

Sadržaj fenola, flavonoida i antiradikalna aktivnost in vitro metanolnih ekstrakata plodova i listova vrsta *Cornus mas* L. i *Cornus officinalis* Siebold & Zucc.

Gelo, Andrea

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:707509>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-17**



Repository / Repozitorij:

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



Andrea Gelo

**Sadržaj fenola, flavonoida i antiradikalna
aktivnost *in vitro* metanolnih ekstrakata plodova i
listova vrsta *Cornus mas* L. i *Cornus officinalis*
Siebold & Zucc.**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutska botanika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Maje Friščić.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Maji Friščić na stručnom vodstvu i pomoći pruženoj tijekom izrade diplomskog rada. Najljepša hvala Luci Petrić i Veri Crkvenčić, mag. pharm. na ustupanju biljnog materijala te hvala mojoj obitelji na podršci i razumijevanju.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Vrste roda <i>Cornus</i> L. | 2 |
| 1.1.1. <i>Cornus mas</i> L. | 3 |
| 1.1.2. <i>Cornus officinalis</i> Siebold & Zucc. | 4 |
| 1.1.3. <i>Cornus sanguinea</i> L. | 6 |
| 1.1.4. <i>Cornus alba</i> L. | 7 |
| 1.1.5. <i>Cornus hungarica</i> Kárpáti | 7 |
| 1.2. Kemizam, tradicionalna primjena i biološki učinci vrste <i>Cornus mas</i> L. | 8 |
| 1.3. Kemizam, tradicionalna primjena i biološki učinci vrste <i>C. officinalis</i> Siebold & Zucc. | 11 |
| 1.4. Slobodni radikali i antioksidansi | 12 |
| 1.5. Polifenoli i flavonoidi | 13 |
| 1.6. Ultrazvučna ekstrakcija | 14 |
| 1.7. Liofilizacija | 15 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 17 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 19 |
| 3.1. Materijali | 20 |
| 3.1.1. Biljni materijal | 20 |
| 3.1.2. Kemikalije | 23 |
| 3.1.3. Uređaji | 23 |
| 3.2. Metode ispitivanja | 24 |
| 3.2.1. Priprema biljnog materijala | 24 |
| 3.2.2. Priprema ekstrakata | 24 |
| 3.2.3. Određivanje ukupnih fenola | 27 |
| 3.2.4. Određivanje flavonoida | 29 |
| 3.2.5. Određivanje antioksidativnog učinka <i>in vitro</i> ABTS testom | 31 |
| 3.2.6. Određivanje antioksidativnog učinka <i>in vitro</i> DPPH testom | 33 |
| 3.3. Statistička obrada podataka | 34 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 35 |
| 4.1. Određivanje ukupnih fenola | 36 |
| 4.1.1. Baždarni pravac galne kiseline | 36 |
| 4.1.2. Sadržaj ukupnih fenola | 37 |
| 4.2. Određivanje flavonoida | 41 |
| 4.2.1. Baždarni pravac kvercetina | 41 |

| | |
|--|----|
| 4.2.2. Sadržaj flavonoida..... | 42 |
| 4.3. Određivanje antioksidativnog učinka <i>in vitro</i> ABTS testom | 45 |
| 4.3.1. Antiradikalna aktivnost Troloxa..... | 45 |
| 4.3.2. Antiradikalna aktivnost uzoraka..... | 47 |
| 4.4. Određivanje antioksidativnog učinka <i>in vitro</i> DPPH testom | 49 |
| 4.4.1. Antiradikalna aktivnost Troloxa..... | 49 |
| 4.4.2. Antiradikalna aktivnost uzoraka..... | 51 |
| 4.5. Korelacije između različitih parametara | 53 |
| 5. ZAKLJUČAK | 55 |
| 6. LITERATURA..... | 57 |
| 7. SAŽETAK..... | 63 |
| 7.1. Sažetak..... | 64 |
| 7.2. Summary..... | 65 |

1. UVOD

1.1. Vrste roda *Cornus* L.

Vrste roda *Cornus* pripadaju porodici Cornaceae koja se sastoji od pedesetak vrsta stabala ili grmova (Dujmović Purgar i sur., 2012). Većinom su listopadne vrste, ali postoji i nekoliko vazdazelenih poput vrste *Cornus capitata* Wall. (Chettri i sur., 2012). Rasprostranjene su na području Sjeverne Amerike, Europe, većeg dijela Azije, na sjeverozapadu Južne Amerike te na području istočne i središnje Afrike (<https://powo.science.kew.org/>).

Na području Hrvatske samoniklo rastu 4 vrste roda *Cornus*, a to su *Cornus mas* L. (crveni drijen), *Cornus sanguinea* L. (svib drijen), *Cornus alba* L. (bijeli ili sibirski drijen) i *Cornus hungarica* Kárpáti (mađarski drijen) (Nikolić, 2019; Dujmović Purgar i sur., 2012).

Osnovne značajke ovih vrsta su jednostavni, cjeloviti i nasuprotno smješteni listovi, većinom paralelne nervature, bez palistića. Cvjetovi su dvospolni, najčešće tetramerni, skupljeni u štitaste cvatove. Čaška je građena od 4 većinom slobodna, malena i neuočljiva lapa, ponekad reducirana na zubiće pri gornjem rubu plodnice. Vjenčić je građen od 4 slobodne latice. Plod je dvosjemena koštunica, rijetko boba koja sazrijeva početkom jeseni (Nikolić, 2019).

1.1.1. *Cornus mas* L.

Hrvatski naziv ove vrste je crveni drijen (Nikolić, 2019).

Biljka raste na području srednje i južne Europe, Male Azije, Kavkaza, Krima i jugoistočnog Irana. Česta je vrsta u području listopadnih hrastovih šuma i šumskih rubova, a može se naći i u šikarama te na grmljem obraslim obroncima. Najbolje uspijeva na toplim i suhim vapnenačkim staništima. Dobro podnosi plitka tla i jako sunce. Raste na nadmorskim visinama do 1300 m (Nikolić i Kovačić, 2008).

Biljka je listopadni grm ili manje drvo okruglaste krošnje visine do 10 m. Na mladim primjercima kora je glatka i sivkasto crna, a na starim je narančastosmeđa, raspucana i ljuska se u listiće. Listovi su nasuprotni, ovalni do jajasti, cjelovitog ruba, šiljastih vrhova, srpasto povijenih žila, dužine do 8 cm i širine do 3 cm. Na naličju listova u uglovima žila nalaze se čuperci bijelih dlačica. Cvjetovi su zlatnožuti, dvospolni, tetramerni i sakupljeni u jednostavne štitaste cvatove koji se pojavljuju u rano proljeće prije listanja. Pri bazi imaju četverolisni ovoj. Plod (drenjina, drenula) je crvena, glatka, jajolika koštunica dužine oko 15 mm i širine oko 5 mm. Sadrži elipsastu sjemenku. Plod dozrijeva početkom jeseni, u kolovozu i rujnu (Nikolić i Kovačić, 2008; Domac, 2002).



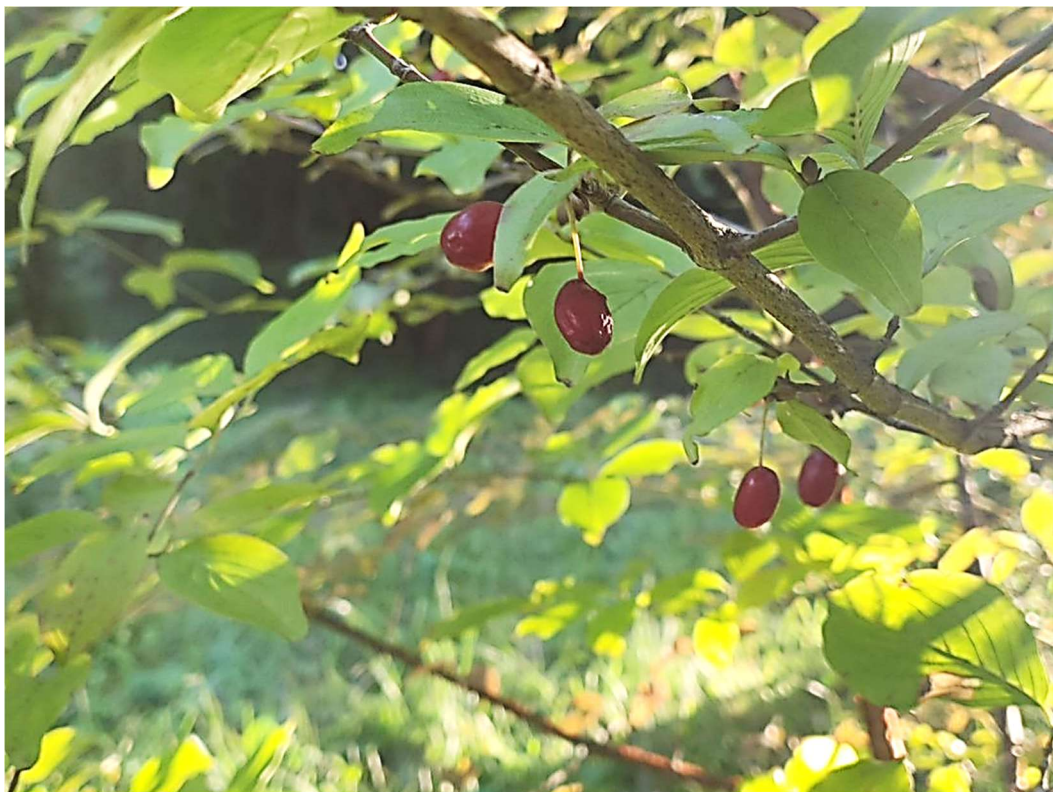
Slika 1. *Cornus mas* L., Vugrovec (autor: Dragana Petrić)

1.1.2. *Cornus officinalis* Siebold & Zucc.

Hrvatski naziv ove vrste je kineski drijen.

Biljka potječe s područja Kine, Japana i Koreje (Ma i sur., 2014).

Biljka je listopadni razgranati grm ili manje drvo visine do 10 m sa sivkasto-smeđom korom. Raste na nadmorskoj visini od 400 do 1500 m. Vrlo je slična vrsti *Cornus mas* L., ali cvjeta jedan tjedan prije, a plod joj dozrijeva kasnije. Listovi su tamnozeleni, ovalno-lancetasti ili eliptični te nasuprotni, duljine 5,5 do 10 cm i širine 2,5 do 4,5 cm. Svaki list ima ušiljen vrh i široku klinastu ili okruglu bazu s potpuno zelenim licem bez dlaka. Naličje lista je svijetlozeleno s čupercima crvenosmeđih dlačica u uglovima bijelih dlakavih žila. Cvjetovi imaju četiri gola, široko trokutasta reznja čaške i četiri latice sa žutim lancetastim jezičcima dugim 3,3 mm. Cvjetovi se pojavljuju krajem zime ili u vrlo rano proljeće prije listanja, a plodovi se javljaju od rujna do listopada. Štitasti cvatovi imaju četverolisni ovoj odnosno četiri ljubičasta ovalna i blago dlakava pricvjetna lista (brakteje) dužine do 8 mm koji otpadaju nakon cvatnje. Plod je duguljasta i crvena koštunica duljine 1,2 do 1,7 cm i promjera 5 do 7 mm, koja je jestiva, ali trpka (Huang i sur., 2018).



Slika 2. *Cornus officinalis* Siebold & Zucc., Farmaceutski botanički vrt „Fran Kušan“



Slika 3. Usporedba listova i plodova vrsta *Cornus mas* (lijevo) i *C. officinalis* (desno)

1.1.3. *Cornus sanguinea* L.

Hrvatski naziv ove vrste je svib drijen (Nikolić, 2019).

Biljka raste na području Europe i u zapadnoj Aziji, na toplim, sunčanim ili polusjenovitim staništima. Može se pronaći na rubovima šuma i u sastavu šikara i živica. Njezina rasprostranjenost doseže i do 1300 m nadmorske visine.

Svib je listopadni grm visine do 6 m. Listovi su naizmjenični, ovalnog oblika, cjelovitog i valovitog ruba. Na naličju su svjetliji i imaju nepravilno raspoređene, jednokrake dlake. U jesen poprime tamnocrvenu boju. Cvjetovi su sitni, dvospolni i bijele boje, skupljeni u štitaste cvatove. Sastavljeni su od 4 bijele latice koje su s donje strane prileglo dlakave. Čaška je reducirana na 4 zupca. Imaju 4 prašnika, a plodnica je podrasla. Cvatovi su bez ovoja. Cvate nakon listanja u kasno proljeće. Plod je glatka, okruglasta, crna koštunica s bijelim točkicama koja sadrži jednu okruglu sjemenku. Plod dozrijeva početkom jeseni (Domac, 2002; Grlić, 1990; <https://www.plantea.com.hr/svib/>).



Slika 4. *Cornus sanguinea* L. (izvor: luirig.altervista.org/)

1.1.4. *Cornus alba* L.

Hrvatski naziv ove vrste je bijeli drijen, bijeli svib (Nikolić, 2019) ili sibirski drijen.

Biljka je rasprostranjena na području srednje Europe, sjeverne Azije i Sjeverne Amerike (<https://www.plantea.com.hr/bijeli-svib/>). Raste kao ukrasna i samonikla biljka (Dujmović Purgar i sur., 2012).

Biljka je listopadni grm visine i širine do 3 m. Grane su uspravne i crvenkaste. Listovi su ovalni, na vrhu ušiljeni, na licu su zeleni, a na naličju sivobjelkasti. U jesen poprime tamnoljubičastu boju. Cvjetovi su dvospolni, mali i bijele ili blijedožute boje. Skupljeni su u štitaste cvatove. Cvate u kasno proljeće nakon listanja. Plod je bijela, okrugla koštunica. Dozrijeva u rujnu (<https://www.plantea.com.hr/bijeli-svib/>).



Slika 5. *Cornus alba* L. (izvor: luirig.altervista.org)

1.1.5. *Cornus hungarica* Kárpáti

Hrvatski naziv ove vrste je mađarski drijen (Nikolić, 2019).

Biljka se prema nekim autorima označava kao podvrsta vrste *Cornus sanguinea* L. (Trinajstić, 1990) te je rasprostranjena na području istočne Europe, Austrije i Njemačke (Nikolić, 2019).

Biljka ima pravilno raspoređene dvokrake dlake duge preko 1 mm, na pojedinim dijelovima lista su drugoga smjera te nisu izrazito prilježle (Trinajstić, 1990). Također, za razliku od vrste *C. sanguinea*, njezine mlade grančice su dlakave (Nikolić, 2019).

1.2. Kemizam, tradicionalna primjena i biološki učinci vrste *Cornus mas* L.

Konzumacija hrane bogate antioksidansima ima važnu ulogu u održavanju zdravlja i prevenciji bolesti.

Od vrsta roda *Cornus* koje možemo pronaći na području Republike Hrvatske jedino drijen (*C. mas*) ima važnost u ljudskoj prehrani. Plodovi i drugi biljni dijelovi ostalih vrsta nisu jestivi. Potencijalnu primjenu u prehrani mogla bi imati vrsta *C. sanguinea* jer usplode i sjemenke ove vrste imaju visoki sadržaj masnog ulja (Grlić, 1990).

Nastoji se ponovno popularizirati konzumacija drijena zbog njegove visoke prehrabene vrijednosti. Plodovi drijena bogati su taninima, šećerima, sluzima, organskim kiselinama, pektinom te askorbinskom kiselinom (Dujmović Purgar i sur., 2012), a sadrže i značajne količine antocijana, koji svojim antioksidativnim djelovanjem sudjeluju u prevenciji brojnih bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti (Tural i Koca, 2008), i iridoida, dok listovi sadrže veći udio fenolnih kiselina. Od fenolnih kiselina pronađene su benzojeva, cimetna, galna, elaginska, ferulinska, kavena, klorogenska, neoklorogenska, *p*-kumarinska, salicilna, siringinska, vanilinska i ružmarinska kiselina. Flavonoidi pronađeni u drijenu su pretežito glikozidi kvercetina i kempferola. Od antocijana sadrži glikozide pelargonidina, cijanidina i delfinidina. Pronađeni flavanoli su procijanidini, epikatehin i katehin te sadrži triterpenoid ursolnu kiselinu. Iridoidi sadržani u drijenu su loganinska kiselina, loganin, sverozid, kornuzid i katalpozid. Količina ovih bioaktivnih sastavnica ovisi o genotipu biljke, njezinom uzgoju, stanju biljke i zrelosti ploda (Bayram i Ozturkcan, 2020).

U narodnoj medicini drijen se koristi pri liječenju gastroenteralnih tegoba poput proljeva i hemoroida, kod groznice, bolesti jetre i bubrega te različitih upalnih bolesti (Dinda i sur., 2016; Işik i sur., 2014; Tural i Koca, 2008). Prema nekim zapisima korišten je i pri liječenju kolere (Demir i Kalyoncu, 2003) te malarije, upalnih bolesti crijeva, raka i toplinskog šoka (Bayram i Ozturkcan, 2020). Osim u svježem stanju plod drijena ili drenka se može konzumirati u obliku prerađevina poput pekmeza, marmelade, kompota, sirupa, voćnih sokova, rakija, vina ili brendija (Dujmović Purgar i sur., 2012). Proizvodnja vina od drijena nekada je bila popularna u Italiji i Francuskoj, dok su se na području nekadašnjeg Sovjetskog Saveza plodovi drijena koristili kao začim za jela od mesa i ribe te za pripremu kiselih juha. U južnoeuropskim zemljama, nezreli plodovi drijena se konzerviraju u slanoj vodi, aromatiziraju komoračem i konzumiraju kao masline, dok se u Njemačkoj ukuhavaju sa šećerom i octom te dodaju jelima od tijesta i krumpira. Osim plodova, drugi biljni dijelovi se mogu koristiti u prehrabene svrhe

pa se tako listovi mogu koristiti za pripremu čaja, a sjemenke mogu poslužiti kao zamjena za kavu (Grlić, 1990).

Različita istraživanja pokazala su da drijen posjeduje širok spektar djelovanja poput antioksidativnog, antidijabetičkog, protuupalnog, antibakterijskog, antikoagulacijskog i antiparazitskog te isto tako može utjecati na smanjenje razine lipida u krvi. Također, djeluje protektivno na jetru i bubrege te ostvaruje povoljne učinke na kardiovaskularni i živčani sustav (Bayram i Ozturkcan, 2020). Antioksidativno djelovanje pripisuje se polifenolnim spojevima, antocijanima i askorbinskoj kiselini koji povećavaju antioksidativni kapacitet i smanjuju lipidnu peroksidaciju i oksidativni stres (Dinda i sur., 2016; Tural i Koca, 2008). Antimikrobna aktivnost ekstrakata plodova i listova obično se procjenjuje metodom disk difuzije, čime je dokazano snažno antibakterijsko djelovanje protiv vrsta *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* i *Streptococcus pyogenes* (Turker i sur., 2012). Također je dokazana antimikrobna aktivnost prema vrstama *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* i *Candida albicans*, pri čemu su ekstrakti listova pokazali veću aktivnost u usporedbi s ekstraktima plodova (Milenković-Andjelković i sur., 2015). Pokazalo se da antocijani i ursolna kiselina izolirani iz plodova navedene vrste snižavaju jetrene trigliceride i ukupni kolesterol u plazmi te imaju pozitivan učinak na smanjenje tjelesne težine C57BL/6 miševa (Jayaprakasam i sur., 2006). Ekstrakt plodova dovodi do smanjenja tjelesne težine i indeksa tjelesne mase te povećava razinu HDL-a i ApoA1 lipoproteina kod žena u postmenopauzi što ima pozitivan učinak protiv razvoja ateroskleroze i hipertenzije (Gholamrezayi i sur., 2019). Protuupalna aktivnost ekstrakta plodova vrste *C. mas* očitovala se smanjenjem razine proupalnih citokina faktora nekroze tumora- α (TNF- α), interleukina-1 β (IL-1 β), IL-13, kao i povećanjem protuupalnog citokina IL-10 u uvjetima *in vivo* (Moldovan i sur., 2016). Zaštitna aktivnost ekstrakta plodova na jetru očitovala se kod muških štakora značajnim smanjenjem tetraklorugljikom-izazvanih povišenih razina enzima aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP) i povećanjem razine ukupnih proteina i albumina u serumu (Alavian i sur., 2014). Moždano tkivo osjetljivo je na oksidativni stres, stoga slobodni radikali mogu dovesti do raznih neuroloških poremećaja, a dodatak plodova drijena u prehranu Wistar štakora povećao je aktivnost katalaze u moždanom tkivu te paraoksonaze u moždanom tkivu i plazmi, dok je razina proteinskih karbonila i tiolnih skupina bila smanjena, čime je ostvarena neuroprotektivna aktivnost (Francik i sur., 2014).

Navedeni učinci su djelomično potvrđeni u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima. Međutim, klinička istraživanja su prilično rijetka, stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se procijenili biološki učinci drijena. Istraživanja toksičnosti pokazala su da je konzumacija drijena sigurna i nema nuspojava, ali potrebna su dugotrajna istraživanja toksičnosti kako bi se mogla razmotriti njegova upotreba u liječenju (Bayram i Ozturkcan, 2020).

1.3. Kemizam, tradicionalna primjena i biološki učinci vrste *C. officinalis* Siebold & Zucc.

Iz vrste *Cornus officinalis* izolirano je i identificirano oko 300 kemijskih spojeva kao što su alkaloidi, iridoidi, flavoni, polisaharidi, organske kiseline, terpenoidi i eterična ulja. Među tim komponentama ističu se iridoidi kao primarni bioaktivni spojevi.

Vrsta *C. officinalis* tradicionalno se koristi za liječenje bolesti jetre i bubrega, a također posjeduje kardioprotektivno, protuupalno, neuroprotektivno, antioksidativno i antibakterijsko djelovanje (Huang i sur., 2018). U tradicionalnoj kineskoj medicini koristi se kao tonik, analgetik i diuretik (Tural i Koca, 2008) te se u nekim azijskim zemljama poput Kine i Irana koristi kao glavni sastojak biljnih pripravaka za liječenje dijabetesa (Jayaprakasam i sur., 2005).

Istraživanja su pokazala da etanolni ekstrakt vrste *C. officinalis* povećava ekspresiju GLUT4 mRNA i proteina, lučenje inzulina te ubrzava metabolizam glukoze u dijabetičkih štakora što posljedično dovodi do smanjenja razine glukoze u krvi. Pokazalo se i da potiče neurogenezu i angiogenezu u mozgu štakora te da poboljšava neurološke funkcije. Također, neuroprotektivno djelovanje sastavnica kineskog drijena očituje se i smanjenjem oksidativnog stresa. Ekstrakt kineskog drijena pokazao je antioksidativno djelovanje kod dijabetičkih miševa zahvaljujući sposobnosti regulacije aktivnosti enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), ksantin oksidaza (XO), katalaza (CAT), glutation S-transferaza (GST) i endotelna sintaza dušikovog oksida (eNOS). Također, pokazalo se da regulira razinu kolesterola, krvni tlak, ekspresiju proteina te inhibira diferencijaciju osteoklasta u životinjskim modelima što može pozitivno utjecati na liječenje ili prevenciju kardiovaskularnih bolesti i osteoporoze. Istraživanja su pokazala da ekstrakt kineskog drijena i njegove sastavnice imaju negativan učinak na proliferaciju stanica, a posljedično i na daljnji razvoj hepatocelularnog karcinoma i osteosarkoma (Huang i sur., 2018).

1.4. Slobodni radikali i antioksidansi

Slobodni radikal je svaki kemijski spoj koji ima jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Zbog nesporenog elektrona radikali posjeduju vrlo veliku kemijsku reaktivnost. U organizmu dolazi do brze reakcije slobodnih radikala s makromolekulama poput proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinskih kiselina, što rezultira njihovim oštećenjem (Beckman i Ames, 1998; Cheeseman, 1993). Tri su mehanizma oštećenja: pojedinačno oštećenje, lančana reakcija i mehanizam grananja. Pojedinačna oštećenja ne dovode do velike štete, dok lančane reakcije i reakcije koje se granaju imaju veći potencijal izazivanja težih oštećenja. Lančanom reakcijom slobodni radikal reagirajući s makromolekulom dovodi do stvaranja novog radikala, a reakcija se zaustavlja tek kada radikal reagira s drugim radikalom ili ionom prijelaznog metala (Rice-Evans i Burdon, 1994). Kontinuirano se proizvode u stanicama kao slučajni nusprodukti metabolizma ili namjerno, primjerice, tijekom fagocitoze. Najvažniji reaktanti u biokemiji slobodnih radikala u aerobnim stanicama su kisik i njegovi radikalni derivati (superoksidni i hidroksilni radikal), vodikov peroksid i prijelazni metali (Cheeseman, 1993).

Antioksidansi su spojevi koji štite stanice od djelovanja slobodnih radikala odnosno usporavaju i sprječavaju oksidaciju drugih molekula. U oksidacijskim reakcijama mogu nastati slobodni radikali koji tada započinju lančanu reakciju u stanici i tako uzrokuju oštećenje ili smrt stanice (Rice-Evans i Burdon, 1994). Antioksidansi sprječavaju te lančane reakcije uklanjanjem intermedijera slobodnih radikala i usporavaju druge oksidacijske procese. Zaslužni su za obranu organizma od patogenih bolesti uzrokovanih štetnim učincima reaktivnih dušikovih i kisikovih spojeva. Reakcije oksidacije slobodnim radikalom odvijaju se u tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija započinje djelovanjem svjetla, topline ili ionizirajućeg zračenja pri čemu dolazi do stvaranja reaktivnog alilnog radikala koji u reakciji s kisikom daje lipidni peroksilni radikal. U propagaciji peroksilni radikali započinju lančanu reakciju gdje mogu dalje oksidirati lipide stvarajući lipidne hidroperokside koji se dalje razgrađuju na druge spojeve. Terminacijom završava lančana reakcija jer reakcijom dvaju radikala nastaje neradikalni spoj (Antolovich i sur., 2002).

1.5. Polifenoli i flavonoidi

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji sudjeluju u obrani biljaka od ultraljubičastog zračenja ili patogena. U svojoj strukturi sadrže fenolne skupine koje mogu prihvatiti elektron i formirati relativno stabilne radikale čime se prekidaju lančane oksidacijske reakcije u stanicama. Time polifenoli štite stanice od oksidativnih oštećenja i smanjuju rizik razvoja raznih degenerativnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Pružaju značajnu zaštitu od razvoja i napredovanja mnogih kroničnih patoloških stanja uključujući rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, starenje, osteoporoza i neurodegenerativne bolesti. Dijele se u 4 glavne skupine: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i tanine (Pandey i Rizvi, 2009).

Flavonoidi su biljni metaboliti iz skupine polifenola, a ujedno su najzastupljeniji od svih polifenola. Imaju nisku molekularnu masu i građeni su od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u tri prstena koji čine njihovu osnovnu strukturu flavansku jezgru (Ozcan i sur., 2014). Flavonoidi se međusobno razlikuju po broju i rasporedu hidroksilnih grupa te opsegu alkilacije i glikozilacije monosaharidima ili oligosaharidima, a dijele se u 6 glavnih skupina: flavonole, flavone, flavanone, flavanole, antocijane i izoflavone (Pandey i Rizvi, 2009).

Posjeduju ih brojne biljke, a mogu se nalaziti u plodovima, sjemenkama, cvjetovima i listovima. U biljkama imaju ulogu zaštite od UV-zračenja, patogena i biljojeda te djeluju antioksidativno, antimikrobno i antifungalno (Cherrak i sur., 2016).

Biljne droge s flavonoidima imaju širok spektar farmakoloških učinaka uključujući antiviralni, antioksidativni, antiproliferativni i protuupalni (López-Posadas i sur., 2008). Najvažnijim učinkom flavonoida se smatra njihova antioksidativna aktivnost koju posjeduju zahvaljujući hidroksilnim skupinama koje mogu biti lako oksidirane (Cherrak i sur., 2016). Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi reduciranjem nesparenih elektrona slobodnih radikala, kelatnim vezanjem iona prijelaznih metala (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), aktiviranjem antioksidacijskih enzima ili inhibiranjem oksidaza (Heim i sur., 2002). Najvažniji način djelovanja je hvatanje slobodnih radikala jer time prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala. Slobodni radikali su veoma reaktivni i štetni jer izazivaju lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina (enzima), ugljikohidrata i DNA, a što za posljedicu ima promjenu njihove strukture i funkcije. Smatra se da su starenje i pojedine degenerativne bolesti poput bolesti srca, katarakte, kognitivne disfunkcije i raka uzročno-posljedično povezani s takvim oksidativnim oštećenjima (Pietta, 2000).

1.6. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija koristi ultrazvučne valove za ekstrakciju spojeva iz biljnog materijala. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom (20 – 100 kHz) jedna je od tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost, jednostavnije rukovanje i korištenje manjih količina otapala te se može provoditi na nižim temperaturama. Nudi bolji prinos željenih komponenti, povećanu stopu ekstrakcije te smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kod primjene ultrazvuka visoke snage, uslijed djelovanja akustičnih kavitacija ultrazvučnih valova na stanični materijal, dolazi do narušavanja strukture staničnih stijenki te do bubrenja stanica što povećava prodiranje otapala u biljne stanice i olakšava otpuštanje spojeva koji su prisutni u stanici (Muñiz-Márquez i sur., 2013). Uslijed pucanja staničnih stijenki dolazi do izravnog kontakta sa sadržajem stanice. Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njezina učinkovitost. Korištenje ultrazvuka prilikom ekstrakcije povećava se bioraspoloživost mikronutrijenata zadržavajući pritom njihova izvorna svojstva (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

1.7. Liofilizacija

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem je metoda uklanjanja vode sublimacijom kristala leda iz zamrznutog materijala. Odabirom prikladnih parametara ovog procesa omogućuje se dobivanje uzoraka bolje kvalitete u usporedbi s uzorcima sušenima tradicionalnim metodama. Proces je primjenjiv u proizvodnji određenih farmaceutskih i bioloških proizvoda koji su termolabilni ili na drugi način nestabilni u vodenim otopinama tijekom duljeg razdoblja skladištenja, ali koji su stabilni u suhom stanju.

Liofilizacija je proces u kojem se voda u uzorku zamrzava, nakon čega slijedi njezino uklanjanje, prvo sublimacijom (primarno sušenje), a potom desorpcijom (sekundarno sušenje). Sublimacija uključuje izravan prijelaz iz krutog u plinovito stanje bez prolaska kroz tekuću fazu. Da bi se to postiglo, smrznuti uzorak se suši pod vakuumom, bez odmrzavanja. Sublimacija slobodne vode se treba odvijati pri tlaku i temperaturi ispod trojne točke odnosno pri 4,579 mm Hg i 0,0099 °C. Ispod vrijednosti trojne točke postoje samo kruto i plinovito stanje. Nakon što je primarno sušenje završeno, vezana vlaga je još uvijek prisutna u uzorku te može iznositi čak 7 – 8 % stoga je potrebno nastaviti sušenje na višoj temperaturi (sekundarno sušenje) kako bi se smanjio sadržaj zaostale vlage. Ovaj se proces naziva „izotermna desorpcija” jer se vezana voda desorbira. Za razliku od uvjeta obrade potrebnih za primarno sušenje koji koriste nisku temperaturu i umjereni vakuum, desorpcijsko sušenje je olakšano podizanjem temperature i smanjenjem tlaka u komori na minimum.

Svi liofilizirani uzorci imaju malu količinu zaostale vlage koja ovisi o prirodi proizvoda i duljini sekundarnog sušenja te iznosi od <1 % do 3 % za većinu materijala. Materijali osušeni zamrzavanjem su higroskopni pa ambalaža koja se koristi za liofilizirane uzorke mora biti nepropusna za atmosfersku vlagu i kisik kako bi se smanjio rizik od razgradnje. Štetni učinci kisika i vlage ovise o temperaturi. Što je viša temperatura skladištenja, proizvod se brže razgrađuje.

Sušenje zamrzavanjem naširoko se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji za poboljšanje stabilnosti i dugoročno skladištenje nestabilnih materijala. Ima veliku važnost u području farmaceutske tehnologije dopuštajući sušenje toplinski osjetljivih lijekova na niskim temperaturama (Gaidhani i sur., 2015). Također, ima važnu ulogu u pripremi biljnih ekstrakata jer omogućava očuvanje hlapljivih sastavnica biljnog materijala, a da pritom ne oštećuje izgled, okus, boju i teksturu. Liofilizirani proizvodi su niže kvalitete od izvornog biljnog materijala, ali više kvalitete u usporedbi s konvencionalno osušanim proizvodima (Hazarika i Gosztola, 2020).



Slika 6. Liofilizator Alpha 1-2 LDplus

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vrste roda *Cornus* bogat su izvor polifenolnih spojeva kojima pripadaju i flavonoidi. Imaju antioksidativno djelovanje koje je odgovorno za prevenciju različitih bolesti. Vrsta *Cornus mas* tradicionalno se koristi u liječenju gastroenteralnih tegoba poput proljeva i hemoroida, kod groznice, bolesti jetre i bubrega te različitih upalnih bolesti odnosno posjeduje širok spektar djelovanja poput antioksidativnog, antidijabetičkog, protuupalnog, antibakterijskog, antikoagulacijskog, antiparazitskog te hipolipemičkog. Također, djeluje protektivno na jetru i bubrege te ostvaruje povoljne učinke na kardiovaskularni i živčani sustav. Vrsta *Cornus officinalis* tradicionalno se koristi za liječenje dijabetesa te bolesti jetre i bubrega, a također posjeduje kardioprotektivno, protuupalno, neuroprotektivno, antioksidativno i antibakterijsko djelovanje.

Cilj ovog rada bila je usporedba sadržaja ukupnih fenola i flavonoida metanolnih ekstrakata vrsta *C. mas* i *C. officinalis* čiji su uzorci bili sakupljeni na području Sjeverne Hrvatske te njihovog antioksidativnog (antiradikalnog) učinka *in vitro* koristeći ABTS i DPPH test.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu istražene su sljedeće biljne vrste: crveni drijen (*Cornus mas* L.) i kineski drijen (*Cornus officinalis* Siebold & Zucc.). Biljni materijal je sakupljen sa različitih lokacija u Sjevernoj Hrvatskoj u vrijeme dozrijevanja plodova, a činili su ga listovi i plodovi koji su osušeni na sobnoj temperaturi, zaštićeni od izravne svjetlosti. Plodovima je odstranjena sjemenka te su u daljnjem istraživanju korištena usplođa plodova i listovi.

Tablica 1. Lokacije i datumi prikupljanja uzoraka

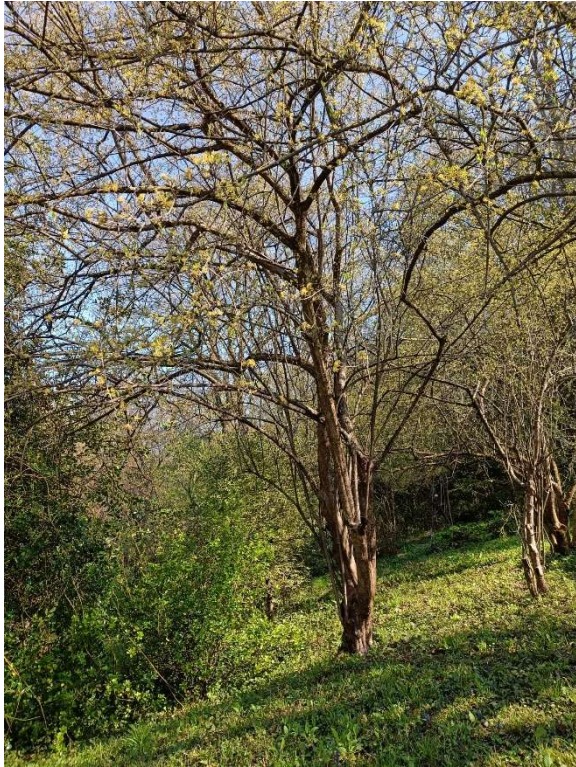
| Vrsta (kratica) | Lokacija | Datum prikupljanja |
|---|---|--------------------|
| <i>Cornus mas</i> L. (<i>C. mas1</i>) | Vugrovec | 21. 7. 2021. |
| <i>Cornus mas</i> L. (<i>C. mas2</i>) | Donja Pačetina | 9. 8. 2021. |
| <i>Cornus mas</i> L. (<i>C. mas3</i>) | Farmaceutski botanički vrt „Fran Kušan“ | 16. 8. 2021. |
| <i>Cornus mas</i> L. (<i>C. mas4</i>) | Farmaceutski botanički vrt „Fran Kušan“ | 16. 8. 2021. |
| <i>Cornus mas</i> L. (<i>C. mas5</i>) | Bjelovar | 9. 9. 2021. |
| <i>Cornus mas</i> L. (<i>C. mas6</i>) | Farmaceutski botanički vrt „Fran Kušan“ | 13. 9. 2021. |
| <i>Cornus officinalis</i> Siebold & Zucc. (<i>C. officinalis</i>) | Farmaceutski botanički vrt „Fran Kušan“ | 13. 9. 2021. |



Slika 7. *C. mas1* (plodovi)



Slika 8. *C. mas2* (listovi)



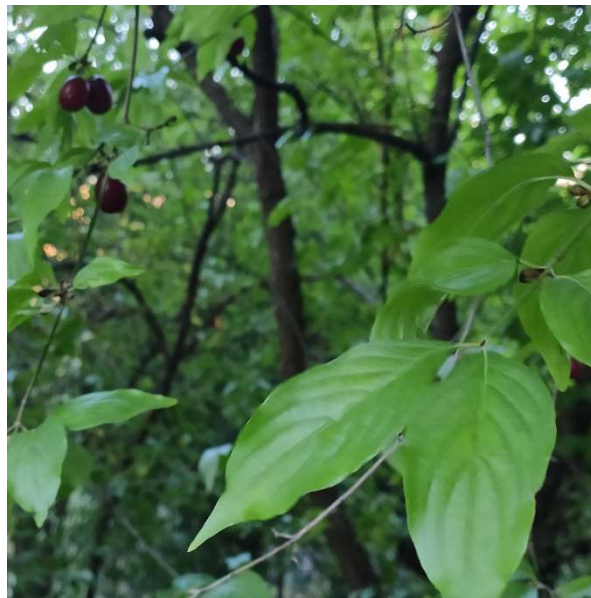
Slika 9. *C. mas3* (habitus)



Slika 10. *C. mas4* (plodovi i listovi)



Slika 11. *C. mas5* (cvat)



Slika 12. *C. mas6* (plodovi i listovi)



Slika 13. *C. officinalis* (cvat)

3.1.2. Kemikalije

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije:

1. Metanol p.a. (Lach-Ner, Češka)
2. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska)
3. Natrijev karbonat dekahidrat p.a. (Kemika, Hrvatska)
4. Galna kiselina 98 % (Acros Organics, Belgija)
5. Aluminijski klorid heksahidrat p.a. (Gram-Mol, Hrvatska)
6. Kvercetin (Sigma-Aldrich, Njemačka)
7. Trolox (Acros Organics, Belgija)
8. 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
9. Kalijev peroksodisulfat p.a. (Kemika, Hrvatska)
10. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji:

1. Električni mlinac (Tzs First, Austrija)
2. Precizna vaga PB303 DeltaRange (Mettler Toledo, SAD)
3. Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex (Bandelin electronic, Njemačka)
4. Vakuumski uparivač Laborota 4000 efficient (Heidolph, Njemačka)
5. Liofilizator Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
6. Magnetska miješalica s grijanjem (Witeg Labortechnik GmbH & CO., Njemačka)
7. Vorteks miješalica Heidolph Reax Top (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Njemačka)
8. UV-VIS spektrofotometar T70 (PG Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo)
9. Analitička vaga Mettler H51AR (Mettler Toledo, SAD)

3.2. Metode ispitivanja

3.2.1. Priprema biljnog materijala

Osušeni listovi i usplođa odvojeni su od ostalih biljnih dijelova (stabljika i sjemenki) i očišćeni od onečišćenja. Stabljike i sjemenke su odvojene u papirnate vrećice, označene i spremljene, a uzorci listova i plodova (usplođa) su samljeveni do praškaste konzistencije koristeći električni mlinac.

3.2.2. Priprema ekstrakata

U staklene čaše izvagan je po 1,0 g svakog uzorka te je u svaku dodano 20 mL metanola. Staklene čaše su zatvorene parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje metanola te su postavljene u ultrazvučnu kupelj. Provedene su dvije uzastopne ekstrakcije s 20 mL metanola u trajanju od 30 min na 30 °C.



Slika 14. Ultrazvučna ekstrakcija uzoraka drijena

Ekstrakti su filtrirani dva puta kroz filter papir i tanki sloj vate. Filtrati su prebačeni u tikvice s okruglim dnom te su podvrgnuti uparavanju metanola koristeći vakuumske uparivače. Upareni ekstrakti su resuspendirani u 10 mL (5 * 2 mL) destilirane vode i prebačeni u Petrijevke koje su potom zatvorene parafilmom.



Slika 15. Vakuumsko uparavanje ekstrakta listova vrste *Cornus mas*



Slika 16. Vakuumsko uparavanje ekstrakta plodova vrste *Cornus mas*

Uzorci su zamrznuti na temperaturu od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i liofilizirani. Liofilizacija je trajala 44 sata nakon čega su uzorci prebačeni u staklene bočice koje su potom obložene parafilmom kako bi se spriječilo prodiranje vlage. Liofilizirani ekstrakti su čuvani u zamrzivaču do daljnje upotrebe.



Slika 17. Liofilizirani ekstrakt listova vrste *Cornus mas*



Slika 18. Liofilizirani ekstrakt plodova vrste *Cornus mas*

Uzorci su neposredno prije mjerenja odvagani (0,05 g) u Eppendorf plastičnim epruvetama i dodan im je 1 mL destilirane vode. Odvage su prikazane u Tablici 2. Sadržaj je promiješan pomoću vorteks mješalice te je kvantitativno prenesen automatskom pipetom u odmjerne tikvice od 10 mL dok su plastične epruvete nekoliko puta isprane destiliranom vodom. Tikvice su nadopunjene destiliranom vodom do oznake te je sadržaj prebačen u Falcon plastične epruvete od 15 mL.

Tablica 2. Odvage liofiliziranih uzoraka plodova i listova

| Uzorak plodova | Masa/g | Uzorak listova | Masa/g |
|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| <i>C. mas1</i> | 0,050 | <i>C. mas1</i> | 0,052 |
| <i>C. mas2</i> | 0,051 | <i>C. mas2</i> | 0,050 |
| <i>C. mas3</i> | 0,052 | <i>C. mas3</i> | 0,051 |
| <i>C. mas4</i> | 0,050 | <i>C. mas4</i> | 0,050 |
| <i>C. mas5</i> | 0,050 | <i>C. mas5</i> | 0,051 |
| <i>C. mas6</i> | 0,050 | <i>C. mas6</i> | 0,050 |
| <i>C. officinalis</i> | 0,052 | <i>C. officinalis</i> | 0,050 |

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola korištena je spektrofotometrijska metoda temeljena na primjeni Folin-Ciocalteu reagensa i galne kiseline kao standarda (Singleton i Rossi, 1965).

Pripremljeno je deseterostruko razrijeđenje Folin-Ciocalteu reagensa u odmjerne tikvici od 100 mL pri čemu je 10 mL reagensa razrijeđeno destiliranom vodom do oznake.

Natrijev karbonat dekahidrat (7,502 g) pripremljen je otapanjem u destiliranoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL koja je nadopunjena do oznake.

Pripremljena je metanolna otopina standarda galne kiseline, $c_0 = 1 \text{ mg/mL}$. Odvagano je 0,020 g galne kiseline u Eppendorf plastičnu epruvetu te je dodan 1 mL metanola. Otopina je prenesena u odmjernu tikvicu od 20 mL, a plastična epruveta je nekoliko puta isprana metanolom. Odmjerna tikvica je nadopunjena metanolom do oznake. Iz pripremljene otopine standarda galne kiseline ($c_0 = 1 \text{ mg/mL}$) pripremljena su razrjeđenja u 8 staklenih epruveta. Redom su otpipetirani odgovarajući volumeni otopine galne kiseline, a potom odmjereni odgovarajući volumeni metanola do ukupnog volumena od 1000 μL kako bi se dobile otopine sljedećih koncentracija:

30 $\mu\text{L/mL}$ (30 μL otopine standarda + 970 μL metanola)

40 $\mu\text{L/mL}$ (40 μL otopine standarda + 960 μL metanola)

50 $\mu\text{L/mL}$ (50 μL otopine standarda + 950 μL metanola)

60 $\mu\text{L/mL}$ (60 μL otopine standarda + 940 μL metanola)

70 $\mu\text{L/mL}$ (70 μL otopine standarda + 930 μL metanola)

80 $\mu\text{L/mL}$ (80 μL otopine standarda + 920 μL metanola)

90 $\mu\text{L/mL}$ (90 μL otopine standarda + 910 μL metanola)

100 $\mu\text{L/mL}$ (100 μL otopine standarda + 900 μL metanola)

Za svako pripremljeno razrjeđenje otpipetirano je 250 μL otopine standarda u čistu epruvetu. Zatim je redom dodavano u svaku epruvetu 2 puta po 625 μL Folin-Ciocalteu reagensa, a nakon 5 minuta 1 mL otopine $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$. Baždarni pravac je rađen u duplikatu uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Nakon 60 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbancija je mjerena na 765 nm.

Ranije pripremljeni uzorci listova razrijeđeni su 20 puta na način da je u 7 staklenih epruveta otpipetirano 50 μL ekstrakta listova i 950 μL metanola. Iz dobivenih 1000 μL tri puta je otpipetirano po 250 μL u tri različite epruvete za svaki uzorak. Uzorci plodova bili su direktno pipetirani (250 μL) u epruvete bez prethodnog razrjeđivanja. U uzorke je redom dodavan Folin-Ciocalteu reagens u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 5 minuta inkubacije u epruvete je redom dodavana otopina natrijevog karbonata dekahidrata, također u razmacima od 1 minute između epruveta. Uzorci su zatim inkubirani 60 minuta. Apsorbancije su mjerene spektrofotometrijski pri 765 nm. Sva mjerenja su provedena u triplikatu uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta (mg EGK/g SE).

3.2.4. Određivanje flavonoida

Za određivanje flavonoida korištena je spektrofotometrijska metoda s aluminijevim kloridom (Arvouet-Grand i sur., 1994).

Otopina aluminijevog klorida heksahidrata pripremljena je otapanjem 2,007 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ u 20 mL metanola u čaši uz lagano zagrijavanje i miješanje magnetskim mješačem. Nakon što se $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ otopio, otopina je kvantitativno prenesena (filtrirana) u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena metanolom do oznake ($c = 2 \text{ g}/100 \text{ mL}$).

Otopina standarda kvercetina ($c_0 = 1000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$) pripremljena je otapanjem 20 mg kvercetina u čaši u nekoliko mL metanola uz zagrijavanje i miješanje. Otopina je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopunjena metanolom do oznake te je potom razrijeđena 10 puta. Iz pripremljene otopine standarda kvercetina ($c_0 = 100 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$) izrađena su razrjeđenja u 6 staklenih epruveta. Redom su otpipetirani odgovarajući volumeni otopine kvercetina te potom metanola do ukupnog volumena od 1000 μL kako bi se dobile otopine sljedećih koncentracija:

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50 μL otopine standarda + 950 μL metanola)

15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (150 μL otopine standarda + 850 μL metanola)

20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (200 μL otopine standarda + 800 μL metanola)

25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250 μL otopine standarda + 750 μL metanola)

30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (300 μL otopine standarda + 700 μL metanola)

35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (350 μL otopine standarda + 650 μL metanola)

U epruvete koje su sadržavale 1 mL standarda je potom dodavana otopina aluminijevog klorida heksahidrata (1 mL) u razmacima od 1 minute između epruveta. Potom su reakcijske smjese inkubirane 15 minuta. Baždarni pravac je rađen u duplikatu uz slijepu probe koje su sadržavale 1 mL standarda kvercetina odgovarajuće koncentracije i 1 mL metanola. Apsorbancija je mjerena na 415 nm.

Ranije pripremljene otopine ekstrakata listova su direktno pipetirane u epruvete bez prethodnog razrjeđivanja, dok je otopine ekstrakata plodova bilo potrebno ponovno pripremiti u većoj koncentraciji. Liofilizirani uzorci plodova su ponovno izvagani i otopljeni u 1 mL destilirane vode u Eppendorf plastičnim epruvetama. Nove odvage su prikazane u Tablici 3. Otopine su kvantitativno prenesene u odmjerne tikvice od 5 mL i nadopunjene destiliranom vodom do oznake.

Tablica 3. Odvage uzoraka plodova za određivanje sadržaja flavonoida

| Uzorak plodova | Masa/g |
|-----------------------|---------------|
| <i>C. mas1</i> | 0,149 |
| <i>C. mas2</i> | 0,100 |
| <i>C. mas3</i> | 0,100 |
| <i>C. mas4</i> | 0,104 |
| <i>C. mas5</i> | 0,100 |
| <i>C. mas6</i> | 0,100 |
| <i>C. officinalis</i> | 0,102 |

U 1 mL nerazrijeđenih uzoraka je redom dodavan 1 mL otopine aluminijevog klorida heksahidrata ($c = 2 \text{ g}/100 \text{ mL}$) u razmacima od 1 minute između epruveta. Inkubacija je trajala 15 minuta. Sva mjerenja su rađena u triplikatu uz slijepe probe koje su sadržavale 1 mL uzorka i 1 mL metanola. Apsorbancije su mjerene spektrofotometrijski pri 415 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta (mg EK/g SE).

3.2.5. Određivanje antioksidativnog učinka *in vitro* ABTS testom

Antioksidativni učinak je određen pomoću ABTS testa (Re i sur., 1999) modificiranog na način koji opisuju Friščić i sur. (2018).

Pripremljeno je 5 mL otopine koja je sadržavala kalijev peroksidisulfat koncentracije 2,62 mM i 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsku kiselinu) diamonijevu sol (ABTS) koncentracije 7,00 mM. Za vaganje kalijevog peroksidisulfata (0,00354 g) i ABTS-a (0,01920 g) korištena je analitička vaga. Supstance su postepeno otapane (u obrocima od 5 * 200 µL) u destiliranoj vodi u Eppendorf plastičnim epruvetama uz vorteksiranje. Pripremljene otopine prenesene su u istu odmjernu tikvicu od 5 mL koja je potom nadopunjena destiliranom vodom do oznake i zatvorena parafilmom. Tikvica je ostavljena na sobnoj temperaturi, zaštićena od svjetlosti, u razdoblju od 20 sati.

Pripremljeno je 10 mL metanolne otopine Troloxa ($c_0 = 2000 \mu\text{g/mL}$). Zatim su pripremljena razrjeđenja ove otopine u dolje navedenim koncentracijama:

- 100 µg/mL (50 µL otopine Troloxa + 950 µL metanola)
- 300 µg/mL (150 µL otopine Troloxa + 850 µL metanola)
- 500 µg/mL (250 µL otopine Troloxa + 750 µL metanola)
- 700 µg/mL (350 µL otopine Troloxa + 650 µL metanola)
- 900 µg/mL (450 µL otopine Troloxa + 550 µL metanola)
- 1100 µg/mL (550 µL otopine Troloxa + 450 µL metanola)

Otpipetirano je 2 mL otopine ABTS radikal kationa u čašu, koji je postupno razrijeđen destiliranom vodom do postizanja apsorbancije u iznosu od 0,6934 (A_0). U 2 mL razrijeđenog ABTS radikal kationa dodano je 10 µL standarda Troloxa. Sva mjerenja su rađena u duplikatu uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Nakon 1 minute inkubacije spektrofotometrijski su mjerene apsorbancije pri 734 nm.

Pripremljen je koncentracijski niz dvostrukih serijskih razrjeđenja svih otopina ekstrakata listova, dok je otopine ekstrakata plodova bilo potrebno ponovno pripremiti. Liofilizirani uzorci plodova ponovno su izvagani i otopljeni u 0,5 mL destilirane vode te je potom pripremljen koncentracijski niz dvostrukih serijskih razrjeđenja. Nove odvage su prikazane u Tablici 4.

Tablica 4. Odvage uzoraka plodova za određivanje antioksidativnog učinka

| Uzorak plodova | Masa/g |
|-----------------------|---------------|
| <i>C. mas1</i> | 0,046 |
| <i>C. mas2</i> | 0,041 |
| <i>C. mas3</i> | 0,041 |
| <i>C. mas4</i> | 0,040 |
| <i>C. mas5</i> | 0,040 |
| <i>C. mas6</i> | 0,040 |
| <i>C. officinalis</i> | 0,040 |

Za ekstrakte plodova pripremljen je novi reagens koji je sadržavao kalijev peroksodisulfat koncentracije 2,45 mM i 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonsku kiselinu) diamonijevu sol (ABTS) koncentracije 7,13 mM. Nakon 20 sati inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi otopina nastalog ABTS radikal kationa je postupno razrijeđena destiliranom vodom do postizanja apsorbancije u iznosu od 0,6988 (A_0). U 2 mL razrijeđenog ABTS radikal kationa dodano je 10 μ L uzorka (ekstrakta listova ili plodova) direktno u kivetu. Nakon 1 minute inkubacije mjerena je apsorbancija na 734 nm. Sva mjerenja su rađena jednom za svako razrjeđenje pri čemu je kao slijepa proba korištena destilirana voda.

Antiradikalna aktivnost je prikazana kao IC_{50} vrijednost, koncentracija uzorka koja uzrokuje 50 %-tno smanjenje apsorbancije ABTS radikal kationa.

3.2.6. Određivanje antioksidativnog učinka *in vitro* DPPH testom

Antioksidativni učinak je određen pomoću DPPH testa (Molyneux, 2004) modificiranog na način koji opisuju Friščić i sur. (2018).

Pripremljena je metanolna otopina 2,2–difetil-1-pikrilhidrazila (DPPH) do postizanja apsorbancije u iznosu od 0,7010 (A_0). DPPH radikal je postepeno otapan u metanolu uz vorteksiranje.

Pripremljeno je 10 mL metanolne otopine Troloxa ($c_0 = 2000 \mu\text{g/mL}$). Zatim su pripremljena razrjeđenja ove otopine u dolje navedenim koncentracijama:

- 100 $\mu\text{g/mL}$ (50 μL otopine Troloxa + 950 μL metanola)
- 300 $\mu\text{g/mL}$ (150 μL otopine Troloxa + 850 μL metanola)
- 500 $\mu\text{g/mL}$ (250 μL otopine Troloxa + 750 μL metanola)
- 700 $\mu\text{g/mL}$ (350 μL otopine Troloxa + 650 μL metanola)
- 1300 $\mu\text{g/mL}$ (650 μL otopine Troloxa + 350 μL metanola)

U 2 mL razrijeđenog DPPH radikala dodavano je 10 μL standarda Troloxa u razmacima od 1 minute između razrjeđenja nakon čega je slijedilo 30 minuta inkubacije. Pokus je rađen u duplikatu uz slijepu probu koja je sadržavala metanol. Apsorbancija je mjerena pri 517 nm.

Pripremljen je koncentracijski niz dvostrukih serijskih razrjeđenja svih ekstrakata pri čemu su korišteni isti uzorci koji su bili pripremljeni za ABTS test. U 2 mL razrijeđenog DPPH radikala dodano je po 10 μL uzorka. Uzorci su dodavani u otopinu DPPH u razmacima od 1 minute između epruveta uz inkubaciju u trajanju od 30 minuta. Apsorbancija je mjerena pri 517 nm.

Antiradikalna aktivnost je prikazana kao IC_{50} vrijednost, koncentracija uzorka koja uzrokuje 50 %-tno smanjenje apsorbancije DPPH radikal kationa.

3.3. Statistička obrada podataka

Mjerenja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida provedena su u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Rezultati određivanja antiradikalne aktivnosti izraženi su kao vrijednosti koncentracija ekstrakata koje smanjuju apsorbciju ABTS ili DPPH radikala za 50 % (IC_{50}), a koje su procijenjene pomoću linearne regresije metodom najmanjih kvadarata koristeći dvostruka serijska razrjeđenja uzoraka. Statistički značajne razlike između različitih uzoraka listova i plodova procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA), nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test. Povezanost između različitih parametara procijenjena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (r). Razina značajnosti u svim testovima bila je $\alpha = 0,05$. Obrada podataka provedena je pomoću programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software) i Microsoft Excel (2013).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje ukupnih fenola

4.1.1. Baždarni pravac galne kiseline

Kao standard za određivanje ukupnih fenola korištena je galna kiselina. Da bi se dobio baždarni pravac, izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija galne kiseline.

Prema Beer-Lambertovom zakonu apsorbancija je proporcionalna koncentraciji:

$$A = \varepsilon * c * l$$

ε – molarni apsorpcijski koeficijent

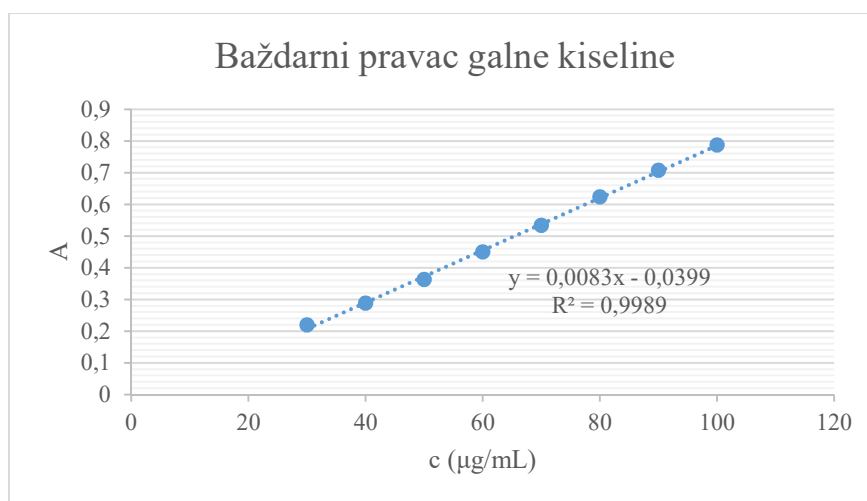
c – koncentracija tvari u uzorku

l – širina kivete kojom prolazi svjetlost

Tablica 5. Koncentracije standarda galne kiseline i izmjerene apsorbancije

| Koncentracija galne kiseline ($\mu\text{g/mL}$) | Apsorbancija* |
|--|---------------|
| 30 | 0,22010 |
| 40 | 0,28825 |
| 50 | 0,36355 |
| 60 | 0,45035 |
| 70 | 0,53405 |
| 80 | 0,62380 |
| 90 | 0,70820 |
| 100 | 0,78800 |

* prosjek dvaju mjerenja



Slika 19. Baždarni pravac galne kiseline

4.1.2. Sadržaj ukupnih fenola

Sva mjerenja provedena su u triplikatu. Uzorcima je izmjerena apsorbancija te je iz baždarnog pravca galne kiseline očitana odgovarajuća koncentracija.

Tablica 6. Izmjerene apsorbancije i koncentracije u analiziranim ekstraktima plodova dobivene interpolacijom iz baždarnog pravca galne kiseline

| Plodovi | A1 | A2 | A3 | c1 ($\mu\text{g/mL}$) | c2 ($\mu\text{g/mL}$) | c3 ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|--------|--------|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 0,4316 | 0,4525 | 0,4368 | 56,81 | 59,33 | 57,43 |
| <i>C. mas2</i> | 0,4670 | 0,4708 | 0,4559 | 61,07 | 61,53 | 59,73 |
| <i>C. mas3</i> | 0,4339 | 0,4129 | 0,4141 | 57,08 | 54,55 | 54,70 |
| <i>C. mas4</i> | 0,4424 | 0,4347 | 0,4292 | 58,11 | 57,18 | 56,52 |
| <i>C. mas5</i> | 0,6465 | 0,6420 | 0,6625 | 82,70 | 82,16 | 84,63 |
| <i>C. mas6</i> | 0,3874 | 0,3595 | 0,3392 | 51,48 | 48,12 | 45,67 |
| <i>C. officinalis</i> | 0,5381 | 0,5508 | 0,5467 | 69,64 | 71,17 | 70,67 |

Tablica 7. Izmjerene apsorbancije i koncentracije u analiziranim ekstraktima listova dobivene interpolacijom iz baždarnog pravca galne kiseline

| Listovi | A1 | A2 | A3 | c1 ($\mu\text{g/mL}$) | c2 ($\mu\text{g/mL}$) | c3 ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|--------|--------|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 0,5132 | 0,5260 | 0,5403 | 66,64 | 68,18 | 69,90 |
| <i>C. mas2</i> | 0,4624 | 0,4691 | 0,4553 | 60,52 | 61,33 | 59,66 |
| <i>C. mas3</i> | 0,5362 | 0,5234 | 0,5197 | 69,41 | 67,87 | 67,42 |
| <i>C. mas4</i> | 0,5281 | 0,5357 | 0,5205 | 68,43 | 69,35 | 67,52 |
| <i>C. mas5</i> | 0,3700 | 0,3738 | 0,3767 | 49,39 | 49,84 | 50,19 |
| <i>C. mas6</i> | 0,6036 | 0,6054 | 0,6086 | 77,53 | 77,75 | 78,13 |
| <i>C. officinalis</i> | 0,5514 | 0,5592 | 0,5544 | 71,24 | 72,18 | 71,60 |

Budući da su ispitivani uzorci listova bili razrijeđeni metanolom u omjeru 1:20, dobivene vrijednosti koncentracija moraju se pomnožiti s 20:

$$c' = c * 20$$

Tablica 8. Koncentracije u nerazrijeđenim ekstraktima listova

| Listovi | c1' ($\mu\text{g/mL}$) | c2' ($\mu\text{g/mL}$) | c3' ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 1332,77 | 1363,61 | 1398,07 |
| <i>C. mas2</i> | 1210,36 | 1226,51 | 1193,25 |
| <i>C. mas3</i> | 1388,19 | 1357,35 | 1348,43 |
| <i>C. mas4</i> | 1368,67 | 1386,99 | 1350,36 |
| <i>C. mas5</i> | 987,71 | 996,87 | 1003,86 |
| <i>C. mas6</i> | 1550,60 | 1554,94 | 1562,65 |
| <i>C. officinalis</i> | 1424,82 | 1443,61 | 1432,05 |

Miligrami ekvivalenta standarda galne kiseline po gramu suhog ekstrakta (mg EGK/g SE) dobiveni su preko sljedeće formule:

$$w = (c') * V * 0,001/m$$

c') – koncentracija ispitivanog analita (prije razrjeđenja) ($\mu\text{g/mL}$)

V – volumen otopine uzorka (mL)

0,001 – faktor pretvorbe μg u mg

m – odvaga liofiliziranog uzorka (g)

Ova formula primjenjuje se za sva 3 mjerenja te se potom izračuna srednja vrijednost i standardna devijacija za svaki uzorak korištenjem funkcija AVERAGE i STDEV u Excel-u.

Tablica 9. Sadržaj ukupnih fenola (mg EGK/g SE) u metanolnim ekstraktima plodova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, n = 3)

| | <i>C. mas1</i> | <i>C. mas2</i> | <i>C. mas3</i> | <i>C. mas4</i> | <i>C. mas5</i> | <i>C. mas6</i> | <i>C. officinalis</i> |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Plodovi | 11,57 \pm 0,26 ^c | 11,92 \pm 0,18 ^c | 10,66 \pm 0,27 ^d | 11,45 \pm 0,16 ^{cd} | 16,63 \pm 0,26 ^a | 9,69 \pm 0,58 ^e | 13,56 \pm 0,15 ^b |

Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c > d > e.

Tablica 10. Sadržaj ukupnih fenola (mg EGK/g SE) u metanolnim ekstraktima listova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, n = 3)

| | <i>C. mas1</i> | <i>C. mas2</i> | <i>C. mas3</i> | <i>C. mas4</i> | <i>C. mas5</i> | <i>C. mas6</i> | <i>C. officinalis</i> |
|---------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Listovi | 262,47 \pm 6,28 ^d | 242,01 \pm 3,33 ^e | 267,58 \pm 4,09 ^{cd} | 273,73 \pm 3,66 ^c | 195,32 \pm 1,59 ^f | 311,21 \pm 1,22 ^a | 286,70 \pm 1,90 ^b |

Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): a > b > c > d > e > f.

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima plodova vrste *C. mas* kretao se od $9,69 \pm 0,58$ do $16,63 \pm 0,26$ mg ekvivalenta galne kiseline (EGK)/g suhog ekstrakta (SE). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu plodova vrste *C. officinalis* iznosio je $13,56 \pm 0,15$ mg EGK/g SE.

Sadržaj ukupnih fenola određen u ekstraktima listova bio je najmanje gotovo 12 puta veći nego u ekstraktima plodova. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima listova vrste *C. mas* kretao se od $195,32 \pm 1,59$ do $311,21 \pm 1,22$ mg EGK/g SE. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu listova vrste *C. officinalis* iznosio je $286,70 \pm 1,90$ mg EGK/g SE.

Primijećeno je da kod vrste *C. mas* udio fenola u listovima pada što je veći udio fenola u plodovima odnosno uočena je izvrsna negativna povezanost između sadržaja ukupnih fenola u listovima i plodovima koja je bila statistički značajna ($r = -0,94$, $P = 0,005$).

U istraživanju Stankovica i sur. (2014) ekstrahirana količina fenola dobivena analizom metanolnog ekstrakta plodova vrste *C. mas* iznosila je $31,36 \pm 0,34$ mg EGK/g ekstrakta, dok je za metanolni ekstrakt listova iznosila $192,21 \pm 0,36$ mg EGK/g ekstrakta odnosno sadržaj fenola bio je nekoliko puta veći u ekstraktu listova u usporedbi s ekstraktom plodova, kao i u provedenom istraživanju. Sadržaj fenola dobiven analizom vodenog ekstrakta plodova vrste *C. mas* iznosio je $12,77 \pm 0,81$ mg EGK/g ekstrakta, dok je za vodeni ekstrakt listova iznosio $341,09 \pm 0,46$ mg EGK/g ekstrakta. Sadržaj fenola dobiven analizom etilacetatnog ekstrakta plodova vrste *C. mas* iznosio je $179,05 \pm 0,53$ mg EGK/g ekstrakta, dok je za etilacetatni ekstrakt listova iznosio $65,13 \pm 0,72$ mg EGK/g ekstrakta. Sadržaj fenola dobiven analizom acetonskog ekstrakta plodova vrste *C. mas* iznosio je $55,38 \pm 0,86$ mg EGK/g ekstrakta, dok je za acetonski ekstrakt listova iznosio $239,97 \pm 0,99$ mg EGK/g ekstrakta. Sadržaj fenola dobiven analizom petroleterskog ekstrakta plodova vrste *C. mas* iznosio je $27,14 \pm 0,33$ mg EGK/g ekstrakta, dok je za petroleterski ekstrakt listova iznosio $86,57 \pm 1,04$ mg EGK/g ekstrakta. Moguće je primijetiti da su listovi uvijek bili bogatiji ukupnim fenolima od plodova osim u slučaju etilacetatnih ekstrakata. Autori su za pripremu ekstrakata koristili Soxhlet ekstrakciju koristeći svježe plodove, što bi mogao biti razlog većih vrijednosti ukupnih fenola od onih koje su utvrđene ovim istraživanjem, i osušene listove drijena.

U radu autora Klymenko i sur. (2021), ekstrahirana količina fenola dobivena analizom metanolnih ekstrakata plodova vrste *C. mas* iznosila je od 100,71 do 924,65 mg EGK/100 g biljnog materijala, dok se sadržaj ukupnih fenola u plodovima vrste *C. officinalis* kretao u usporedivom rasponu (318,57 – 451,04 mg EGK/100 g biljnog materijala), što odgovara rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Njihovi ekstrakti bili su također pripremljeni u

ultrazvučnoj kupelji, u omjeru 1:10, koristeći plodove kojima su uklonjene sjemenke, koji su bili svježe smrznuti, te 80 %-tni metanol i 1 %-tnu HCl, kroz 15 minuta.

U istraživanju Hwanga i sur. (2016) ekstrahirana količina fenola dobivena analizom etanolnog ekstrakta plodova vrste *C. officinalis* iznosila je 27,04 mg EGK/g suhog ekstrakta.

4.2. Određivanje flavonoida

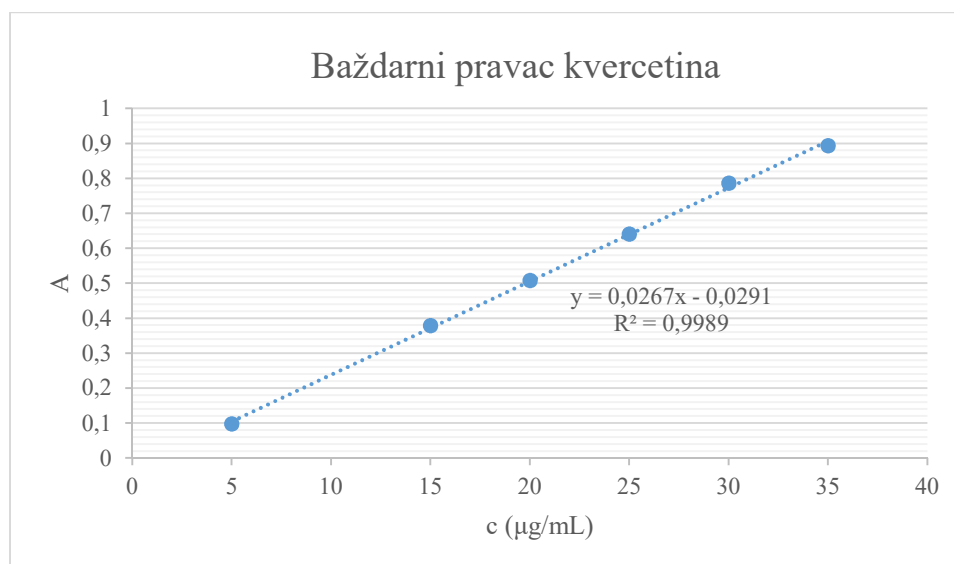
4.2.1. Baždarni pravac kvercetina

Kao standard za određivanje flavonoida korišten je kvercetin. Da bi se dobio baždarni pravac, izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija kvercetina.

Tablica 11. Koncentracije standarda kvercetina i izmjerene apsorbancije

| Koncentracija kvercetina ($\mu\text{g/mL}$) | Apsorbancija* |
|--|---------------|
| 5 | 0,09720 |
| 15 | 0,37815 |
| 20 | 0,50780 |
| 25 | 0,64080 |
| 30 | 0,78580 |
| 35 | 0,89290 |

* prosjek dvaju mjerenja



Slika 20. Baždarni pravac kvercetina

4.2.2. Sadržaj flavonoida

Sva mjerenja provedena su u triplicatu. Uzorcima je izmjerena apsorbancija te je iz baždarnog pravca kvercetina očitana odgovarajuća koncentracija.

Tablica 12. Izmjerene apsorbancije i koncentracije u analiziranim ekstraktima plodova dobivene interpolacijom iz baždarnog pravca kvercetina

| Plodovi | A1 | A2 | A3 | c1 ($\mu\text{g/mL}$) | c2 ($\mu\text{g/mL}$) | c3 ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|--------|--------|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 0,8042 | 0,8304 | 0,8321 | 31,21 | 32,19 | 32,25 |
| <i>C. mas2</i> | 0,0626 | 0,0925 | 0,0495 | 3,43 | 4,55 | 2,94 |
| <i>C. mas3</i> | 0,2884 | 0,2953 | 0,3356 | 11,89 | 12,15 | 13,66 |
| <i>C. mas4</i> | 0,1131 | 0,1753 | 0,1490 | 5,33 | 7,66 | 6,67 |
| <i>C. mas5</i> | 0,2807 | 0,2750 | 0,2789 | 11,60 | 11,39 | 11,54 |
| <i>C. mas6</i> | 0,1104 | 0,1955 | 0,1432 | 5,22 | 8,41 | 6,45 |
| <i>C. officinalis</i> | 0,1837 | 0,2097 | 0,2126 | 7,97 | 8,94 | 9,05 |

Tablica 13. Izmjerene apsorbancije i koncentracije u analiziranim ekstraktima listova dobivene interpolacijom iz baždarnog pravca kvercetina

| Listovi | A1 | A2 | A3 | c1 ($\mu\text{g/mL}$) | c2 ($\mu\text{g/mL}$) | c3 ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|--------|--------|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 0,5846 | 0,5749 | 0,6327 | 22,99 | 22,62 | 24,79 |
| <i>C. mas2</i> | 0,1226 | 0,1306 | 0,1398 | 5,68 | 5,98 | 6,33 |
| <i>C. mas3</i> | 0,3775 | 0,3768 | 0,3827 | 15,23 | 15,20 | 15,42 |
| <i>C. mas4</i> | 0,2035 | 0,2201 | 0,2115 | 8,71 | 9,33 | 9,01 |
| <i>C. mas5</i> | 0,5521 | 0,5380 | 0,5497 | 21,77 | 21,24 | 21,68 |
| <i>C. mas6</i> | 0,2180 | 0,2256 | 0,2243 | 9,25 | 9,54 | 9,49 |
| <i>C. officinalis</i> | 0,4559 | 0,4634 | 0,4603 | 18,16 | 18,45 | 18,33 |

Miligrami ekvivalenta standarda kvercetina po gramu suhog ekstrakta (mg EK/g SE) dobiveni su preko sljedeće formule:

$$w = (c * V * 0,001)/m$$

c – koncentracija ispitivanog analita ($\mu\text{g/mL}$)

V – volumen otopine uzorka (mL)

0,001 – faktor pretvorbe μg u mg

m – odvaga liofiliziranog uzorka (g)

Ova formula primjenjuje se za sva 3 mjerenja te se potom izračuna srednja vrijednost i standardna devijacija za svaki uzorak korištenjem funkcija AVERAGE i STDEV u Excel-u.

Tablica 14. Sadržaj flavonoida (mg EK/g SE) u metanolnim ekstraktima plodova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* (srednja vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

| | <i>C. mas1</i> | <i>C. mas2</i> | <i>C. mas3</i> | <i>C. mas4</i> | <i>C. mas5</i> | <i>C. mas6</i> | <i>C. officinalis</i> |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Plodovi | 1,07 ± 0,02 ^a | 0,18 ± 0,04 ^d | 0,63 ± 0,05 ^b | 0,31 ± 0,06 ^{cd} | 0,58 ± 0,01 ^b | 0,33 ± 0,08 ^c | 0,42 ± 0,03 ^c |

Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju (P < 0,05): a > b > c > d.

Tablica 15. Sadržaj flavonoida (mg EK/g SE) u metanolnim ekstraktima listova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* (srednja vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

| | <i>C. mas1</i> | <i>C. mas2</i> | <i>C. mas3</i> | <i>C. mas4</i> | <i>C. mas5</i> | <i>C. mas6</i> | <i>C. officinalis</i> |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Listovi | 4,51 ± 0,22 ^a | 1,20 ± 0,06 ^g | 3,00 ± 0,02 ^d | 1,80 ± 0,06 ^f | 4,23 ± 0,06 ^b | 1,89 ± 0,03 ^{ef} | 3,66 ± 0,03 ^c |

Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju (P < 0,05): a > b > c > d > e > f > g.

Sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova *C. mas* kretao se od 0,18 ± 0,04 do 1,07 ± 0,02 mg ekvivalenta kvercetina (EK)/g SE, dok je sadržaj flavonoida u ekstraktima listova bio u rasponu od 1,20 ± 0,06 do 4,51 ± 0,22 mg EK/g SE. Sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova i listova *C. officinalis* bio je 0,42 ± 0,03 odnosno 3,66 ± 0,03 mg EK/g SE. Sadržaj flavonoida određen u ekstraktima listova vrsta *C. mas* i *C. officinalis* bio je najmanje 4 puta veći nego u ekstraktima plodova. Uočeno je da kod vrste *C. mas* udio flavonoida u listovima raste što je veći udio flavonoida u plodovima odnosno uočena je izvrsna pozitivna povezanost između sadržaja flavonoida u listovima i plodovima koja je bila statistički značajna ($r = 0,90$, $P = 0,016$).

U istraživanju Stankovica i sur. (2014), ekstrahirana količina flavonoida dobivena analizom metanolnog ekstrakta plodova vrste *C. mas* iznosila je 7,18 ± 0,10 mg ekvivalenta rutina (ER)/g ekstrakta, dok je za metanolni ekstrakt listova iznosila 41,64 ± 0,41 mg ER/g ekstrakta odnosno preko 5 puta više, što je usporedivo s rezultatima ovog rada. Autori su za procjenu sadržaja flavonoida koristili drugi standard od onog koji je korišten u ovom radu (kvercetin 3-*O*-rutinozid), i kao slijepu probu čisti metanol, a ne slijepu probu s uzorkom, kao što je korišteno u ovome radu, pa su već samim time kod njih dobivene veće vrijednosti. Također, isti su autori analizirali svježe, a ne osušene plodove drijena (Stankovic i sur., 2014).

Shraim i sur. (2021) navode da izražavanje koncentracije rutina u reakciji s aluminijevim kloridom kao $\mu\text{g/mL}$ ekvivalenta kvercetina za posljedicu ima dobivanje lažno negativnih rezultata (26 – 42 %), dok se u obrnutom slučaju dobivaju lažno pozitivni rezultati (63 – 124 %). Uporaba kvercetina kao kvantitativnog standarda rezultira različitim vrijednostima sadržaja flavonoida za svaki uzorak od onih dobivenih korištenjem rutina, a razlika ovisi o valnoj duljini. Budući da rutin ima niže signale apsorbancije od kvercetina na svim korištenim valnim duljinama, uporaba rutina kao kvantitativnog standarda uvijek rezultira višim vrijednostima sadržaja flavonoida. Kako različiti flavonoidi imaju različite kemijske strukture, primjetne razlike u njihovim apsorpcijskim spektrima su neosporne. Sukladno tome, rezultati utvrđenog sadržaja flavonoida testom s aluminijevim kloridom ovise o korištenom standardu.

Relativno niski sadržaji flavonoida u istraživanim uzorcima crvenog i kineskog drijena mogli bi biti i posljedica toga što istraživane vrste pretežno sadrže 3-*O*-glikozilirane derivate kvercetina i drugih flavonoida (Czerwińska i Melzig, 2018), a koji se ne mogu određivati korištenom metodom s aluminijevim kloridom. Mammen i Daniel (2012) navode da glikozilirane hidroksilne skupine na ugljicima u položajima 3, 5, 3' ili 4' mogu spriječiti kelaciju s aluminijevim kloridom.

4.3. Određivanje antioksidativnog učinka *in vitro* ABTS testom

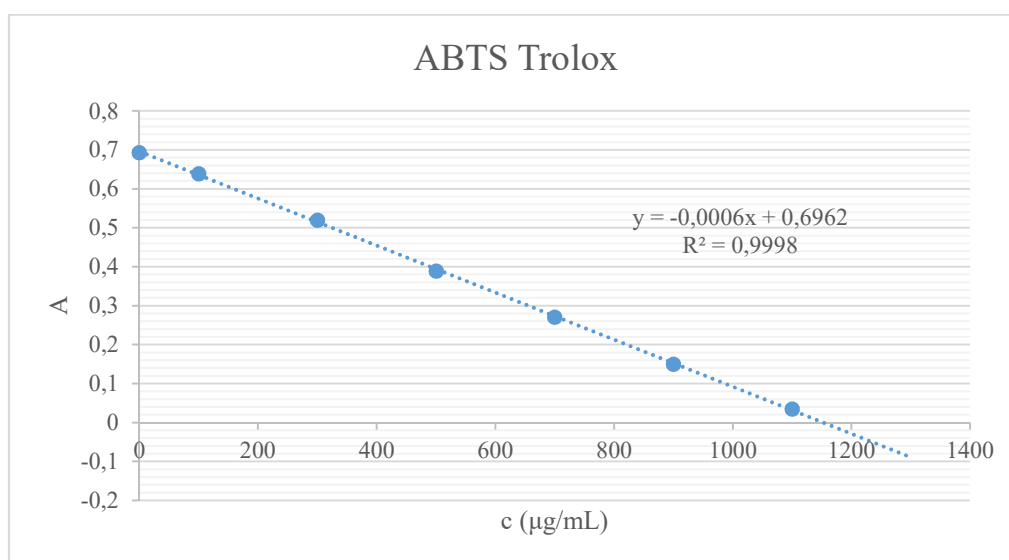
4.3.1. Antiradikalna aktivnost Troloxa

U svrhu procjene antiradikalne aktivnosti uzoraka prethodno je izmjerena antiradikalna aktivnost standarda Troloxa. Da bi se dobio baždarni pravac, izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija Troloxa.

Tablica 16. Koncentracije standarda Troloxa, izmjerene apsorbancije, stvarne koncentracije standarda u kivetu i postotci inhibicije ABTS radikal kationa

| c pipetirana (µg/mL) | Apsorbancija* | c stvarna (µg/mL) | % inhibicije |
|----------------------|---------------|-------------------|--------------|
| 0 | 0,69340 | 0,00 | 0,00 |
| 100 | 0,63900 | 0,50 | 7,85 |
| 300 | 0,51995 | 1,49 | 25,01 |
| 500 | 0,38965 | 2,49 | 43,81 |
| 700 | 0,27115 | 3,48 | 60,90 |
| 900 | 0,15035 | 4,48 | 78,32 |
| 1100 | 0,03525 | 5,47 | 94,92 |

* prosjek dvaju mjerenja



Slika 21. Baždarni pravac Troloxa

Stvarne koncentracije Troloxa u kiveti dobivene su preko sljedeće formule:

$$c_2 = (c_1 * V_1) / V_2$$

c_2 – stvarna koncentracija u kiveti

c_1 – pipetirana koncentracija

V_1 – volumen pipetiranog standarda (10 μL standarda)

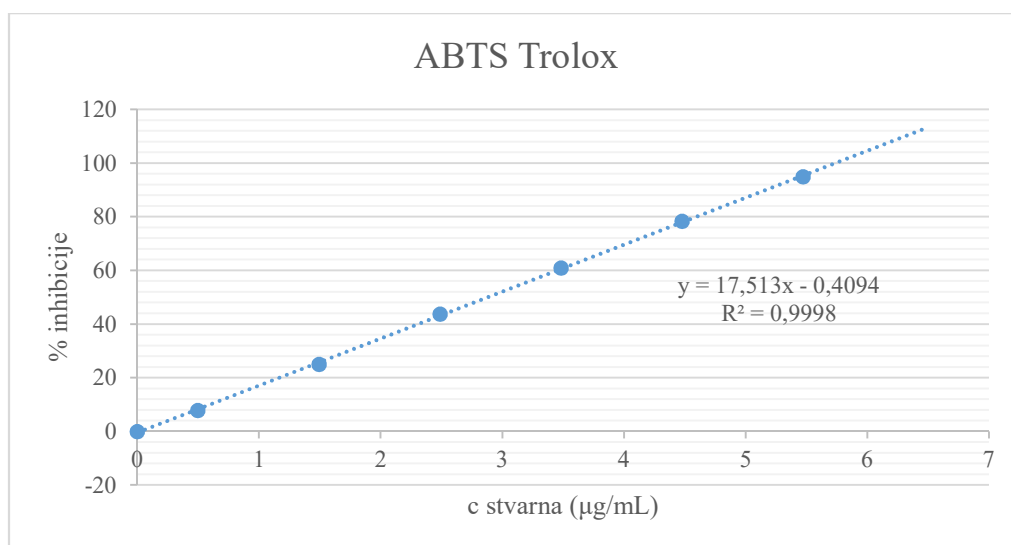
V_2 – ukupni volumen u kiveti (2 mL ABTS reagensa + 10 μL standarda)

Postotak smanjenja apsorbancije dobiven je prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - A/A_0 * 100$$

A_0 – apsorbancija kontrolne otopine ABTS radikal kationa

A – apsorbancija otopine ABTS radikal kationa i uzorka



Slika 22. Pravac ovisnosti postotka inhibicije ABTS radikal kationa o stvarnoj koncentraciji Troloxa

Iz jednadžbe pravca ovisnosti postotka inhibicije ABTS radikal kationa o stvarnoj koncentraciji Troloxa u kiveti dobivena je IC_{50} vrijednost za Trolox koja je iznosila 2,88 $\mu\text{g/mL}$ (11,51 μM).

4.3.2. Antiradikalna aktivnost uzoraka

Mjerenja su rađena jednom za svako razrjeđenje uzorka. Razrjeđenjima uzoraka je izmjerena apsorbanacija te su preračunavanjem dobiveni pravci ovisnosti postotka inhibicije o stvarnoj koncentraciji za svaki uzorak iz kojih su izračunate njihove IC₅₀ vrijednosti.

Tablica 17. Antiradikalna aktivnost (IC₅₀) metanolnih ekstrakata plodova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* procijenjena ABTS testom

| Plodovi | IC ₅₀ (µg/mL) |
|-----------------------|-----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 179,80 |
| <i>C. mas2</i> | 83,85 |
| <i>C. mas3</i> | 66,15 |
| <i>C. mas4</i> | 57,91 |
| <i>C. mas5</i> | 85,63 |
| <i>C. mas6</i> | 52,91 |
| <i>C. officinalis</i> | 63,08 |

Tablica 18. Antiradikalna aktivnost (IC₅₀) metanolnih ekstrakata listova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* procijenjena ABTS testom

| Listovi | IC ₅₀ (µg/mL) |
|-----------------------|-----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 4,47 |
| <i>C. mas2</i> | 5,16 |
| <i>C. mas3</i> | 4,14 |
| <i>C. mas4</i> | 3,64 |
| <i>C. mas5</i> | 5,51 |
| <i>C. mas6</i> | 3,32 |
| <i>C. officinalis</i> | 3,97 |

ABTS testom procijenjene IC₅₀ vrijednosti ekstrakata plodova i listova vrste *C. mas* kretale su se između 52,91 i 179,80 µg/mL odnosno između 3,32 i 5,51 µg/mL, dok su kod ekstrakata plodova i listova vrste *C. officinalis* uočene usporedive vrijednosti, a koje su iznosile 63,08 i 3,97 µg/mL.

Prema radu Klymenka i sur. (2021) antioksidativni kapacitet etanolnih ekstrakata svježih plodova vrste *C. mas* iznosio je između 13,56 i 60,04 µmol ekvivalenta Troloxa (ET)/g biljnog

materijala, dok su kod uzoraka vrste *C. officinalis* bile utvrđene usporedive vrijednosti (31,60 – 36,71 $\mu\text{mol ET/g}$ biljnog materijala), kao i u ovom istraživanju.

Moldovan i sur. (2016) izvijestili su da je antioksidativni kapacitet svježih plodova vrste *C. mas* iznosio $677,88 \pm 19,25 \mu\text{mol ET/100 g}$ biljnog materijala.

Dragović-Uzelac i sur. (2007) su ispitivanjem provedenim na dva uzorka plodova vrste *C. mas* koji su bili svježe smrznuti utvrdili antiradikalnu aktivnost koja se kretala između $29,48 \pm 3,05$ i $36,51 \pm 2,05 \text{ mmol ET/kg}$ biljnog materijala.

4.4. Određivanje antioksidativnog učinka *in vitro* DPPH testom

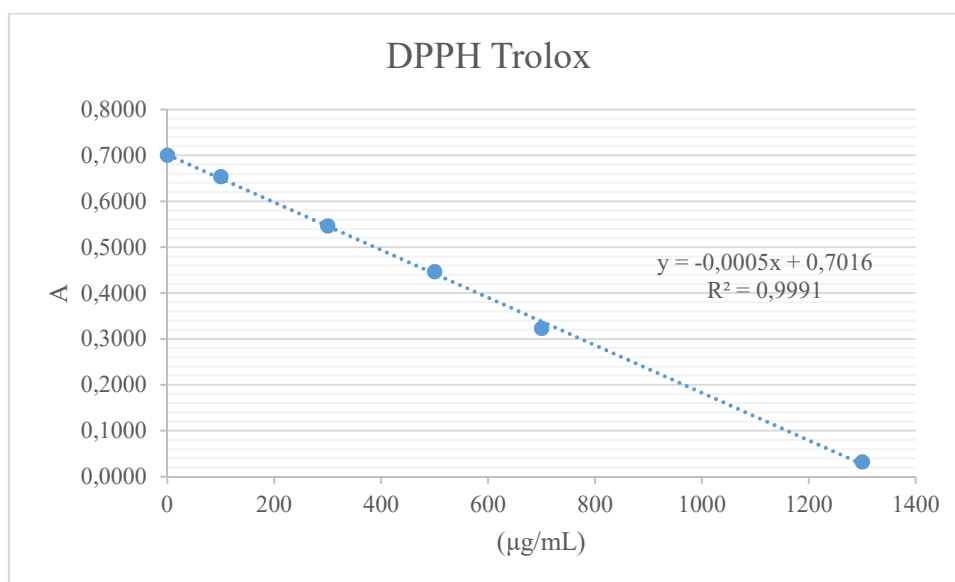
4.4.1. Antiradikalna aktivnost Troloxa

U svrhu procjene antiradikalne aktivnosti uzoraka prethodno je izmjerena antiradikalna aktivnost standarda Troloxa. Da bi se dobio baždarni pravac, izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija Troloxa.

Tablica 19. Koncentracije standarda Troloxa, izmjerene apsorbancije, stvarne koncentracije standarda u kiveti i postotci inhibicije DPPH radikala

| c pipetirana (µg/mL) | Apsorbancija* | c stvarna (µg/mL) | % inhibicije |
|----------------------|---------------|-------------------|--------------|
| 0 | 0,7010 | 0,00 | 0,00 |
| 100 | 0,6542 | 0,50 | 6,68 |
| 300 | 0,5465 | 1,49 | 22,04 |
| 500 | 0,4467 | 2,49 | 36,28 |
| 700 | 0,3238 | 3,48 | 53,81 |
| 1300 | 0,0328 | 6,47 | 95,32 |

* prosjek dvaju mjerenja



Slika 23. Baždarni pravac Troloxa

Stvarne koncentracije Troloxa u kiveti dobivene su preko sljedeće formule:

$$c_2 = (c_1 * V_1) / V_2$$

c_2 – stvarna koncentracija u kiveti

c_1 – pipetirana koncentracija

V_1 – volumen pipetiranog standarda (10 μL standarda)

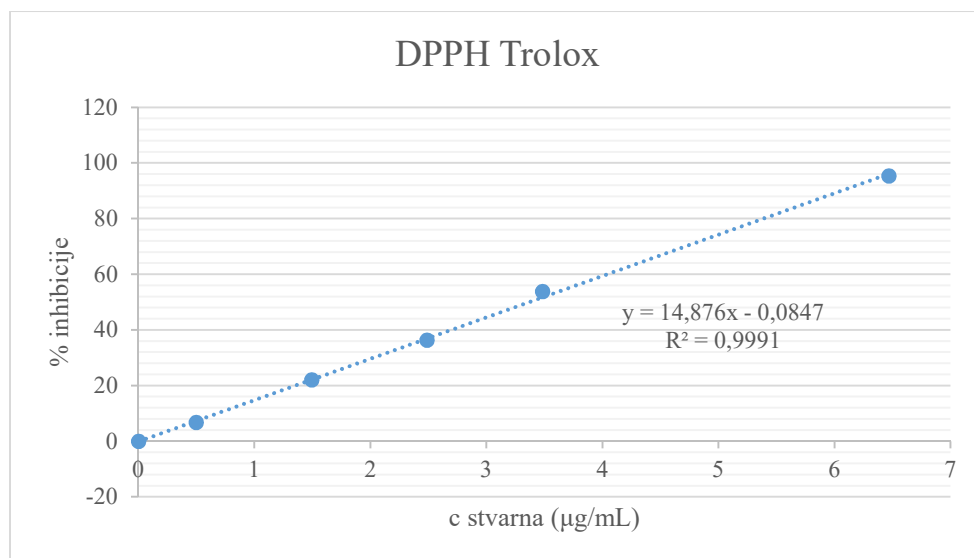
V_2 – ukupni volumen u kiveti (2 mL DPPH reagensa + 10 μL standarda)

Postotak smanjenja apsorbancije dobiven je prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - A/A_0 * 100$$

A_0 – apsorbancija kontrolne otopine DPPH radikala

A – apsorbancija otopine DPPH radikala i uzorka



Slika 24. Pravac ovisnosti postotka inhibicije DPPH radikala o stvarnoj koncentraciji Troloxa

Iz jednadžbe pravca ovisnosti postotka inhibicije DPPH radikala o stvarnoj koncentraciji Troloxa u kiveti dobivena je IC_{50} vrijednost za Trolox koja je iznosila 3,37 $\mu\text{g/mL}$ (13,46 μM).

4.4.2. Antiradikalna aktivnost uzoraka

Mjerenja su rađena jednom za svako razrjeđenje uzorka. Razrjeđenjima uzoraka je izmjerena apsorbancija te su preračunavanjem dobiveni pravci ovisnosti postotka inhibicije o stvarnoj koncentraciji za svaki uzorak iz kojih su izračunate njihove IC₅₀ vrijednosti.

Tablica 20. Antiradikalna aktivnost (IC₅₀) metanolnih ekstrakata plodova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* procijenjena DPPH testom

| Plodovi | IC ₅₀ (µg/mL) |
|-----------------------|-----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 162,64 |
| <i>C. mas2</i> | 200,22 |
| <i>C. mas3</i> | 240,74 |
| <i>C. mas4</i> | 259,16 |
| <i>C. mas5</i> | 68,64 |
| <i>C. mas6</i> | 229,57 |
| <i>C. officinalis</i> | 141,38 |

Tablica 21. Antiradikalna aktivnost (IC₅₀) metanolnih ekstrakata listova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* procijenjena DPPH testom

| Listovi | IC ₅₀ (µg/mL) |
|-----------------------|-----------------------------|
| <i>C. mas1</i> | 5,05 |
| <i>C. mas2</i> | 5,39 |
| <i>C. mas3</i> | 5,43 |
| <i>C. mas4</i> | 4,61 |
| <i>C. mas5</i> | 8,25 |
| <i>C. mas6</i> | 4,53 |
| <i>C. officinalis</i> | 4,35 |

DPPH testom procijenjene IC₅₀ vrijednosti ekstrakata plodova i listova vrste *C. mas* kretale su se između 68,64 i 259,16 µg/mL odnosno između 4,53 i 8,25 µg/mL, dok su kod ekstrakata plodova i listova vrste *C. officinalis* utvrđene IC₅₀ vrijednosti iznosile 141,38 i 4,35 µg/mL. U usporedbi s rezultatima ABTS testa utvrđene su nešto više IC₅₀ vrijednosti za ekstrakte listova, a isto je primijećeno i kod većeg broja ekstrakata plodova.

Klymenko i sur. (2021) utvrdili su vrijednosti antioksidativnog djelovanja etanolnih ekstrakata plodova vrsta *C. mas* (6,75 – 77,35 $\mu\text{mol ET/g}$ biljnog materijala) i *C. officinalis* (17,82 – 39,79 $\mu\text{mol ET/g}$ biljnog materijala). Kao i u ovom istraživanju, utvrđene vrijednosti za vrstu *C. officinalis* bile su usporedive s onima vrste *C. mas*.

Dragović-Uzelac i sur. (2007) su ispitivanjem provedenim na dva uzorka plodova vrste *C. mas* koji su bili svježe smrznuti utvrdili antiradikalnu aktivnost koja se kretala između $33,41 \pm 2,15$ i $39,89 \pm 3,05$ mmol ET/kg svježeg biljnog materijala. Stankovic i sur. (2014) utvrdili su IC_{50} vrijednosti metanolnih ekstrakata listova i plodova vrste *C. mas* koje su iznosile $39,40 \pm 0,91$ $\mu\text{g/mL}$ i $251,87 \pm 0,98$ $\mu\text{g/mL}$, pri čemu su posljedne usporedive s vrijednostima dobivenim u ovom radu. S druge strane, u ovom radu utvrđen je veći antioksidativni učinak ekstrakata listova vrste *C. mas* u usporedbi s prethodnim radom čiji su autori za pripremu ekstrakata koristili Soxhlet ekstrakciju koristeći svježe plodove i osušene listove drijena (Stankovic i sur., 2014).

Može se primijetiti da su u ABTS testu za ekstrakte listova utvrđene nešto niže IC_{50} vrijednosti u usporedbi s DPPH testom, a što je i primijećeno i kod većeg broja ekstrakata plodova.

4.5. Korelacije između različitih parametara

Tablica 22. Povezanost između izmjerenih parametara (sadržaja ukupnih fenola, sadržaja flavonoida te antiradikalne aktivnosti procijenjene ABTS i DPPH testom) metanolnih ekstrakata plodova i listova vrsta *Cornus mas* i *Cornus officinalis* (n = 14)

| | Ukupni fenoli | Flavonoidi | ABTS | DPPH |
|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ukupni fenoli | 1 | 0,76* (P = 0,002) | -0,80* (P < 0,001) | -0,89* (P < 0,001) |
| Flavonoidi | | 1 | -0,59* (P = 0,026) | -0,74* (P = 0,002) |
| ABTS | | | 1 | 0,65* (P = 0,012) |
| DPPH | | | | 1 |

* – statistički značajna povezanost (P < 0,05)

Povezanost između izmjerenih parametara procijenjena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (r). Sve utvrđene povezanosti bile su statistički značajne (P < 0,05).

Uočeno je da su najsnažniju antiradikalnu aktivnost (najniži IC₅₀) imali ekstrakti listova koji su bili najbogatiji fenolima te ekstrakti plodova istih populacija odnosno uočena je vrlo dobra negativna povezanost između sadržaja ukupnih fenola i IC₅₀ vrijednosti dobivenih ABTS testom koja je bila statistički značajna ($r = -0,80$, P < 0,001). Također, uočena je i vrlo dobra negativna povezanost između sadržaja ukupnih fenola i IC₅₀ vrijednosti dobivenih DPPH testom koja je bila statistički značajna ($r = -0,89$, P < 0,001). S druge strane, umjerena ($r = -0,59$, P = 0,026) do dobra negativna povezanost ($r = -0,74$, P = 0,002) utvrđena je između sadržaja flavonoida i antiradikalne aktivnosti izražene kao vrijednost IC₅₀ u ABTS i DPPH testu. Kao i u ovom radu, Klymenko i sur. (2021) utvrdili su veću povezanost između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta pomoću DPPH testa ($r = 0,979$, P < 0,05) u usporedbi s ABTS testom ($r = 0,942$, P < 0,05). Također, isti su autori uočili statistički značajnu povezanost između vrijednosti antioksidativnog kapaciteta procijenjenih DPPH testom i sadržaja flavonola ($r = 0,707$, P < 0,05), dok s istim vrijednostima procijenjenim pomoću ABTS testa u navedenom istraživanju nije bila uočena statistički značajna povezanost ($r = 0,556$, P > 0,05).

Stankovic i sur. (2014) su usporednom analizom rezultata koncentracija fenolnih spojeva i antioksidativnog djelovanja također zaključili da ekstrakti drijena s najvišim koncentracijama fenolnih spojeva imaju snažno antioksidativno djelovanje ($r = 0,717$).

5. ZAKLJUČAK

Sadržaj ukupnih fenola metanolnih ekstrakata vrste *C. officinalis* (plodovi: 13,56 mg EGK/g SE; listovi: 286,70 mg EGK/g SE) bio je usporediv sa sadržajem ukupnih fenola ekstrakata vrste *C. mas* (plodovi: 9,69 – 16,63 mg EGK/g SE; listovi: 195,32 – 311,21 mg EGK/g SE).

Sadržaj flavonoida metanolnih ekstrakata vrste *C. officinalis* (plodovi: 0,42 mg EK/g SE; listovi: 3,66 mg EK/g SE) bio je usporediv sa sadržajem flavonoida ekstrakata vrste *C. mas* (plodovi: 0,18 – 1,07 mg EK/g SE; listovi: 1,20 – 4,51 mg EK/g SE).

Antioksidativni (antiradikalni) učinci procijenjeni ABTS testom metanolnih ekstrakata vrste *C. officinalis* (plodovi: $IC_{50} = 63,08 \mu\text{g/mL}$; listovi: $IC_{50} = 3,97 \mu\text{g/mL}$) bili su usporedivi s antioksidativnim (antiradikalnim) učincima ekstrakata vrste *C. mas* (plodovi: $IC_{50} = 52,91 - 179,80 \mu\text{g/mL}$; listovi: $IC_{50} = 3,32 - 5,51 \mu\text{g/mL}$).

U DPPH testu ekstrakt listova vrste *C. officinalis* pokazao je najbolji antioksidativni učinak ($IC_{50} = 4,35 \mu\text{g/mL}$), dok je ekstrakt plodova ($IC_{50} = 141,38 \mu\text{g/mL}$) bio usporediv s antioksidativnim učincima ekstrakata vrste *C. mas* (plodovi: $IC_{50} = 68,64 - 259,16 \mu\text{g/mL}$; listovi: $IC_{50} = 4,53 - 8,25 \mu\text{g/mL}$).

Zabilježeni antioksidativni (antiradikalni) učinci mogli bi biti povezani sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida. Uočeno je da su najsnažniju antiradikalnu aktivnost imali ekstrakti plodova i listova koji su bili najbogatiji fenolima te je utvrđena umjerena do dobra negativna povezanost između sadržaja flavonoida i antiradikalne aktivnosti izražene kao vrijednost IC_{50} u ABTS i DPPH testu.

6. LITERATURA

- Alavian SM, Banihabib N, Es Haghi M, Panahi F. Protective effect of *Cornus mas* fruits extract on serum biomarkers in CCl₄-induced hepatotoxicity in male rats. *Hepat Mon*, 2014, 14: 10330.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, 127, 183–198.
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituents. *J Pharm Belg*, 1994, 49, 462–468.
- Bayram HM, Ozturkcan SA. Bioactive components and biological properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.): A comprehensive review. *J Funct Foods*, 2020, 75: 104252.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 1998, 78, 547–581.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 1993, 49, 481–493.
- Cherrak SA, Mokhtari-Soulimane N, Berroukeche F, Bensenane B, Cherbonnel A, Merzouk H, Elhabiri M. *In vitro* antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: a structure-activity investigation. *PLoS One*, 2016, 11: 0165575.
- Chettri A, Barik SK, Singh B, Adhikari D, Lyngdoh MK. *Cornus kousa* F. Buerger ex Hance subsp. *kousa* (Cornaceae), a new record from India. *Taiwania*, 2012, 57, 77–81.
- Cornus* L., 2022., <https://powo.science.kew.org/>, pristupljeno 24. 8. 2022.
- Cornus alba*, 2022., <http://luirig.altervista.org/>, pristupljeno 24. 8. 2022.
- Cornus alba*, 2022., <https://www.plantea.com.hr/bijeli-svib/>, pristupljeno 19. 7. 2022.
- Cornus sanguinea*, 2021., <https://www.plantea.com.hr/svib/>, pristupljeno 1. 10. 2021.
- Cornus sanguinea*, 2022., <http://luirig.altervista.org/>, pristupljeno 24. 8. 2022.
- Czerwińska ME, Melzig MF. *Cornus mas* and *Cornus officinalis* – Analogies and differences of two medicinal plants traditionally used. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 894.
- Demir F, Kalyoncu IH. Some nutritional, pomological and physical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *J Food Eng*, 2003, 60, 335–341.

- Dinda B, Kyriakopoulos AM, Dinda S, Zoumpourlis V, Thomaidis NS, Velegraki A, Markopoulos C, Dinda M. *Cornus mas* L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193, 670–690.
- Domac R. Flora Hrvatske: priručnik za određivanje bilja, 2. izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 2002, str. 223.
- Dragović-Uzelac V, Levaj B, Bursać D, Pedisić S, Radojčić I, Biško A. Total phenolics and antioxidant capacity assays of selected fruits. *Agric Conspec Sci*, 2007, 72, 279–284.
- Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol*, 2010, 2, 22–33.
- Dujmović Purgar D, Duralija B, Mešić A, Vokurka A, Rubeša A. Rasprostranjenost i važnost roda *Cornus* u Hrvatskoj. *Pomol Croat*, 2012, 18, 33–51.
- Francik R, Kryczyk J, Krośniak M, Berköz M, Sanocka I, Francik S. The neuroprotective effect of *Cornus mas* on brain tissue of wistar rats. *Sci World J*, 2014, 2014: 847368.
- Friščić M, Maslo S, Garić R, Maleš Ž, Hazler Pilepić K. Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity *in vitro* of different natural populations of *Globularia* spp. *Acta Bot Croat*, 2018, 77, 1–9.
- Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS. Lyophilization / freeze drying – a review. *World J Pharm Res*, 2015, 4, 516–543.
- Gholamrezayi A, Aryaician 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, 2. izd. Zagreb, August Cesarec, 1990, str. 224–225.
- Hazarika U, Gosztola B. Lyophilization and its effects on the essential oil content and composition of herbs and spices – A review. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 2020, 19, 467–473.

- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 2002, 13, 572–584.
- Huang J, Zhang Y, Dong L, Gao Q, Yin L, Quan H, Chen R, Fu X, Lin D. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *J Ethnopharmacol*, 2018, 213, 280–301.
- Hwang K-A, Hwang Y-J, Song J. Antioxidant activities and oxidative stress inhibitory effects of ethanol extracts from *Cornus officinalis* on raw 264.7 cells. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 196.
- Işık F, Çelik I, Yılmaz Y. Effect of cornelian cherry use on physical and chemical properties of tarhana. *Acad Food J*, 2014, 12, 34–40.
- 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, 53, 28–31.
- Klymenko S, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Piórecki N, Przybylska D, Grygorieva O. Iridoids, flavonoids, and antioxidant capacity of *Cornus mas*, *C. officinalis*, and *C. mas* × *C. officinalis* fruits. *Biomolecules*, 2021, 11: 776.
- López-Posadas R, Ballester I, Abadía-Molina AC, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, Sánchez de Medina F. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76, 495–506.
- Ma W, Wang KJ, Cheng CS, Yan GQ, Lu WL, Ge JF, Cheng YX, Li N. Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153, 840–845.
- Mammen D, Daniel M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem*, 2012, 135, 1365–1368.
- Milenković-Andjelković AS, Andjelković 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.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 2004, 26, 211–219.
- Muñiz-Márquez DB, Martínez-Avila GC, Wong-Paz JE, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20, 1149–1154.
- Nikolić T. Flora Croatica - Vaskularna flora Republike Hrvatske, vol. 4. Zagreb, Alfa, 2019, str. 282–283.
- Nikolić T, Kovačić S. Flora Medvednice - 250 najčešćih vrsta Zagrebačke gore. Zagreb, Školska knjiga, 2008, str. 70–71.
- Ozcan T, Akpinar-Bayazit A, Yilmaz-Ersan L, Delikanli B. Phenolics in human health. *Int J Chem Eng Appl*, 2014, 5, 393–396.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270–278.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 2000, 63, 1035–1042.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26, 1231–1237.
- Rice-Evans CA, Burdon RH. Free Radical Damage and its Control. Amsterdam, Elsevier Science B. V., 1994, str. 4, 27, 113.
- Shraim AM, Ahmed TA, Rahman MM, Hijji YM. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT - Food Sci Technol*, 2021, 150: 111932.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Vitic*, 1965, 16, 144–158.

- Stankovic MS, Zia-Ul-Hao M, Bojovic BM, Topuzovic MD. Total phenolics, flavonoid content and antioxidant power of leaf, flower and fruits from Cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Bulg J Agric Sci*, 2014, 20, 358–363.
- Trinajstić I. *Cornus hungarica* Kárpáti u dendroflori Hrvatske. *Šum list*, 1990, 114, 127–131.
- 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.
- Turker AU, Yildirim AB, Karakas FP. Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2012, 26, 2765–2772.

7. SAŽETAK

7.1. Sažetak

U ovom radu ispitan je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida te antioksidativni učinak *in vitro* metanolnih ekstrakata plodova i listova šest uzoraka vrste *Cornus mas* L. i jednog uzorka vrste *Cornus officinalis* Siebold & Zucc., Cornaceae. Uzorci su osušeni na zraku, samljeveni i ekstrahirani metanolom u ultrazvučnoj kupelji. Nakon filtracije, organsko otapalo je uklonjeno pomoću vakuumske uparivača, a upareni ekstrakti su resuspendirani u destiliranoj vodi, zamrznuti i nakon toga liofilizirani. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida određen je spektrofotometrijski u vodenim otopinama dobivenih liofilizata Folin-Ciocalteu metodom odnosno $AlCl_3$ metodom. Antioksidativni (antiradikalni) učinak određen je pomoću ABTS i DPPH testa. Pearsonov koeficijent korelacije (r) korišten je za utvrđivanje odnosa između izmjerenih parametara ($\alpha = 0,05$).

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima plodova i listova vrste *C. mas* kretao se od $9,69 \pm 0,58$ do $16,63 \pm 0,26$ mg ekvivalenta galne kiseline (EGK)/g suhog ekstrakta (SE) odnosno od $195,32 \pm 1,59$ do $311,21 \pm 1,22$ mg EGK/g SE. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima plodova i listova vrste *C. officinalis* iznosio je $13,56 \pm 0,15$ mg EGK/g SE, odnosno $286,70 \pm 1,90$ mg EGK/g SE. Sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova *C. mas* kretao se od $0,18 \pm 0,04$ do $1,07 \pm 0,02$ mg ekvivalenta kvercetina (EK)/g SE, dok je sadržaj flavonoida u ekstraktima listova bio u rasponu od $1,20 \pm 0,06$ do $4,51 \pm 0,22$ mg EK/g SE. Sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova i listova *C. officinalis* bio je $0,42 \pm 0,03$ odnosno $3,66 \pm 0,03$ mg EK/g SE. Uočena je vrlo dobra negativna povezanost između ukupnog sadržaja fenola u listovima i plodovima vrste *C. mas* ($r = -0,94$, $P = 0,005$), dok je između sadržaja flavonoida u listovima i plodovima vrste *C. mas* uočena vrlo dobra pozitivna povezanost ($r = 0,90$, $P = 0,016$). Antiradikalna aktivnost vrste *C. mas* procijenjena kao IC_{50} vrijednost u ABTS testu iznosila je između 52,91 i 179,80 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte plodova odnosno između 3,32 i 5,51 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte listova, dok je za ekstrakte plodova i listova vrste *C. officinalis* iznosila 63,08 $\mu\text{g/mL}$ i 3,97 $\mu\text{g/mL}$. Antiradikalna aktivnost vrste *C. mas* procijenjena kao IC_{50} vrijednost u DPPH testu iznosila je između 68,64 i 259,16 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte plodova odnosno između 4,53 i 8,25 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte listova, dok je za ekstrakte plodova i listova vrste *C. officinalis* iznosila 141,38 $\mu\text{g/mL}$ i 4,35 $\mu\text{g/mL}$. Uočena je vrlo dobra negativna povezanost između sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti listova i plodova istraživanih vrsta procijenjene DPPH testom ($r = -0,89$, $P < 0,001$) i ABTS testom ($r = -0,80$, $P < 0,001$). Utvrđene vrijednosti za uzorak vrste *C. officinalis* bile su usporedive s onima uzoraka vrste *C. mas*.

7.2. Summary

In this study, total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity *in vitro* of methanolic extracts of fruits and leaves from six samples of *Cornus mas* L. and one sample of *Cornus officinalis* Siebold & Zucc., Cornaceae, have been investigated. Samples were air-dried, milled and extracted with methanol in an ultrasonic bath. After filtration, organic solvent was removed using a rotary evaporator and the remaining extracts were resuspended in distilled water, frozen and afterward subjected to lyophilization. Total phenolic content and flavonoid content were evaluated spectrophotometrically in aqueous solutions of obtained lyophilizates using the Folin-Ciocalteu method and the $AlCl_3$ method, respectively. The antioxidant (antiradical) activity was determined using the ABTS and DPPH tests. Pearson's correlation coefficient (r) was used to establish the relationships between the measured parameters ($\alpha = 0.05$).

Total phenolic content of *C. mas* fruit and leaf extracts ranged from 9.69 ± 0.58 to 16.63 ± 0.26 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry extract (DE) and from 195.32 ± 1.59 to 311.21 ± 1.22 mg GAE/g DE, respectively. Total phenolic contents of *C. officinalis* fruit and leaf extracts were 13.56 ± 0.15 mg GAE/g DE and 286.70 ± 1.90 mg GAE/g DE, respectively. Flavonoid content in fruit extracts of *C. mas* ranged from 0.18 ± 0.04 to 1.07 ± 0.02 mg quercetin equivalent (QE)/g DE, while flavonoid content in leaf extracts ranged from 1.20 ± 0.06 to 4.51 ± 0.22 mg QE/g DE. Flavonoid contents of *C. officinalis* fruit and leaf extracts were 0.42 ± 0.03 and 3.66 ± 0.03 mg QE/g DE, respectively. Very strong negative correlation was observed between total phenolic contents in leaves and fruits of *C. mas* ($r = -0.94$, $P = 0.005$), while very strong positive correlation was observed between leaf and fruit flavonoid contents of *C. mas* ($r = 0.90$, $P = 0.016$). Antiradical activity estimated as IC_{50} value by the ABTS test of the fruit and leaf extracts of *C. mas* ranged from 52.91 to 179.8 $\mu\text{g/mL}$ and from 3.32 to 5.51 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antiradical activity of the fruit and leaf extracts of *C. officinalis* was 63.08 $\mu\text{g/mL}$ and 3.97 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Antiradical activity estimated as IC_{50} value by the DPPH test of the fruit and leaf extracts of *C. mas* ranged from 68.64 to 259.16 $\mu\text{g/mL}$ and from 4.53 to 8.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antiradical activity of the fruit and leaf extracts of *C. officinalis* was 141.38 $\mu\text{g/mL}$ and 4.35 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Very strong negative correlation was observed between total phenolic content and antiradical activity of leaves and fruits of investigated species evaluated by the DPPH test ($r = -0.89$, $P < 0.001$) and the ABTS test ($r = -0.80$, $P < 0.001$). The determined values for the *C. officinalis* sample were comparable to those of the *C. mas* samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

SADRŽAJ FENOLA, FLAVONOIDA I ANTIRADIKALNA AKTIVNOST *IN VITRO* METANOLNIH EKSTRAKATA PLODOVA I LISTOVA VRSTA *CORNUS MAS* L. I *CORNUS OFFICINALIS* SIEBOLD & ZUCC.

Andrea Gelo

SAŽETAK

U ovom radu ispitan je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida te antioksidativni učinak *in vitro* metanolnih ekstrakata plodova i listova šest uzoraka vrste *Cornus mas* L. i jednog uzorka vrste *Cornus officinalis* Siebold & Zucc., Cornaceae. Uzorci su osušeni na zraku, samljeveni i ekstrahirani metanolom u ultrazvučnoj kupelji. Nakon filtracije, organsko otapalo je uklonjeno pomoću vakuumnog uparivača, a upareni ekstrakti su resuspendirani u destiliranoj vodi, zamrznuti i nakon toga liofilizirani. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida određen je spektrofotometrijski u vodenim otopinama dobivenih liofilizata Folin-Ciocalteu metodom odnosno AlCl_3 metodom. Antioksidativni (antiradikalni) učinak određen je pomoću ABTS i DPPH testa. Pearsonov koeficijent korelacije (r) korišten je za utvrđivanje odnosa između izmjerenih parametara ($\alpha = 0,05$). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima plodova i listova vrste *C. mas* kretao se od $9,69 \pm 0,58$ do $16,63 \pm 0,26$ mg ekvivalenta galne kiseline (EGK)/g suhog ekstrakta (SE) odnosno od $195,32 \pm 1,59$ do $311,21 \pm 1,22$ mg EGK/g SE. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima plodova i listova vrste *C. officinalis* iznosio je $13,56 \pm 0,15$ mg EGK/g SE, odnosno $286,70 \pm 1,90$ mg EGK/g SE. Sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova *C. mas* kretao se od $0,18 \pm 0,04$ do $1,07 \pm 0,02$ mg ekvivalenta kvercetina (EK)/g SE, dok je sadržaj flavonoida u ekstraktima listova bio u rasponu od $1,20 \pm 0,06$ do $4,51 \pm 0,22$ mg EK/g SE. Sadržaj flavonoida u ekstraktima plodova i listova *C. officinalis* bio je $0,42 \pm 0,03$ odnosno $3,66 \pm 0,03$ mg EK/g SE. Uočena je vrlo dobra negativna povezanost između ukupnog sadržaja fenola u listovima i plodovima vrste *C. mas* ($r = -0,94$, $P = 0,005$), dok je između sadržaja flavonoida u listovima i plodovima vrste *C. mas* uočena vrlo dobra pozitivna povezanost ($r = 0,90$, $P = 0,016$). Antiradikalna aktivnost vrste *C. mas* procijenjena kao IC_{50} vrijednost u ABTS testu iznosila je između 52,91 i 179,80 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte plodova odnosno između 3,32 i 5,51 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte listova, dok je za ekstrakte plodova i listova vrste *C. officinalis* iznosila 63,08 $\mu\text{g/mL}$ i 3,97 $\mu\text{g/mL}$. Antiradikalna aktivnost vrste *C. mas* procijenjena kao IC_{50} vrijednost u DPPH testu iznosila je između 68,64 i 259,16 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte plodova odnosno između 4,53 i 8,25 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte listova, dok je za ekstrakte plodova i listova vrste *C. officinalis* iznosila 141,38 $\mu\text{g/mL}$ i 4,35 $\mu\text{g/mL}$. Uočena je vrlo dobra negativna povezanost između sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti listova i plodova istraživanih vrsta procijenjene DPPH testom ($r = -0,89$, $P < 0,001$) i ABTS testom ($r = -0,80$, $P < 0,001$). Utvrđene vrijednosti za uzorak vrste *C. officinalis* bile su usporedive s onima uzoraka vrste *C. mas*.

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

Rad sadrži: 65 stranica, 24 grafička prikaza, 22 tablice i 53 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Cornus mas*, *Cornus officinalis*, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj flavonoida, ABTS, DPPH

Mentor: **Dr. sc. Maja Friščić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Friščić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Željko Maleš, redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Daniela Jakšić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AND *IN VITRO* ANTIRADICAL ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS FROM *CORNUS MAS* L. AND *CORNUS OFFICINALIS* SIEBOLD & ZUCC. FRUITS AND LEAVES

Andrea Gelo

SUMMARY

In this study, total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity *in vitro* of methanolic extracts of fruits and leaves from six samples of *Cornus mas* L. and one sample of *Cornus officinalis* Siebold & Zucc., Cornaceae, have been investigated. Samples were air-dried, milled and extracted with methanol in an ultrasonic bath. After filtration, organic solvent was removed using a rotary evaporator and the remaining extracts were resuspended in distilled water, frozen and afterward subjected to lyophilization. Total phenolic content and flavonoid content were evaluated spectrophotometrically in aqueous solutions of obtained lyophilizates using the Folin-Ciocalteu method and the AlCl₃ method, respectively. The antioxidant (antiradical) activity was determined using the ABTS and DPPH tests. Pearson's correlation coefficient (*r*) was used to establish the relationships between the measured parameters ($\alpha = 0.05$). Total phenolic content of *C. mas* fruit and leaf extracts ranged from 9.69 ± 0.58 to 16.63 ± 0.26 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry extract (DE) and from 195.32 ± 1.59 to 311.21 ± 1.22 mg GAE/g DE, respectively. Total phenolic contents of *C. officinalis* fruit and leaf extracts were 13.56 ± 0.15 mg GAE/g DE and 286.70 ± 1.90 mg GAE/g DE, respectively. Flavonoid content in fruit extracts of *C. mas* ranged from 0.18 ± 0.04 to 1.07 ± 0.02 mg quercetin equivalent (QE)/g DE, while flavonoid content in leaf extracts ranged from 1.20 ± 0.06 to 4.51 ± 0.22 mg QE/g DE. Flavonoid contents of *C. officinalis* fruit and leaf extracts were 0.42 ± 0.03 and 3.66 ± 0.03 mg QE/g DE, respectively. Very strong negative correlation was observed between total phenolic contents in leaves and fruits of *C. mas* ($r = -0.94$, $P = 0.005$), while very strong positive correlation was observed between leaf and fruit flavonoid contents of *C. mas* ($r = 0.90$, $P = 0.016$). Antiradical activity estimated as IC₅₀ value by the ABTS test of the fruit and leaf extracts of *C. mas* ranged from 52.91 to 179.80 $\mu\text{g/mL}$ and from 3.32 to 5.51 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antiradical activity of the fruit and leaf extracts of *C. officinalis* was 63.08 $\mu\text{g/mL}$ and 3.97 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Antiradical activity estimated as IC₅₀ value by the DPPH test of the fruit and leaf extracts of *C. mas* ranged from 68.64 to 259.16 $\mu\text{g/mL}$ and from 4.53 to 8.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antiradical activity of the fruit and leaf extracts of *C. officinalis* was 141.38 $\mu\text{g/mL}$ and 4.35 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Very strong negative correlation was observed between total phenolic content and antiradical activity of leaves and fruits of investigated species evaluated by the DPPH test ($r = -0.89$, $P < 0.001$) and the ABTS test ($r = -0.80$, $P < 0.001$). The determined values for the *C. officinalis* sample were comparable to those of the *C. mas* samples.

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

Thesis includes: 65 pages, 24 figures, 22 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Cornus mas*, *Cornus officinalis*, total phenolic content, flavonoid content, ABTS, DPPH

Mentor: **Maja Friščić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Friščić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željko Maleš, Ph.D. Full Professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Jakšić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2022.