nauji/by-plant-type/fruit-edible/dogwood/cornelian-cherry-dogwood-cornus-mas-detail>, pristupljeno 13.07.2022.

Jaćimović V, Božović D, Ercisli S, Ognjanov V, Bosančić B. Some fruit characteristics of selected cornelian cherries (*Cornus mas* L.) from Montenegro. *Erwerbs-Obstbau*, 2015, 57, 119–124.

Jayaprakasam B, Olson LK, Schutzki RE, Tai MH, Nair MG. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in

Cornelian cherry (*Cornus mas*). *J Agric Food Chem*, 2006, 54, 243–248.

Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem*, 2005, 1, 28–31.

Jurišić Grubešić R, Vladimir-Knežević S. Biološki aktivne tvari vrsta roda *Plantago* L. *Farm Glas*, 2004, 60, 79-89.

Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija, Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006, str. 51.

Krisch J, Galgóczy L, Tölgyesi M, Papp T, Vágvölgyi C. Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and Gramnegative bacteria. *Acta Biol Szeged*, 2008, 52, 267–270.

Kucharska AZ, Szumny A, Sokół-Letowska A, Piórecki N, Klymenko SV. Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *J Food Comp Anal*, 2015, 40, 95–102.

Kušan F. Ljekovito bilje – Sistematski prikaz najvažnijeg ljekovitog, otrovnog i industrijskog (tehničkog) bilja čitavoga svijeta. Zagreb, izdano u vlastitoj nakladi, 1938, str. 251.

Lila MA. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *Biomed Res Int*, 2004, 2004, 306–313.

Milenković-Andelković AS, Andelković MZ, Radovanović AN, Radovanović BC, Nikolić V. Phenol composition, DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of Cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts. *Hem Ind*, 2015, 69, 331–337.

Moldovan B, Filip A, Clichici S, Suharoschi R, Bolfa P, David L. Antioxidant activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits extract and the in vivo evaluation of its anti-inflammatory effects. *J Funct Foods*, 2016, 26, 77–87.

Pawlowska AM, Camangi F, Braca A. Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L. (Cornaceae) fruits. *Food Chem*, 2010, 119, 1257–1261.

Perova IB, Zhogova AA, Poliakova AV, Éller KI, Ramenskaia GV, Samylina IA. Biologically active substances of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.). *Vopr Pitan*, 2014, 83, 86–94.

Rafieian-Kopaei M., Asgary S., Adelnia A., Setorki M., Khazaei M., Kazemi S., Shamsi F. The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits. *J Med Plants Res*, 2011, 5, 2670–2676.

Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104, 322-327.

Reich L. Cornelian cherry from the shores of Ancient Greece. *J Arnold Arbor*, 1996, 56, 2-7.

Soltani R, Gorji A, Asgary S, Sarrafzadegan N, Siavash M. Evaluation of the effects of *Cornus mas* L. fruit extract on glycemic control and insulin level in type 2 diabetic adult patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 740954.

Somi MH, Banihabib N, Dehghan G, Haghi ME, Panahi F. Hepatoprotective effect of *Cornus mas* fruits extract against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in male albino rats. *Thrita*, 2014, 3, 17624.

Sozański T, Kucharska AZ, Rapak A, Szumny D, Trocha M, Merwid-Ląd A, Piasecki T, Piorecki N, Magdalan J, Szelag A. Iridoid–loganic acid versus anthocyanins from the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry): common and different effects on diet-induced atherosclerosis, PPARs expression and inflammation. *Atherosclerosis*, 2016, 254, 151–160.

Sozanski T, Kucharska AZ, Szumny A, Magdalan J, Bielska K, Merwid-Lad A, Wozniak A, Dzimira S, Piorecki N, Trocha M. The protective effect of the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry) on hypertriglyceridemia and atherosclerosis through PPARalpha activation in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*, 2014, 21, 1774–1784.

Szczepaniak OM, Kobus-Cisowka J, Kusek W, Przeor M. Functional properties of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.): A comprehensive review. *Eur Food Res Technol*, 2019, 245, 2071-2087.

Szumny D, Sozanski T, Kucharska AZ, Dziewiszek W, Piorecki N, Magdalan J, Chlebda-Sieragowska E, Kupczynski R, Szelag A, Szumny A. Application of cornelian cherry iridoid-polyphenolic fraction and loganic acid to reduce intraocular pressure. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 1-8, 939402.

Šilić Č. Atlas drveća i grmlja. Sarajevo, Svjetlost, 1990, str. 140.

Tenuta MC, Deguin B, Loizzo MR, Cuyamendous C, Bonesi M, Sicari V, Trabalzini L, Mittaine – Offer AC, Xiao J, Tundis R. An overview of traditional uses, phytochemical compositions and biological activities of edible fruits of european and asian *Cornus* species. *Foods*, 2022, 11, 1240.

Tural S, Koca I. Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Sci Horti*, 2008, 116, 362-366.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Kindl M, Praktikum iz Farmakognozije 1. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2019, str. 1.

Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas, 2. izd., Berlin Heidelberg: Springer, 2009, str. 195-197., 362.

Zarei L, Sadrkhanlou R, Shahrooz R, Malekinejad H, Eilkhani Zadeh B, Ahmadi A. Protective effects of vitamin E and *Cornus mas* fruit extract on methotrexate-induced cytotoxicity in sperms of adult mice. *Vet Res Forum*, 2014, 5, 21–27.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada istraženi su fitokemijski sastav i antioksidacijska svojstva ploda vrste *Cornus mas*. Metodom tankoslojne kromatografije u drogi je dokazana prisutnost fenolnih kiselina i antocijana. Spektrofotometrijskim metodama određeno je da ekstrakt drijenovog ploda sadrži 0,32 % fenolnih kiselina, 0,06 % antocijana, 0,21 % trjeslovina te 0,03% flavonoida. Antioksidacijski potencijal ekstrakta drijenovog ploda vrednovan je na temelju sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i uspoređen s aktivnošću referentnih antioksidansa (askorbinska kiselina i kvercetin). Utvrđeno je da etanolno-vodeni ekstrakt droge posjeduje sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala te ostvaruje 50%-tnu učinkovitost pri koncentraciji 76,14 µg/mL. Za razliku od čistih antioksidansa, ispitivani ekstrakt drijenovog ploda nije pokazao značajnu sposobnost hvatanja NO radikala. Dobiveni rezultati doprinose znanstvenim spoznajama o bioaktivnim sastavnicama i antioksidacijskom potencijalu drijena koji raste u Hrvatskoj.

In this work, phytochemical composition and antioxidant properties of *Cornus mas* fruit were studied. Thin-layer chromatography revealed the presence of phenolic acids and anthocyanins in the studied fruit. It was determined by spectrophotometric methods that the cornelian cherry fruit extract contains 0.32% phenolic acids, 0.06% anthocyanins, 0.21% tannins and 0.03% flavonoids. The antioxidant potential of the extract was evaluated based on the ability to scavenge free radicals and was compared with the activity of reference antioxidants (ascorbic acid and quercetin). It was established that the cornelian cherry fruit extract possesses the ability to scavenge DPPH free radicals and achieves 50% efficiency at concentration 76.14 µg/mL. In contrast to reference antioxidants, the investigated plant extract did not show significant ability to scavenge NO radicals. The obtained results contribute to scientific knowledge on the bioactive compounds and antioxidant potential of cornelian cherry fruit originating from Croatia.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognozijsku  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Fitokemijski sastav i antioksidativno djelovanje ploda drijena (*Cornus mas* L.)

Ivana Miholić

#### SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada istraženi su fitokemijski sastav i antioksidacijska svojstva ploda vrste *Cornus mas*. Metodom tankoslojne kromatografije u drogi je dokazana prisutnost fenolnih kiselina i antocijana. Spektrofotometrijskim metodama određeno je da ekstrakt drijenovog ploda sadrži 0,32 % fenolnih kiselina, 0,06 % antocijana, 0,21 % trjeslovina te 0,03% flavonoida. Antioksidacijski potencijal ekstrakta drijenovog ploda vrednovan je na temelju sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i uspoređen s aktivnošću referentnih antioksidansa (askorbinska kiselina i kvercetin). Utvrđeno je da etanolno-vodeni ekstrakt droge posjeduje sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala te ostvaruje 50%-tnu učinkovitost pri koncentraciji 76,14 µg/mL. Za razliku od čistih antioksidansa, ispitivani ekstrakt drijenovog ploda nije pokazao značajnu sposobnost hvatanja NO radikala. Dobiveni rezultati doprinose znanstvenim spoznajama o bioaktivnim sastavnicama i antioksidacijskom potencijalu drijena koji raste u Hrvatskoj.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 8 grafičkih prikaza, 4 tablice i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Cornus mas*, drijenov plod, Corni mas fructus, antioksidativna aktivnost, fenolne kiseline, polifenoli

Mentor: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Hrvoje Rimac**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 21. srpanj 2022.



## Basic documentation card

University of Zagrebu  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

### Phytochemical composition and antioxidant activity of cornelian cherry fruit (*Cornus mas* L.)

Ivana Miholić

#### SUMMARY

In this work, phytochemical composition and antioxidant properties of *Cornus mas* fruit were studied. Thin-layer chromatography revealed the presence of phenolic acids and anthocyanins in the studied fruit. It was determined by spectrophotometric methods that the cornelian cherry fruit extract contains 0.32% phenolic acids, 0.06% anthocyanins, 0.21% tannins and 0.03% flavonoids. The antioxidant potential of the extract was evaluated based on the ability to scavenge free radicals and was compared with the activity of reference antioxidants (ascorbic acid and quercetin). It was established that the cornelian cherry fruit extract possesses the ability to scavenge DPPH free radicals and achieves 50% efficiency at concentration 76.14 µg/mL. In contrast to reference antioxidants, the investigated plant extract did not show significant ability to scavenge NO radicals. The obtained results contribute to scientific knowledge on the bioactive compounds and antioxidant potential of cornelian cherry fruit originating from Croatia.

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

Thesis includes: 34 pages, 8 figures, 4 tables i 48 references. Original is in Croatian language.

Ključne riječi: *Cornus mas*, cornelian cherry fruit, ethanol extract of cornelian cherry fruit, antioxidant activity, phytochemical compounds

Menthor: **Biljana Blažeković, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Blažeković, Ph.D.**, Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Hrvoje Rimac, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 21 July 2022.