

Lucija Jagarinec

**Fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje
lista i ploda vrste *Arbutus unedo* L. (Ericaceae)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Maje Bival Štefan.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Maji Bival Štefan na pomoći i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na ljubavi, potpori i razumijevanju tijekom cijelog studija!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1.OPIS BILJNE VRSTE	2
1.2. BIOAKTIVNE SASTAVNICE	3
1.2.1. FENOLNE KISELINE	3
1.2.2. FLAVONOIDI	4
1.2.3. TRJESLOVINE	5
1.2.4. STEROLI I TRITERPENI	6
1.2.5. ANTOCIJANI	7
1.2.6. SAPONINI	8
1.3. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Biljni materijal	13
3.1.2. Kemikalije	13
3.1.3. Laboratorijska aparatura i pribor	15
3.2. ANALIZA BIOAKTIVNIH SASTAVNICA METODOM TANKOSLOJNE KROMATOLOGRAFIJE	16
3.2.1. DOKAZIVANJE FENOLNIH KISELINA I FLAVONOIDA	16
3.2.2. DOKAZIVANJE TRJESLOVINA	17
3.2.3. DOKAZIVANJE SAPONINA	17
3.2.4. DOKAZIVANJE TRITERPENSKIH KISELINA I FITOSTEROLA	17
3.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BIOAKTIVNIH SASTAVNICA	18
3.3.1. ODREĐIVANJE FENOLNIH KISELINA	18
3.3.2. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA	19
3.3.3. ODREĐIVANJE TRJESLOVINA	20
3.3.4. ODREĐIVANJE ANTOCIJANA	22
3.4. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA	23
3.4.1. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI HVATANJA DPPH SLOBODNOG RADIKALA	23
3.4.2. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI HVATANJA RADIKALA DUŠIKOVOG (II) OKSIDA U MIKROTITARSKOJ PLOČICI	24
3.4.3. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI REDUKCIJE ŽELJEZA (Fe³⁺) U ŽELJEZO (Fe²⁺) NA MIKROTITARSKOJ PLOČICI	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. ANALIZA SASTAVNICA TANKOSLOJNOM METODOM	26

4.1.1. Fenolne kiseline.....	26
4.1.2. Flavonoidi	29
4.1.3. Trjeslovine	31
4.1.4. Saponini	32
4.1.5. Triterpenske kiseline i fitosteroli.....	33
4.2. ODREĐIVANJE FENOLNIH KISELINA, FLAVONOIDA, TRJESLOVINA I ANTOCIJANA.....	34
4.2.1. Fenolne kiseline.....	34
4.2.2. Flavonoidi	34
4.2.3. Trjeslovine	35
4.2.4. Antocijani.....	36
4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	37
4.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala	37
4.3.2. Određivanje sposobnosti hvatanja NO na mikrotitarskoj pločici.....	40
4.3.3. Određivanje sposobnosti redukcije željeza (3 ⁺) u željezo (2 ⁺) u mikrotitarskoj pločici	42
5. ZAKLJUČAK	44
6. LITERATURA.....	45
7. SAŽETAK/SUMMARY	48
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Arbutus unedo L. biljka je iz porodice Ericaceae. Nalazi se u zemljama mediteranske klime sa vrućim ljetima i blagim zimama. U Hrvatskoj je poznata pod nazivom maginja, jagodnjak ili obična planika. Bogat fitokemijski sastav daje joj nutritivnu i ljekovitu vrijednost koja je poznata još od davnih vremena pa zbog toga ima relativno široku primjenu u narodnoj medicini. Različiti dijelovi biljke i med koriste se za liječenje velikog broja bolesti (Morgado i sur.,2018). Listovi ove vrste su sirovina s velikom nutritivnom vrijednošću. Nekoliko studija je pokazalo visoku razinu vitamina C i specifičnih fitonutrijenata kao što su : polifenolni spojevi, eterična ulja, terpenoidi i tokoferoli. Listovi i kora bogati su bioaktivnim tvarima kao što su : aromatske kiseline, polifenoli, iridoidi, monoterpeni, steroli, fenilpropani, triterpeni i flavonoidi, što potvrđuje njihovu farmakološku vrijednost (Španjol i sur.,2021).

Plod maginje tradicionalno se koristi kao antiseptik, diuretik i laksativ, a list kao antiseptik za urinarne infekcije, antidijaroik, adstringens, depurativ te je korišten i za liječenje arterijske hipertenzije.

Iz dosadašnjih *in vitro* i prekliničkih istraživanja dokazano je da maginja ima velik farmakološki potencijal zbog svog antibiotskog, antifungalnog, antiparazitskog, antiagregatnog, antidijabetičkog, antihipertenzivnog, protuupalnog, antioksidativnog i spazmolitičkog djelovanja. Međutim, sigurnost primjene nije u potpunosti ispitana. Daljnjim istraživanjima u tom smjeru omogućilo bi se potpuno razumijevanje njezine biološke aktivnosti te utvrdio potencijal za razvoj novih lijekova.

U ovom diplomskom radu obrađen je fitokemijski sastav i ispitano je antioksidativno djelovanje listova i plodova vrste *Arbutus unedo* L.

1.1. OPIS BILJNE VRSTE

Arbutus unedo L. (planika, maginja) pripada porodici Ericaceae (vrijesovi) iz skupine cvjetnica. Ona je samonikla šumska vrsta i voćkarica koja je rasprostranjena na Mediteranu, zapadnoj, srednjoj i južnoj Europi, sjeveroistočnoj Africi (djelomično) te Kanarskim otocima i zapadnoj Aziji. U Hrvatskoj je rasprostranjena u eumediteranskoj vegetacijskoj zoni od Istre do Dubrovačkog primorja kao i na otocima, posebno na srednjedalmatinskim i južnodalmatinskim otocima (Španjol i sur., 2021).

Planika naraste do 9-12 m visine, ali normalno između 1,5 m i 3 m. Kora je ispucala i ljušti se u malim zagasito smeđim pahuljicama. Listovi su naizmjenični, jednostavni, kopljasti, tamno zelena, kožasta i nazubljena ruba, s peteljkom od oko 10 mm. Cvjetovi su hermafroditi, mirisni, bijeli u obliku zvončića s 5 spojenih latica i 10 prašnika. Oni su jako važan izvor nektara i peludi za pčele. Plodovi su kuglasti, hrapave površine, narančastocrveni kada sazriju. Narastu do 2 cm u promjeru, dobivaju konusne papile i sazrijevaju u jesen. Plodovima je potrebno oko 12 mjeseci da sazriju. Proces cvatnje i rasta ploda proteže se od listopada do veljače (Miguel i sur., 2014).

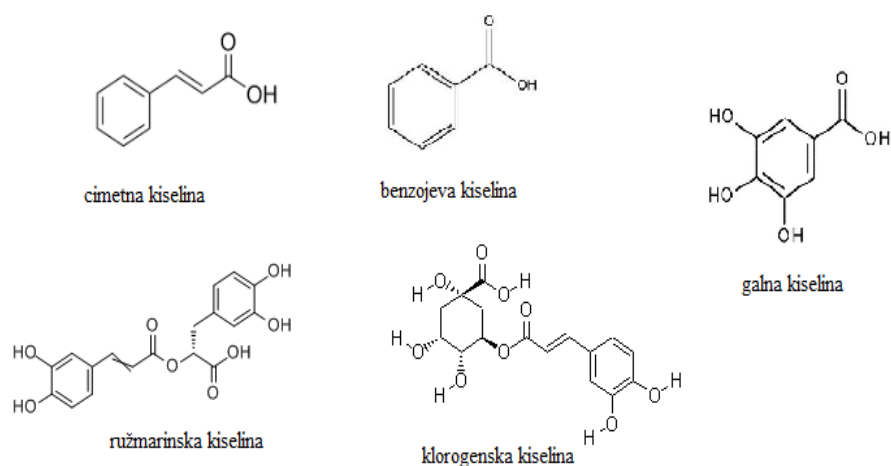


Slika 1. Cvjetovi, listovi i plodovi vrste *Arbutus unedo* L. (preuzeto s : www.agroportal.hr)

1.2. BIOAKTIVNE SASTAVNICE

1.2.1. FENOLNE KISELINE

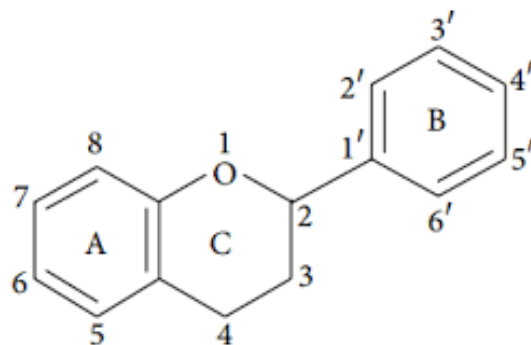
Fenolne kiseline su fenolni spojevi s jednom karboksilnom skupinom. One se dijele u dvije grupe : derivati benzojeve kiseline i derivati cimetine kiseline. Mogu biti u slobodnom obliku, u obliku estera ili glikozida. Cimetna kiselina i njezini derivati su fenilpropani koji nastaju iz aminokiseline fenilalanin. Derivati cimetine kiseline su 4-kumarna, kavena, ferulična i sinapna kiselina. One nastaju u reakcijama hidroksilacije i metilacije (Kumar i Goel, 2019). Najčešći esterificirani oblici su ružmarinska i klorogenska kiselina. Ružmarinska kiselina ester je kavene kiseline i 3,4-dihidrofenilmlječne kiseline. Klorogenska kiselina ester je kavene i kina kiseline. Derivati benzojeve kiseline imaju specifičnu strukturnu osnovicu C₆-C₁. Neki od derivata benzojeve kiseline su : galna kiselina, p-hidroksibenzojeva, vanilinska i protokatehinska kiselina (Vladimir-Knežević, 2019).



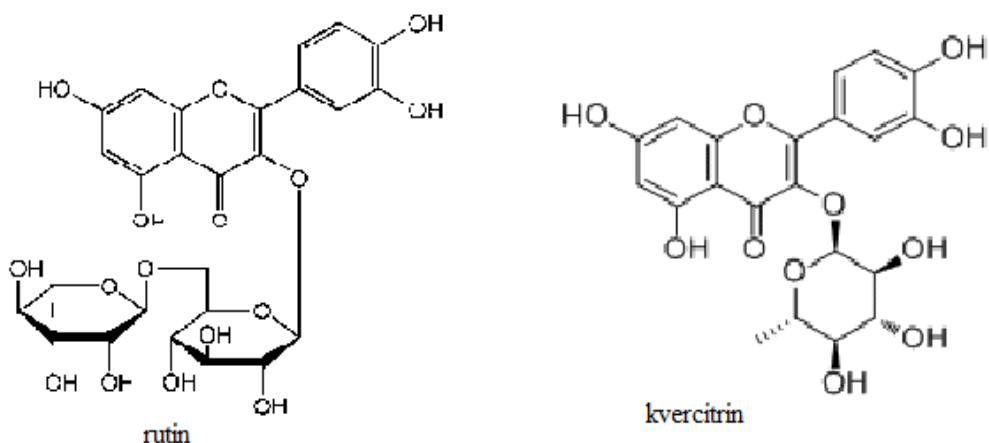
Slika 2. Strukture čestih fenolnih kiselina

1.2.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi su spojevi sa osnovnom strukturom od 2 benzenske jezgre koje su povezane jednim propanskim lancem. Stupanj oksidacije heterocikličkog prstena te broj i položaj hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama daju širok spektar spojeva. U prirodi se najčešće mogu naći : flavoni, flavonoli, flavanoni i izoflavonoidi u glikozidnom obliku. Šećerni dio strukture čine rutinoza, galaktoza, glukoza i ramnoza. Najčešći flavonoidi u biljkama su rutin te kvercitrin, izokvercitrin i hiperozid (Vladimir-Knežević, 2019).



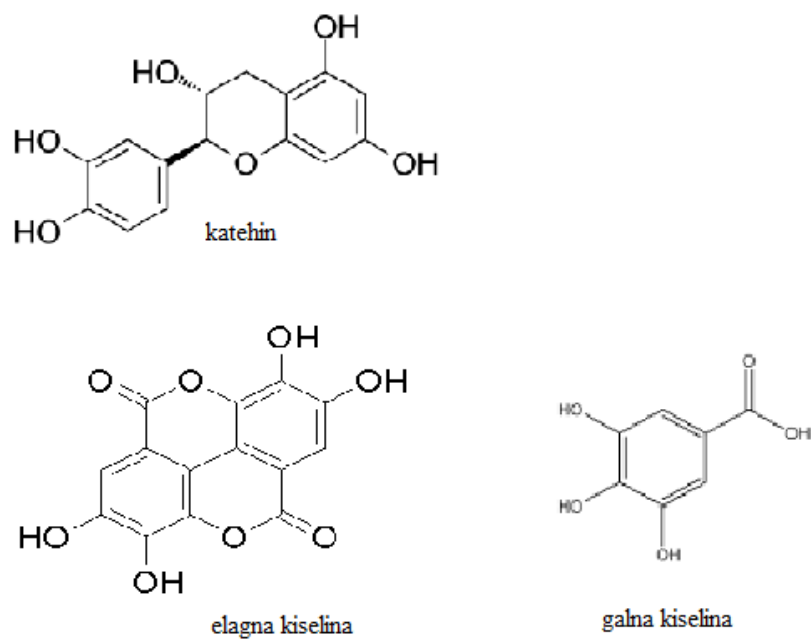
Slika 3. Osnovna struktura flavonoida



Slika 4. Strukture čestih flavonoida

1.2.3. TRJESLOVINE

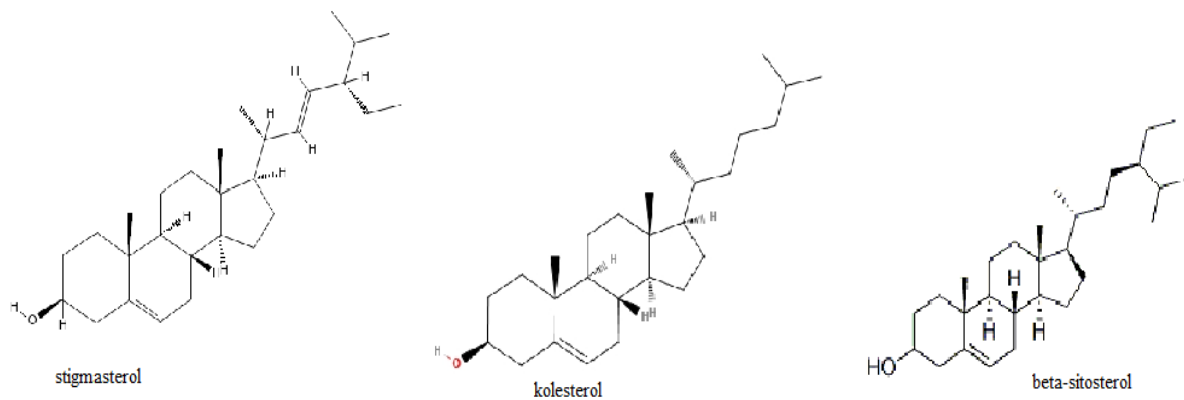
Trjeslovine ili tanini su polifenolni spojevi koji se mogu podijeliti u dvije grupe : kondenzirane trjeslovine i trjeslovine koje hidroliziraju (Vladimir-Knežević,2019). Kondenzirani tanini su spojevi koji nastaju vezanjem flavonoidnih jedinica, a osnovna građevna im je katehin. Tanini koji mogu hidrolizirati su heterogeni polimeri koji sadrže fenolne kiseline, najčešće galnu (galotanini) i elagnu kiselinu (elagtanini) i jednostavne šećere (Vladimir-Knežević, 2008).



Slika 5. Strukturni dijelovi trjeslovina

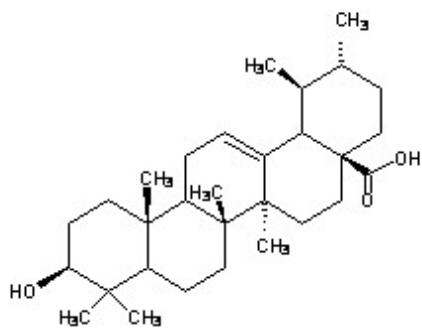
1.2.4. STEROLI I TRITERPENI

Biljni steroli su steroidni alkoholi. Oni imaju sličnu funkciju kao kolesterol kod sisavaca od kojeg se razlikuju po strukturi svog bočnog lanca. Najzastupljeniji su stigmasterol, kampesterol i β -sitosterol (Gylling i sur., 2014).

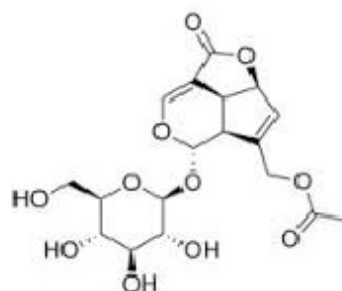


Slika 6. Strukture čestih sterola

Triterpeni pripadaju velikoj skupini prirodnih spojeva koje nazivamo terpenima. Strukturnu osnovicu čini izopren (C_5H_8). Prema broju izoprenskih jedinica mogu se podijeliti u sedam kategorija : hemiterpeni (C_5), monoterpeni (C_{10}), seskviterpeni (C_{15}), diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}), tetraterpeni (C_{40}) i politerpeni (C_n). Hemiterpeni su izopentenil pirofosfati iz kojih se biosintezom formiraju terpenoidi. Najvažnija je pentaciklička struktura triterpena koja uključuje triterpenoidne kiseline kao što su ursolna kiselina i oleanolna kiselina. Mogu se naći u slobodnom ili glikozidnom obliku (Jurišić-Grubešić, 2003).



ursolna kiselina

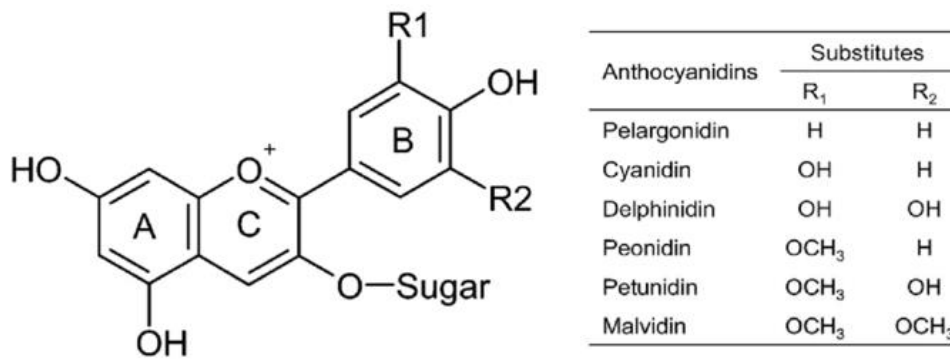


oleanolna kiselina

Slika 7. Strukture triterpenskih kiselina

1.2.5. ANTOCIJANI

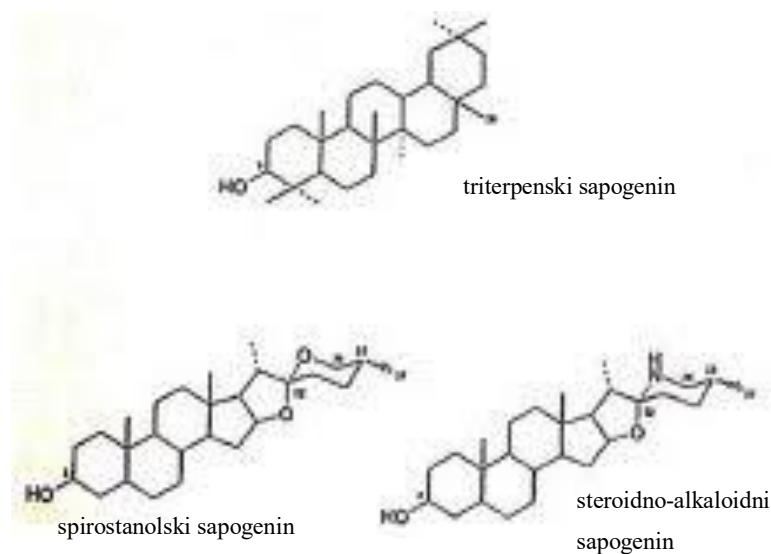
Antocijani (tj. antocijani i antocijanidini) su skupina biljnih pigmenata topljivih u vodi koji se nalaze u raznim dijelovima viših biljaka, većinom u cvijetu i plodu. Ovisno o pH i prisutnosti kelirajućih metalnih iona, oni su intenzivne crvene, plave ili ljubičaste boje. Zato se koriste kao prehrambeni aditivi. Antocijani su derivati 2-fenilbenzopirilija (flavilij kation) te se sastoje od aglikona (antocijanidin), šećera i često acilne skupine. Identificirano je više od 500 različitih struktura (Domitrović, 2011).



Slika 8. Strukture raznih antocijana

1.2.6. SAPONINI

Saponini su glikozidni spojevi građeni od aglikonskog dijela (sapogenina) i šećerne komponente koja je vezana na C-3 hidroksilnu skupinu aglikona. Dijele se u tri skupine ovisno o vrsti aglikona : spirostanolski sapogenini, steroidno-alkaloidni sapogenini i triterpenski sapogenini. Šećeri koji ulaze u strukturu su : glukoza, galaktoza, arabinoza, ksiloza, riboza, fukoza, ramnoza te D-glukuronska kiselina i D-galakturonska kiselina. Saponini su tvari koje imaju visoku moć pjenjenja kao sapuni (Jurišić-Grubešić, 2003).



Slika 9. Strukture aglikona saponina (Šošević,2012)

1.3. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA

Zbog svog bogatog fitokemijskog sastava, planika (maganja) je predmet mnogih *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se dokazali razni farmakološki učinci i utvrdio njen farmakoterapijski potencijal.

Antidijabetički učinak ekstrakta korijena *Arbutus unedo* L. ispitan je na štakorima oralnim testom tolerancije glukoze (OGTT) i intravenskim testom tolerancije glukoze (IVGTT). Oralna primjena ekstrakta (500 mg/kg tjelesne težine) rezultirala je značajnim sniženjem šećera u krvi nakon preopterećenja glukozom, ali taj učinak nije zabilježen kod IVGTT. Ekstrakt *Arbutus unedo* L. također je pokazao značajno smanjenje apsorpcije glukoze u crijevima, što može djelomično opravdati smanjenje glukoze u krvi uočeno u OGTT modelu (Haouari i sur., 2021). Korijen sadrži mnoge biaktivne spojeve kao što su : kvercetin, galnu kiselinu, etil-galat, arbutozid, epikatehin, katehin i hipericin. Neke studije su pokazale da kvercetin, etil galat i arbutozid uzrokuju sniženje glukoze u krvi pa se antidijabetički učinak može povezati sa prisustvom baš tih spojeva (Morgado i sur., 2018).

U jednoj studiji ispitani su ekstracelularni i intracelularni antimikrobni učinci vodenih i etanolnih ekstrakata listova *Arbutus unedo* L. za tri mikobakterije : *Mycobacterium bovis*, *M. smegmatis* i *M. aureus*. Rezultati su pokazali da ispitivani ekstrakti imaju izvanstaničnu antimikobakterijsku aktivnost prema svim trima mikobakterijama. Etanolni ekstrakt pokazuje potencijal za intracelularno antimikrobno djelovanje protiv *M. smegmatis* (Haouari i sur., 2021). Isto tako, ekstrakt lista djeluje na gram-pozitivne bakterije poput *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* i klinički meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus* i na gram-negativne bakterije kao što su : *Klebsiella pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* te *Pseudomonas aeruginosa*. U drugom istraživanju ispitana su antimikrobna svojstva ekstrakata lista, stabljike i korijena na nekoliko vrsta mikroorganizama u ovisnosti o sadržaju monoterpena. Ekstrakt lista sadržavao je oko 30,7% monoterpena, a ekstrakt stabljike oko 21,9% monoterpena. Smatra se da su monoterpeni djelomično odgovorni za antibakterijsko djelovanje jer ekstrakt korijena nije sadržavao monoterpenske spojeve i nije imao antibakterijsko djelovanje. Monoterpeni lako difundiraju te oštećuju strukturu stanične membrane (Morgado i sur., 2018).

Antihipertenzivni učinci ekstrakta *Arbutus unedo* L. također bi se mogli povezati s polifenolnim spojevima za koje je poznato da potiču djelovanje enzima endotelna sintaza dušikovog oksida. U jednom istraživanju kondenzirani tanini istaloženi su i uklonjeni iz ekstrakta lista te se vazodilatacijska aktivnost smanjila u odnosu na ekstrakt kojem tanini nisu uklonjeni. Metanolni ekstrakt analiziran je je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti. Nakon analize sastava najjaktivnijih frakcija, identificirani su oligomerni kondenzirani tanini i katehin galat pa im se pripisuje vazodilatacijsko djelovanje (Morgado i sur.,2018).

Antiagregacijsko djelovanje različitih ekstrakata lista *Arbutus unedo* L. ispitano je nakon inkubacije s čistim trombocitima. Agregacija je bila potaknuta dodatkom 0,5 U/mL trombina. Metanolni i etil-acetatni ekstrakt pokazali su nešto izraženije antiagregacijsko djelovanje od vodenog i ekstrakta diklormetana. To djelovanje posljedica je prisustva tanina i flavonoida (Mekhfi i sur., 2006).

Antioksidacijska aktivnost biomolekula posljedica je hvatanja, tj. inhibiranja radikala koji oštećuju stanice. Skupine biomolekula s jakim antioksidativnim djelovanjem su vitamini (vitamin C), pigmenti kao što su karotenoidi i polifenolni spojevi poput antocijana i flavonoida. (Žlabur i sur., 2020). U jednom istraživanju s etanolnim i metanolnim ekstraktima listova *Arbutus unedo* L. antioksidacijsko djelovanje ispitano je hvatanjem kationa radikala ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina). Nakon fitokemijske analize dokazano je prisustvo tanina i flavonolnih glikozida (Pabuccuoglu i sur., 2003). U drugoj studiji su Kachkoul i suradnici analizirali antioksidacijsku sposobnost vodenih i etanolnih ekstrakata lista *Arbutus unedo* L. korištenjem DPPH radikala i FRAP metodom (redukcija željeza iz 3⁺ u 2⁺). Utvrđeno je da etanolni ekstrakt ima veći antioksidativni kapacitet od vodenog ekstrakta. Vrijednosti IC₅₀ u prvoj metodi su 76,14 ± 0,91 µg/mL i 202,64 ± 5,77 µg/mL, a u drugoj 53,77 ± 0,81 µg/mL i 236,86 ± 31,90 µg/mL (Haouari i sur., 2021).

Budući da je broj ljudi oboljelih od raka sve veći, mnogi znanstvenici bave se istraživanjem i sintezom novih lijekova protiv raka. Biljne vrste izvor su različitih ljekovitih tvari te im se ispituje i antikancerogeni potencijal. U jednoj studiji to svojstvo ispitano je u uzorcima meda različitih biljaka, između ostalog i uzorka meda *Arbutus unedo* L. U istraživanju je korištena HCT linija stanica kolonorektalnog raka i MCF linija stanica raka dojke. Citostatsko, tj. antiproliferativno djelovanje meda planike potvrđeno je pri necitotoksičnoj koncentraciji od 2000 µg/mL. Mnogi autori su pokazali da liječenje MCF stanica s medom izaziva inhibiciju

rasta stanica na razne načine poput antagoniziranja aktivnosti estrogena, izazivanja apoptoze i smanjenja potencijala mitohondrijske membrane. Citostatsko djelovanje povezuje se s fenolnim kiselinama kao što su : siringinska kiselina, taninska kiselina, kafeinska kiselina, ferulična kiselina, kumarinska kiselina, galna kiselina i ružmarinska kiselina koje imaju antioksidativni kapacitet za uklanjanje slobodnih radikala (Imtara i sur., 2019).

Protuupalno djelovanje većinom se proučava na životinjskim modelima. U jednoj studiji upala je izazvana injektiranjem karagenana, polisaharida iz crvenih morskih algi, u pleuralnu šupljinu miša što je dovelo do povišenja koncentracija medijatora upale (interleukina -16, interleukina-1 i tumor-nekrotizirajućeg faktora-alfa) u eksudatu. U rezultatima navedene studije uočeno je smanjenje koncentracije proupalnih citokina u eksudatima miševa koji su prije injektiranja bili tretirani vodenim ekstraktom *Arbutus unedo* L. To nas dovodi do zaključka da su razne polifenolne sastavnice uključene u inhibiciju upalnih procesa (Mariotto i sur., 2008).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Svrha ovog eksperimentalnog rada bila je analizirati i kvantificirati fitokemijske sastavnice lista i ploda biljke *Arbutus unedo* L. Budući da se koristi za različite terapijske probleme, ispitan je i njezin antioksidativni kapacitet koji se većinom povezuje sa fenolnim sastavicama.

Za identifikaciju bioaktivnih tvari: fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina, fitosterola, triterpenskih kiselina i saponina korištena je prikladna metoda tankoslojne kromatografije. Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina i antocijana određen je spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijsko djelovanje ispitano je spektrofotometrijskim određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala, sposobnosti hvatanja NO radikala i sposobnosti redukcije željeza (3^+) u željezo (2^+).

Na osnovu dobivenih rezultata moguće je povezati djelovanje sa specifičnim sastavnicama lista i ploda planike te u konačnici utvrditi njenu fitoterapijsku vrijednost.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovoga rada korišteni su plodovi i listovi vrste *Arbutus unedo* L. sakupljeni 2020. godine u okolici Pule.

3.1.2. Kemikalije

Za kvalitativno dokazivanje fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina, saponina, triterpenskih kiselina i fitosterola tankoslojnom kromatografijom upotrebljeni su :

- diizopropileter (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- mravlja kiselina 98-100% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- 2-aminoetil-difenilborat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- etanol 96% (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska)
- etilformijat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- željezov (III) klorid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- kloroform (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- anisaldehyd (Fluka, Buchs, Švicarska)
- koncentrirana sulfatna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ledena octena (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- diklormetan (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Za kvantitativno određivanje flavonoida upotrebljeni su :

- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kloridna kiselina 37% (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)

- aluminijev (III) klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina $\geq 99,5\%$ (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- bezvodni natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Za kvantitativno određivanje fenolnih kiselina upotrebljeni su :

- etanol 96% (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- kloridna kiselina 37% (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- natrijev nitrit (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Za kvantitativno određivanje trjeslovina upotrebljeni su :

- natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)

Za kvantitativno određivanje antocijana upotrebljeni su :

- kloridna kiselina 37% (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)

Za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala upotrebljeni su :

- etanol 96% (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)

Za određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog (II) oksida upotrebljeni su :

- fosfatom puferirana otopina soli, PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- Na-nitroprusid (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- 85%-tna fosforna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Sulfanilamid (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- (1-naftil)etilendiamin dihidroklorid, NED (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)

Za određivanje sposobnosti redukcije željeza (Fe^{3+}) u željezo (Fe^{2+}) upotrijebljeni su :

- 0,2M fosfatni pufer (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev heksacijanoferrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- trikloroocetna kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)
- željezov (III) klorid (Fluka, Buchs, Švicarska)

3.1.3. Laboratorijska aparatura i pribor

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- električni mlinac (Braun)
- silikagel 60 F₂₅₄ ploče za tankoslojnu kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar (γ -Helios Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ultrazvučna kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- rotacijski vakuum uparivač (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- mikrotitarske pločice (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- čitač mikrotitarskih pločica Cromate (Midwest Scientific, Fenton, Velika Britanija)

3.2. ANALIZA BIOAKTIVNIH SASTAVNICA METODOM TANKOSLOJNE KROMATOGRAFIJE

Biljni materijal (plodovi i listovi) očišćen je, osušen i smrvljen električnim mlincem. 1 g jednog i drugog uzorka ekstrahiran je 10 minuta sa 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 70°C, uz povratno hladilo. Filtrati su korišteni kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina, saponina, triterpenskih spojeva i fitosterola. TLC analize provedene su na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄. Ispitivane otopine (20 µL) i otopine standarda (10 µL) nanese su linijski pomoću kapilare.

3.2.1. DOKAZIVANJE FENOLNIH KISELINA I FLAVONOIDA

Otopine standardnih fenolnih kiselina (klorogenska i ružmarinska kiselina) i flavonoidnih glikozida (kvercitrin, izokvercitrin i rutin) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05%.

Za ispitivanje fenolnih kiselina korištena je pokretna faza : diizopropileter-aceton-mravljja kiselina u volumnom omjeru 5:3:1:1.

Za ispitivanje flavonoidnih glikozida korištena je pokretna faza : etilacetat-mravljja kiselina-voda u volumnom omjeru 8:1:1.

Detekcija se vršila promatranjem pod UV svjetlom na 254 nm i prskanjem ploče sa modificiranim Naturstoff-reagensom (1%-tna metanolna otopina 2-aminoetildifenilborata i 5%-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000, NST/PEG) pa promatranjem pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner,2015)

3.2.2. DOKAZIVANJE TRJESLOVINA

Otopina standardnih trjeslovina (galna kiselina) pripravljena je otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05%.

Za ispitivanje trjeslovina korištena je pokretna faza : etilformijat-mravlja kiselina-voda u volumnom omjeru 8:1:1.

Detekcija se vršila prskanjem ploče sa 10%-tnom vodenom otopinom željezovog (III) klorida i promatranjem na vidljivom svjetlu (Wagner, 2015).

3.2.3. DOKAZIVANJE SAPONINA

Otopina standardnih saponina pripravljena je otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05%.

Za ispitivanje saponina korištena je pokretna faza : kloroform-metanol-voda u volumnom omjeru 64:50:10.

Detekcija se vršila prskanjem ploče sa anisaldehyd-sumpnom kiselinom (0,5 mL anisaldehyda pomiješano s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL sulfatne kiseline), sušenjem na 100-105°C i promatranjem na vidljivom svjetlu (Wagner, 2015).

3.2.4. DOKAZIVANJE TRITERPENSKIH KISELINA I FITOSTEROLA

Otopine standardnih triterpenskijh spojeva i fitosterola (stigmasterol i β -sitosterol) pripravljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05%.

Za ispitivanje triterpenskijh spojeva i fitosterola korištena je pokretna faza : diklormetan-etilacetat u volumnom omjeru 9:1.

Detekcija se vršila prskanjem ploče sa anisaldehyd-sumpnom kiselinom (0,5 mL anisaldehyda pomiješano s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL sulfatne kiseline), sušenjem na 100-105°C i promatranjem na vidljivom svjetlu (Wagner, 2015).

3.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BIOAKTIVNIH SASTAVNICA

3.3.1. ODREĐIVANJE FENOLNIH KISELINA

Sadržaj fenolnih kiselina određuje se spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (EDQM 2019).

Ekstrakt :

0,200 (ili 0,300) g usitnjenog suhog biljnog materijala (plodovi / listovi) ekstrahira se s 80 (95) mL 50%-tnog etanola zagrijavanjem 30 minuta u tikvici na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja uzorak se filtrira, a filtrat se u odmjernoj tikvici razrijedi 50%-tnim etanolom do 100,00 mL.

Ispitivana otopina :

1 mL dobivenog ekstrakta prebaci se u odmjernu tikvicu od 10 mL te se u nju doda: 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa i 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica se zatim nadopuni do oznake destiliranom vodom.

Poredbena otopina :

Ako se udio fenolnih kiselina izražava kao ružmarinska kiselina, 1,0 mL ekstrakta se razrijedi destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Ako se udio fenolnih kiselina izražava kao klorogenska kiselina, 1,0 mL ekstrakta pomiješa se s 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline i 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida te razrijedi destiliranom vodom do 10 mL. Odmah se izmjeri apsorbancija ispitivanih otopina na 505 nm u odnosu na ružmarinsku kiselinu kao poredbenu otopinu ili na 525 nm u odnosu na klorogensku kiselinu kao poredbenu otopinu.

Račun :

Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata), izražen kao klorogenska kiselina, izračunat je prema izrazu :

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 5,3}{m}$$

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 525 nm, a m je masa droge (g). Za određivanje je korištena specifična apsorbancija klorogenske kiseline na 525 nm koja iznosi 188.

Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata), izražen kao ružmarinska kiselina, izračunat je prema izrazu :

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

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm, a m je masa droge (g). Za određivanje je korištena specifična apsorbancija ružmarinske kiseline na 505 nm koja iznosi 400.

3.3.2. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA

Sadržaj flavonoida određuje se spektrofotometrijskom metodom iz Europske farmakopeje (EDQM 2019).

Ekstrakt :

0,600 g usitnjenog suhog biljnog materijala (plodovi / listovi) stavi se u tikvicu okruglog dna od 100 mL. Doda se 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L). Sadržaj tikvice zagrijava se 30 minuta na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Potom se sadržaj tikvice filtrira preko malo pamuka, a ostatak biljne droge u tikvici i na pamuku (zajedno s pamukom) ponovo se ekstrahira dva puta s po 20 mL acetona, zagrijavanjem kroz 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati filtriraju se preko filter papira uz ispiranje tikvice i filter-papira u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te se otopina razrijedi acetonom do oznake. 20,0 mL acetonskog ekstrakta prenese se u lijevak za odjeljivanje i pomiješa s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku mućka se s 15 mL etilacetata, a zatim tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjeni etilacetatni ekstrakti dodatno se isperu u lijevku za odjeljivanje dva puta s po 50 mL vode. Na kraju se etilacetatni ekstrakti filtriraju preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL i razrijede etilacetatom do oznake.

Ispitivana otopina :

10,0 mL dobivenog ekstrakta prebaci se u odmjernu tikvicu od 25 mL. Zatim se u tikvicu doda 1,0 mL reagensa aluminijevog klorida. Na kraju se doda 5%-tna metanolna otopina octene kiseline do oznake.

Poredbena otopina :

10,0 mL dobivenog ekstrakta razrijedi se do 25,0 mL s 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline.

Apsorbancija ispitivane otopine mjeri se nakon 30 min na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu.

Račun :

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

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

uzevši u obzir da je na 425 nm specifična apsorbancija izokvercetrozida 500, A apsorbancija ispitivane otopine i m masa droge (g).

3.3.3. ODREĐIVANJE TRJESLOVINA

Sadržaj trjeslovina određuje se spektrofotometrijskom metodom iz Europske farmakopeje (EDQM 2019).

Ekstrakt :

1,000 g praškasto usitnjene biljne droge (plodovi / listovi) prelije se u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode i ekstrahira 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja pod tekućom vodom, dobiveni ekstrakt kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu i razrijedi vodom do 250 mL. Potom se čeka da se čestice istalože. Ekstrakt se zatim profiltrira preko filter-papira, a prvih 50 mL filtrata se odbaci.

Ispitivana otopina - ukupni polifenoli :

5,0 mL filtrata je potrebno razrijediti vodom do 25,0 mL, a zatim 2,0 mL te otopine u odmjernoj tikvici od 25,0 mL pomiješati s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode. Sadržaj tikvice nadopuni se otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (ZERO BASE).

Ispitivana otopina – netaninski polifenoli :

U 10,0 mL filtrata doda se 0,10 g kožnog praška te se sadržaj tikvice snažno mućka 60 minuta na laboratorijskoj tresilici. Potom se sadržaj tikvice filtrira, a 5,0 mL dobivenog filtrata se razrijedi vodom do 25 mL. Zatim se 2,0 mL te otopine u odmjernoj tikvici od 25,0 mL pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa te nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu.

Poredbena otopina :

50,0 mg pirogalola se u odmjernoj tikvici od 100,0 mL otopi u vodi. Zatim se 5,0 mL dobivene otopine razrijedi vodom do 100,0 mL. 2 mL te otopine se u odmjernoj tikvici od 25,0 mL pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode te nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu.

Račun :

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

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

gdje je na 760 nm m_1 masa ispitivanog uzorka (g), m_2 masa pirogalola (g), A_1 apsorbancija uzorka s ukupnim polifenolima, A_2 apsorbancija uzorka s polifenolima neadsorbiranim na kožni prašak te A_3 apsorbancija pirogalola.

3.3.4. ODREĐIVANJE ANTOCIJANA

Sadržaj antocijana određuje se spektrofotometrijskom metodom iz Europske farmakopeje (EDQM 2019).

Ekstrakt :

5,00 g praškasto usitnjene biljne droge (plodovi / listovi) pomiješa se u Erlenmayerovoj tikvici s 95 mL metanola. Potom se ekstrahira mehaničkim mućkanjem tijekom 30 min i u ultrazvučnoj kupelji 10 min. Dobiveni ekstrakt filtrira se u tikvicu od 100,0 mL, filter-papir se ispere te se tikvica nadopuni metanolom do oznake. Dobivena otopina razrijedi se 50 puta s 0,1 %-tnom otopinom kloridne kiseline u metanolu (V / V). Apsorbancija se mjeri na 528 nm, dok je 0,1%-tna otopina kloridne kiseline u metanolu poredbena otopina (ZERO BASE).

Račun :

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

$$\% \text{ antocijana} = \frac{A \times 5000}{718 \times m}$$

gdje na 528 nm specifična apsorbancija cijanidin-3-glukozid klorida iznosi 718, A je apsorbancija ispitivane otopine i m masa droge (g).

3.4. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA

3.4.1. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI HVATANJA DPPH SLOBODNOG RADIKALA

Potrebno je pripremiti ekstrakt na sljedeći način :

5,00 g usitnjenih plodova / listova ispitivane biljke prelije se s otapalom (70%-tni etanol) u omjeru 1:10. Potom se vrši ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 min. Nakon filtriranja, uzorku se ponovo doda isto otapalo u istom volumenu. Ekstrakcija se ponavlja pod prethodno navedenim uvjetima. Dobiveni filtrati sjedine se i upare do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača pri 50°C.. Tikvica s ekstraktom ostavi se u eksikatoru još jedan dan i onda se važe. Dobiveni suhi ekstrakt čuva se u hladnjaku na 4°C i koristi za ispitivanje antioksidacijskog učinka.

U epruветama se pripremi niz serijskih razrijeđenja uzorka u 1,5 mL 96%-tnog etanola tako da konačne koncentracije uzorka budu u rasponu koncentracija 0,2-100 µg/mL. U kontrolne epruветe umjesto uzorka stavi se 1,5 mL 96%-tnog etanola. Određivanje se provodi u duplikatu. U svaku se epruветu doda po 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH radikala primjenom repetitivne pipete. Reakcijska smjesa inkubira se pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu tijekom 30 min. Apsorbancija se mjeri na 517 nm, uz 96%-ni etanol kao slijepu probu. Ako u uzorci obojani (obično u prvih nekoliko epruветa), u epruветu s 1,5 mL uzorka doda se 0,5 mL 96%-tnog etanola i izmjeri apsorbancija na 517 nm. Sva mjerenja su rađena u triplikatu (Vladimir-Knežević i sur., 2011).

Račun :

Sposobnost hvatanja DPPH radikala, izražena u postotcima, izračuna se prema sljedećem izrazu :

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

gdje je A_0 apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (etanola), a A_1 je apsorbancija ispitivane otopine umanjena za apsorbanciju samog uzorka.

3.4.2. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI HVATANJA RADIKALA DUŠIKOVOG (II) OKSIDA U MIKROTITARSKOJ PLOČICI

Pripremi se niz koncentracijskih razrijeđenja uzorka u 80 μL prikladnog otapala – s kojim je pripremljen ekstrakt tako da konačne koncentracije uzorka u reakcijskoj smjesi budu u rasponu koncentracija 6,25 – 400 $\mu\text{g/mL}$. U kontrolne jažice se umjesto uzorka stavi 80 μL prikladnog otapala (etanol). Određivanje se provodi u duplikatu. U svaku jažicu doda se 80 μL otopine Na-nitroprusida u PBS-u (0,01 Mm, pH 7,4) te se sadržaj promiješa. Reakcijska smesa inkubira se na sobnoj temperaturi tijekom 120 min pod svjetlom. Nakon inkubacije doda se jednaki volumen (80 μL) Griessovog reagensa (1% sulfanilamid, 0,1% NED i 2,5% fosforne kiseline). Prvo se doda 40 μL 1% otopine sulfanilamida u fosfornu kiselinu, nakon 5 min 40 μL 0,1% otopine NED-a te se sadržaj promiješa. Odmah nakon dodatka NED-a apsorbancija se mjeri na 577 nm, u odnosu na slijepu probu koja sadrži 80 μL Na-nitroprusida (10 mM) u PBS-u, 80 μL otapala (etanola), 40 μL 1% otopine sulfanilamida u fosfornoj kiselini i 40 μL 0,1% otopine NED-a (Awah i Verla, 2010).

Račun : Sposobnost hvatanja NO radikala, izražena u postotcima, izračuna se prema sljedećem izrazu :

$$\% \text{ NO antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje je A_0 apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (etanola), a A_1 je apsorbancija ispitivane otopine umanjena za apsorbanciju samog uzorka.

3.4.3. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI REDUKCIJE ŽELJEZA (Fe³⁺) U ŽELJEZO (Fe²⁺) NA MIKROTITARSKOJ PLOČICI

U jažicama mikrotitarske pločice pripremi se niz serijskih razrjeđenja u 80 µL prikladnog otapala (70% etanol) tako da konačne koncentracije uzorka budu u rasponu 0,3125 – 40 µg/mL. U svaku jažicu doda se po 100 µL fosfatnog pufera (0,2M, pH 6) zatim po 100 µL 1%-tne otopine kalijeva heksacijanoferata. Reakcijska smjesa inkubira se 20 min u termostatu na 50 °C. U smjesu se doda 100 µL 10%-tne otopine trikloroctene kiseline (po potrebi centrifugirati) koja se potom inkubira 10 min. Uzme se 125 µL bistrog supernatanta i prebaci iz prethodnog reda u odgovarajuću jažicu novog reda te se pomiješa sa 125 µL destilirane vode i 25 µL 0,1%-tne otopine željezovog (III) klorida. Apsorbancija se mjeri na 700 nm (El Jemli i sur., 2016).

Račun :

Iz odnosa izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih koncentracija uzoraka linearnom ekstrapolacijom se odrede koncentracije ispitivanih uzoraka koje su uzrokovale apsorbanciju od 0,5 (odgovara 50%-tnoj redukcijskoj moći (IC₅₀)).

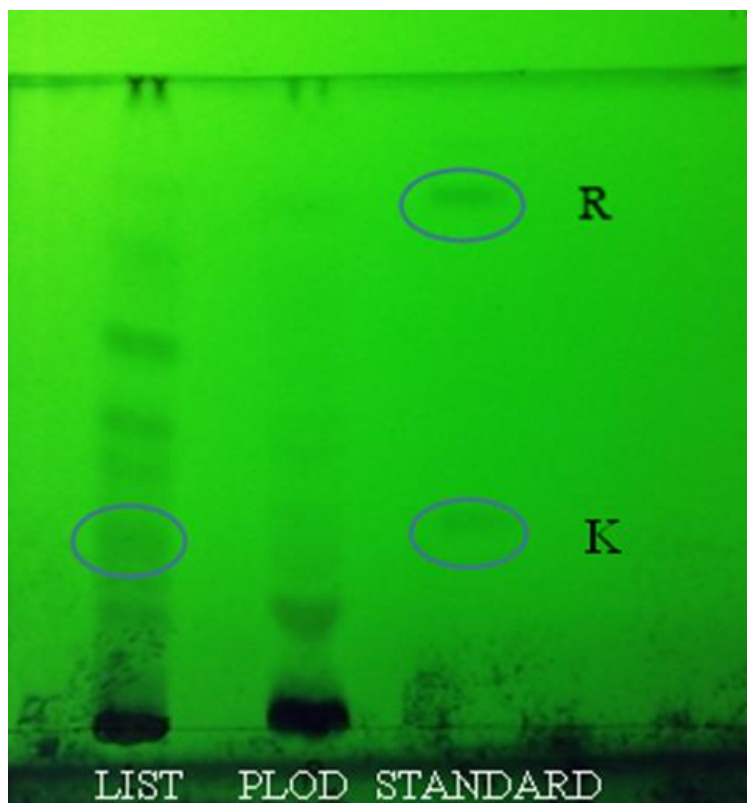
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ANALIZA SASTAVNICA TANKOSLOJNOM METODOM

Tankoslojnom kromatografijom kvalitativno je analiziran sastav lista i ploda biljke *Arbutus unedo* L. Kao nepokretna faza korištena je silikagel ploča. Sastavnice su nošene pokretnom fazom – smjesom prikladnih otapala u određenim volumnim omjerima. Detekcija je vršena na vidljivom svjetlu ili pod UV lampom prije i nakon prskanja na zraku osušenih ploča određenim reagensom, tj. na vidljivom svjetlu nakon prskanja ploče određenim reagensom i zagrijavanja 5-10 min na 100 -105°C. Uspoređivan je redosljed i boje odijeljenih zona poredbene i ispitivane otopine te je tako ustanovljena prisutnost poredbenih tvari u ispitivanom uzorku. Rezultat je prikazan kao R_f vrijednost – omjer udaljenosti koju prijeđe tvar i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza.

4.1.1. Fenolne kiseline

Na silikagel ploču nanoseni su metanolni ekstrakti uzorka te je kao pokretna faza korištena smjesa diizopropiletera, acetona, mravlje kiseline i vode u omjeru 5 : 3 : 1 : 1. Detekcija je provedena nakon prskanja ploče sa Naturstoff reagensom pod UV lampom na 254 nm i 365 nm. Korištene su poredbene sastavnice ružmarinska kiselina i klorogenska kiselina. U uzorku lista vidljive su zone koje bojom i R_f vrijednošću odgovaraju R_f vrijednostima klorogenske i ružmarinske kiseline. U uzorku ploda identificirana je samo ružmarinska kiselina (Slika 10. i 11.).

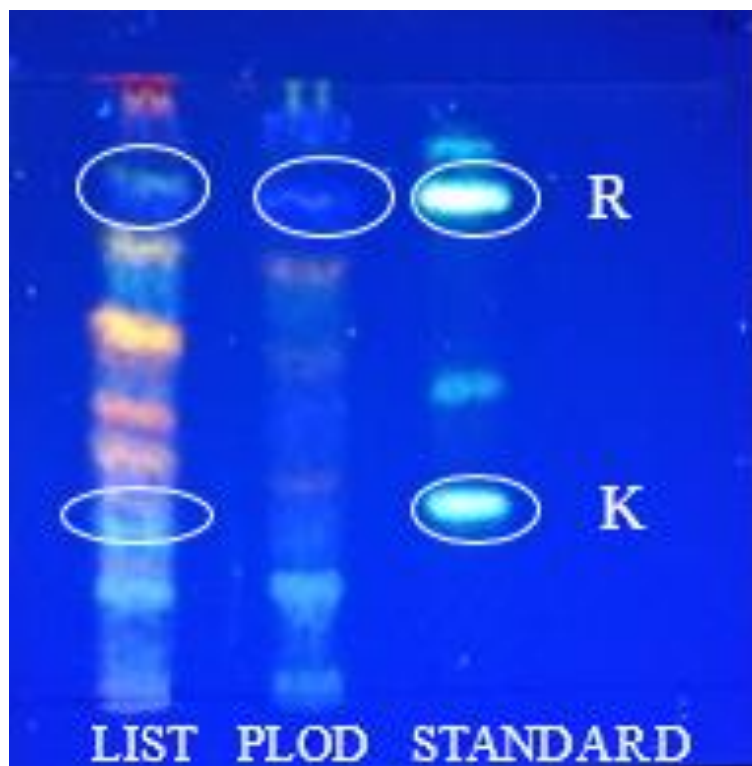


Slika 10. Gašenje fluorescencije na kromatogramu fenolnih kiselina lista i ploda maginje
R-Ružmarinska kiselina, $R_f = 0,8$; K-Klorogenska kiselina, $R_f = 0,3$

Stacionarna faza : Kiesel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza : diizopileter-aceton-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)

Detekcija : NST + PEG, UV lampa na 254nm



Slika 11. Kromatogram fenolnih kiselina lista i ploda maginje

R-Ružmarinska kiselina, $R_f = 0,8$; K-Klorogenska kiselina, $R_f = 0,3$

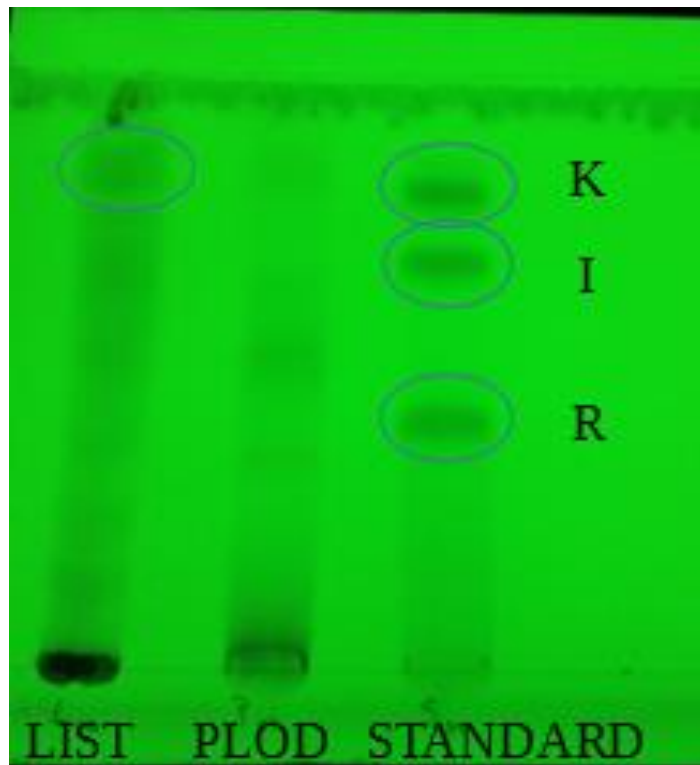
Stacionarna faza : Kiesel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza : diizopropileter-aceton-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)

Detekcija : NST + PEG, UV lampa na 365nm

4.1.2. Flavonoidi

Metanolni ekstrakti uzorka nanoseni su na silikagel ploču. Pokretna faza u ovom ispitivanju je smjesa etilacetata, mravlje kiseline i vode u omjeru 8 : 1 : 1. Nakon prskanja sa Naturstoff - reagensom ploča je promatrana pod UV lampom na 254 nm i 365 nm. Kod ploda nije zapažena nijedna zona koja bi odgovarala korištenim poredbenim otopinama (kvercitrin, izokvercitrin i rutin). Kod lista je vidljiva narančasta zona koja i po R_f odgovara kvercitrinu. Prisutnost izokvercitrina u listu ne može se sa sigurnošću identificirati (Slika 12. i 13.).



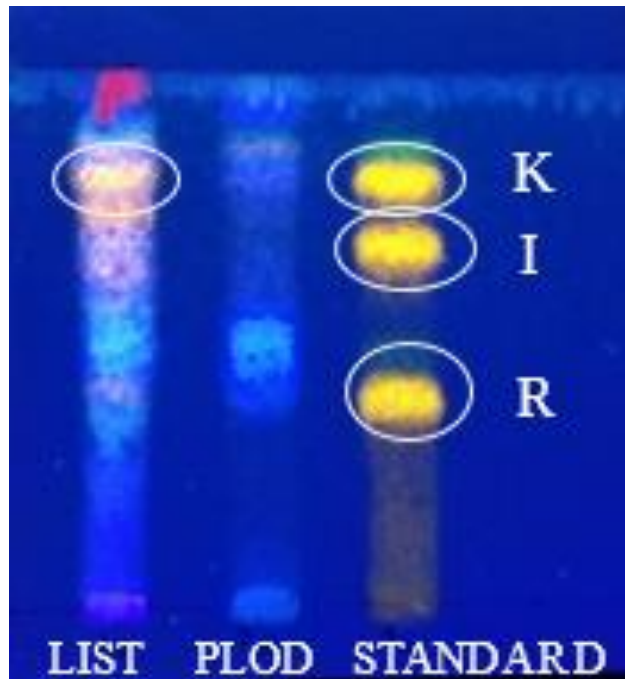
Slika 12. Gašenje fluorescencije na kromatogramu flavonoida lista i ploda maginje

K-Kvercitrin, $R_f = 0,81$; I-Izokvercitrin; R-Rutin

Stacionarna faza : Kiesel 60 F_{254} TLC ploča

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

Detekcija : NST + PEG, UV lampa na 254nm



Slika 13. Kromatogram flavonoida lista i ploda maginje

K-Kvercitrin, $R_f = 0,81$; I-Izokvercitrin; R-Rutin

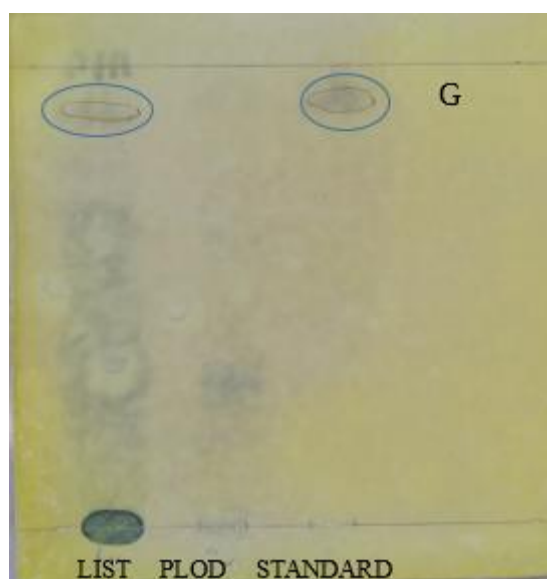
Stacionarna faza : Kiesel 60 F₂₅₄ TLC ploča

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

Detekcija : NST + PEG, UV lampa na 365nm

4.1.3 Trjeslovine

Ekstrahiran uzorak lista i ploda maginje nanesen je na ploču silikagela, a za pokretnu fazu korištena je smjesa etilformijata, mravlje kiseline i vode u volumnom omjeru 8 : 1 : 1. Identifikacija je omogućena nakon prskanja sa reagensom 10%-tnom otopinom vodenom otopinom FeCl_3 . Kod uzorka lista vidljiva je mrlja koja prema R_f vrijednosti odgovara korištenom standardu galne kiseline. Trjeslovine u uzorku ploda nisu identificirane (Slika 14.).



Slika 14. Kromatogram trjeslovina lista i ploda maginje

G-Galna kiselina, $R_f = 0,9$

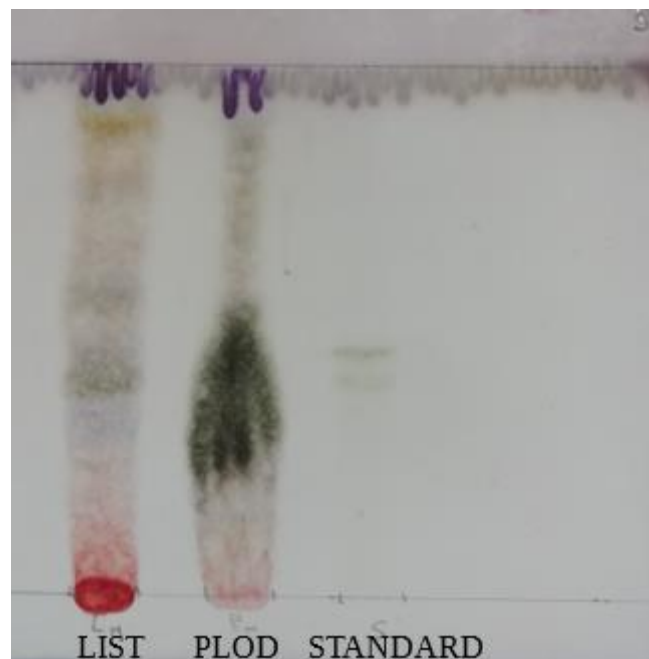
Stacionarna faza : Kiesel 60 F_{254} TLC ploča

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

Detekcija : FeCl_3 , Vis

4.1.4. Saponini

Na silikagel ploču nanese su metanolni ekstrakti lista i ploda maginje. Pokretna faza je smjesa otapala kloroforma, metanola i vode u volumnom omjeru 64 : 50 : 10. Za detektiranje odijeljenih sastavnica korištena je otopina anisaldehyd-sumporne kiseline. Nakon prskanja i sušenja na 100-105°C u uzorku lista i ploda nema vidljivih mrlji, tj. nije zabilježena detekcija saponinskog standarda (Slika 15.).



Slika 15. Kromatogram saponina lista i ploda maginje

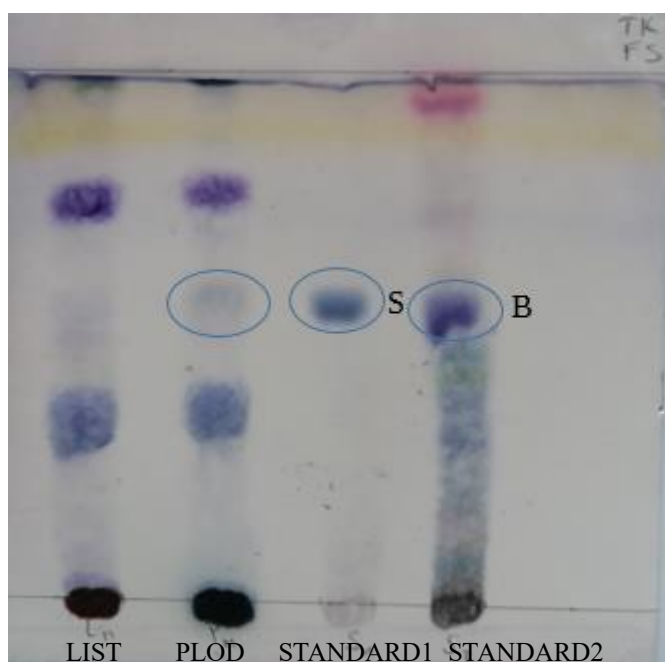
Stacionarna faza : Kiesel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza : kloroform-metanol-voda 64:50:10 (V/V/V)

Detekcija : anisaldehyd-sumporna kiselina, 100-105°C, Vis

4.1.5. Triterpenske kiseline i fitosteroli

Na nepokretnu fazu, silikagel ploču, nanoseni su metanolni ekstrakti lista i ploda maginje. Za ispitivanje je korištena pokretna faza sastava : diklormetan i etilacetat u volumnom omjeru 9 : 1. Nakon prskanja sa reagensom anisaldehyd-sumporna kiselina i sušenja na 100-105°C u uzorku ploda je opažena mrlja koja po boji i R_f vrijednosti odgovara standardu stigmasterola. Drugi korišteni standard je beta-sitosterol. Prema dobivenom kromatogramu nije moguće dokazati prisutnost stigmasterola ni β -sitosterola u uzorku lista, a ni β -sitosterola u uzorku ploda (Slika 16.).



Slika 16. Kromatogram triterpenskih kiselina i fitosterola lista i ploda maginje

S-Stigmasterol, $R_f = 0,57$; B- β -sitosterol

Stacionarna faza : Kiesel 60 F_{254} TLC ploča

Pokretna faza : diklormetan-etilacetat 9:1 (V/V)

Detekcija : anisaldehyd-sumporna kiselina, 100-105°C, Vis

4.2. ODREĐIVANJE FENOLNIH KISELINA, FLAVONOIDA, TRJESLOVINA I ANTOCIJANA

4.2.1. Fenolne kiseline

Određivanje sadržaja derivata hidroksicimetne kiseline provedeno je spektrofotometrijskom metodom. Stvorenom žuto obojenom kompleksu između o-dihidroksifenolne skupine i nitrit-molibdatova regensa koji nakon dodatka lužine prelazi u narančastocrvenu boju izmjerena je apsorbancija. Rezultat sadržaja izražen je kao klorogenska (525nm) i ružmarinska kiselina (505nm) te je prikazan u Tablici 1.

Tablica 1. Udio fenolnih kiselina u listu i plodu maginje

	Udio klorogenske kiseline (%)	Udio ružmarinske kiseline (%)
List	3,85±0,11	1,99±0,07
Plod	1,20±0,03	0,59±0,02

Sadržaj fenolnih kiselina u listu i plodu maginje kreće se od 0,59% do 3,85%. Iz tablice se može iščitati da list općenito ima veći udio fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska i ružmarinska kiselina u odnosu na plod. List i plod imaju viši udio klorogenske kiseline (3,85% i 1,20%) u odnosu na udio ružmarinske kiseline (1,99% i 0,59%).

4.2.2. Flavonoidi

Određivanje sadržaja flavonoida provedeno je spektrofotometrijskom metodom. Flavonoidni glikozidi su hidrolizirani te je otopini aglikona dodan aluminijev klorid čime su stvoreni žuto obojeni kompleksi sa maksimumom apsorbancije 425nm (vidljivo područje). Rezultat je izražen kao izokvercetrozid čija specifična apsorbancija iznosi 500 (Tablica 2.).

Tablica 2. Udio flavonoida u listu i plodu maginje

	Maseni udio flavonoida izražen kao izokvercetrozid (%)
list	0,79±0,02
plod	0,025±0,001

Sadržaj flavonoida u listu i plodu maginje znatno se razlikuje. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je list maginje znatno bogatiji flavonoidima u odnosu na plod.

4.2.3. Trjeslovine

Određivanje sadržaja trjeslovina provedeno je spektrofotometrijskom metodom. Ukupni polifenoli sastoje se od netaninskih polifenola i trjeslovina. Nakon obrade uzoraka sa kožnim praškom, iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na prašak, dobiven je sadržaj trjeslovina i izražen je kao pirogalol (Tablica 3.).

Tablica 3. Udio trjeslovina u listu i plodu maginje

	Udio trjeslovina izražen kao pirogalol (%)
list	3,65±0,26
plod	1,12±0,12

Sadržaj trjeslovina u uzorku lista i ploda također se znatno razlikuje. Udio u uzorku lista oko 3,25x je veći od udjela u uzorku ploda.

4.2.4. Antocijani

Određivanje sadržaja antocijana provedeno je spektrofotometrijskom metodom. Na 528 nm antocijani u kiselom mediju povećavaju apsorbanciju. Udio antocijana izračunat je kao cijanidin-3-glukozid klorid čija je specifična apsorbancija 718. Rezultati su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Udio antocijana u listu i plodu maginje

	Udio antocijana izražen kao cijanidin-3-glukozid klorid (%)
list	-
plod	0,175±0,010

Ovom metodom sadržaj antocijana u listu nije određen, a udio u plodu, izražen kao cijanidin-3-glukozid klorid, iznosi 0,175 %.

Ukupni udio fenolnih sastavnica ekstrakata ploda vrste *Arbutus unedo* L. u većini studija, izražen kao galna kiselina, kreće se od 4,826 % do 12,683 %. Potvrđene su tri vrste antocijana: delfinidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid te cijanidin-3-arabinozid. Udio antocijana varira od 0,025 % do 0,101 %. Sadržaj trjeslovina kreće se od 0,313% do 0,175 %. Četiri flavonola koja se kvantitativno najviše ističu su: kvercetin-3-rutinid, kvercetin-3-ksilozid, kvercetin-3-ramnozid i miricetin-3-ksilozid (Morgado i sur.,2018).

U istraživanju gdje je proučen i kvantificiran sastav lista maginje sa područja Malog Lošinja i Koločepa, dobiveni su sljedeći rezultati. Značajni udjeli flavan-3-ola (galokatehin, katehin i katehin galat), hiperozida i rutina nađeni su u ekstraktima lista. Najzastupljeniji spoj iz skupine flavan-3-ola bio je galokatehin, u rasponu od 64,21 do 211,60 mg/kg suhog ekstrakta. Galokatehin i katehin pronađeni su u najvećim količinama u metanolnom ekstraktu lista Koločepa (211,60 odnosno 102,95 mg/kg suhog ekstrakta), dok je katehin galat bio najzastupljeniji u metanolnom ekstraktu lista Malog Lošinja (124,91 mg/kg suhog ekstrakta). Flavonolni glikozidi bili su najzastupljeniji fenolni spojevi, što je u skladu s literaturnim podacima. Između svih kvantificiranih flavonolnih glikozida, hiperozid je bio najzastupljeniji. Od devet fenolnih kiselina kvantificiranih u ovom istraživanju, p-kumarinska (10,11–32,83 mg/kg suhog ekstrakta) i p-hidroksibenzojeva kiselina (16,21–27,08 mg/kg suhog ekstrakta) bile su najzastupljenije (Brčić Karačonji i sur., 2022).

4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

4.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

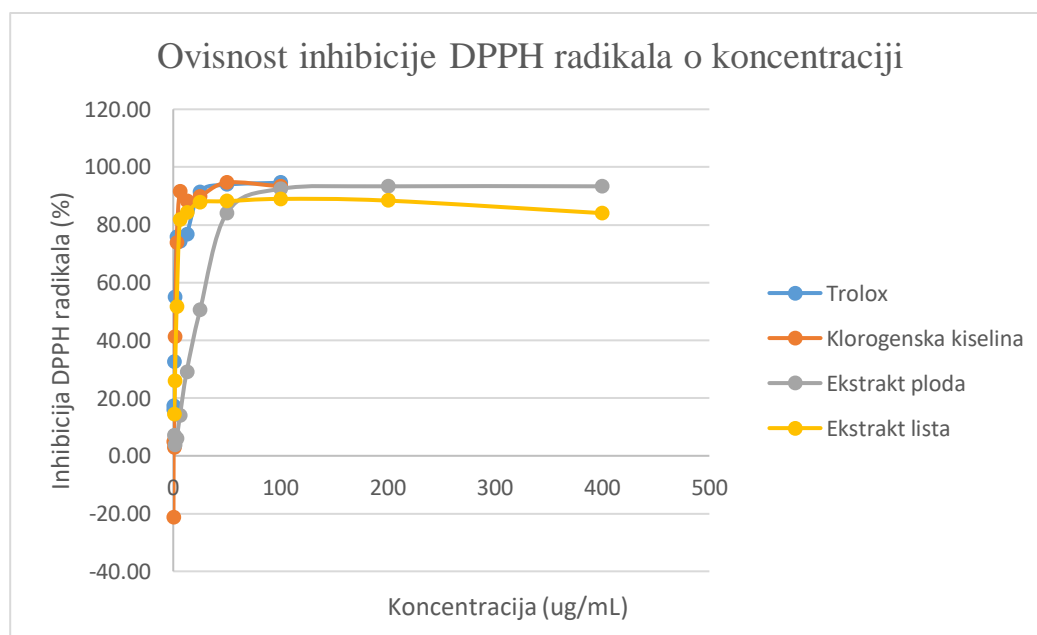
Za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala korištena je spektrofotometrijska metoda. DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) je slobodni radikal ljubičaste boje koji nakon hvatanja atoma vodika ili elektrona prelazi u stabilan reducirani oblik 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin svijetlo žute boje. Time se očitava antioksidacijska aktivnost uzorka. Sposobnost hvatanja DPPH radikala izražena je u postocima, a koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni učinak (IC_{50}) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka. Rezultati su prikazani u Tablici 5. i 6 i na Slici 17.

Tablica 5. Sposobnost hvatanja DPPH radikala u listu i plodu maginje

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibicija DPPH radikala u listu (%)	Inhibicija DPPH radikala u plodu (%)
400	84,03 \pm 1,04	93,32 \pm 0,41
200	88,37 \pm 0,42	93,33 \pm 0,07
100	88,96 \pm 0,14	92,45 \pm 1,64
50	88,17 \pm 0,71	84,09 \pm 0,16
25	87,78 \pm 0,15	50,50 \pm 4,40
12,5	84,24 \pm 0,36	29,11 \pm 4,70
6,25	81,89 \pm 2,56	13,96 \pm 1,44
3,13	51,55 \pm 3,29	5,88 \pm 1,42
1,56	25,91 \pm 0,19	3,67 \pm 0,27
0,78	14,29 \pm 1,43	7,12 \pm 12,04

Tablica 6. Spособnost hvatanja DPPH radikala referentnih spojeva (%)

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Troloks	Klorogenska kiselina
100	94,57 \pm 0,99	93,33 \pm 1,43
50	93,90 \pm 1,88	94,62 \pm 0,14
25	91,36 \pm 2,59	89,84 \pm 4,76
12,5	76,59 \pm 0,62	88,30 \pm 0,00
6,25	74,21 \pm 2,07	91,48 \pm 1,91
3,13	75,76 \pm 4,89	73,80 \pm 1,37
1,56	55,06 \pm 4,77	41,20 \pm 10,24
0,78	32,51 \pm 7,75	2,92 \pm 20,42
0,39	16,03 \pm 0,70	4,77 \pm 19,41
0,19	17,37 \pm 6,97	-21,41 \pm 30,02



Slika 17. Usporedni grafički prikaz sposobnosti inhibicije DPPH radikala za različite koncentracije etanolnih ekstrakata lista i ploda maginje i referentnih otopina

Sposobnost inhibicije DPPH radikala u listu maginje smanjuje se sa smanjenjem koncentracije. Iz tablica se može iščitati da plod u početnim koncentracijama izaziva inhibiciju radikala u većem postotku, no već ispod 50 µg/ml ona naglo pada. Pri koncentraciji uzorka ploda od 25,91±2,42 µg/ml ostvaren je 50%-tni antioksidacijski učinak. Uzorak lista pri koncentraciji od 3,38±0,17µg/ml ostvaruje isti antioksidacijski učinak što znači da list ima znatno veću sposobnost inhibicije radikala. IC₅₀ za standardni antioksidans troloks iznosi 1,56±0,34 µg/mL, a za klorogensku kiselinu 2,07±0,16 µg/mL. List i plod maginje nisu dosegli antioksidacijski učinak troloksa.

Brčić Karačonji i suradnici su 2021. godine usporedili antioksidacijsko djelovanje na DPPH radikal ekstrakta lista i ploda vrste *Arbutus unedo* L. ubranih u Malom Lošnju i Koločepu. Vodeni ekstrakti listova iz Malog Lošinja i Koločepa pokazali su 50%-tnu inhibiciju pri koncentracijama 62,53±1,13 µg/mL te 57,94±1,50 µg/mL. IC₅₀ za vodene ekstrakte plodova iz Malog Lošinja i Koločepa iznose 265,67±1,81 µg/mL te 294,85±1,94 µg/mL. Metanolni ekstrakt lista iz Malog Lošinja 50%-tnu inhibiciju pokazuje pri koncentraciji od 45,12±0,98 µg/mL, dok iz Koločepa 38,23±1,47 µg/mL. Metanolni ekstrakt ploda iz Malog Lošinja 50%-tnu inhibiciju pokazuje pri 177,49±1,18 µg/mL, a iz Koločepa pri 256,72±2,50 µg/mL. Metanolni ekstrakti svih uzoraka pokazuju veću sposobnost inhibicije. Vodeni i metanolni ekstrakt lista sa obje lokacije pokazuju veću antiradikalnu učinkovitost od ekstrakata ploda što odgovara i našim rezultatima za uzorak iz okolice Pule.

4.3.2. Određivanje sposobnosti hvatanja NO na mikrotitarskoj pločici

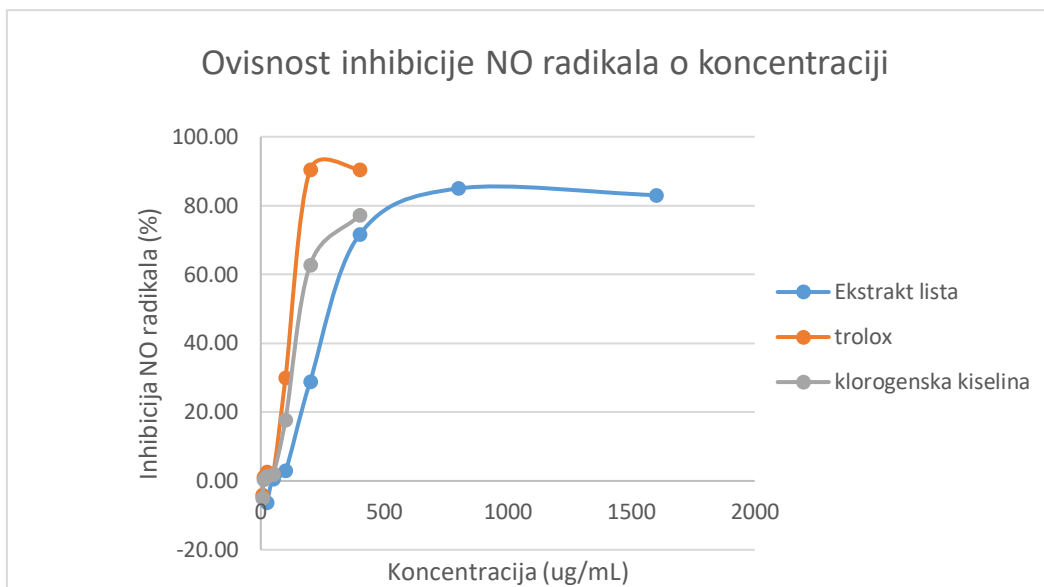
Za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikova (II) oksida korištena je spektrofotometrijska metoda. Natrijev nitroprusid je izvor NO radikala, a nakon njegove redukcije nastaje nitrit ion koji u reakciji sa sulfanilamidom i NED-om pri kiselom pH daje ljubičasti kompleks. Apsorbancija tog kompleksa mjeri se na 540 nm. Sposobnost hvatanja NO radikala izražena je u postotcima, a koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni učinak (IC_{50}) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka. Rezultati su prikazani u Tablici 7. i 8. te na Slici 18.

Tablica 7. Sposobnost hvatanja NO radikala u listu maginje

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibicija NO radikala (%)
1600	83,035 \pm 0,13
800	84,97 \pm 0,25
400	71,58 \pm 1,92
200	28,93 \pm 0,80
100	2,95 \pm 0,78
50	0,585 \pm 0,06
25	-6,225 \pm 0,22

Tablica 8. Sposobnost hvatanja NO radikala za troloks i klorogensku kiselinu (%)

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Troloks	Klorogenska kiselina
400	90,53 \pm 0,13	77,16 \pm 1,17
200	90,43 \pm 0,41	62,82 \pm 0,77
100	29,95 \pm 1,10	17,76 \pm 0,85
50	2,13 \pm 0,82	1,90 \pm 0,52
25	2,68 \pm 0,62	1,39 \pm 0,32
12,5	1,10 \pm 0,18	0,44 \pm 0,27
6,25	-3,98 \pm 0,61	-4,99 \pm 0,16



Slika 18. Usporedni grafički prikaz sposobnosti inhibicije NO radikala za različite koncentracije etanolnih ekstrakata lista maginje i referentnih otopina

Koncentracija uzorka lista koja ostvaruje 50%-tni učinak iznosi $301,95 \pm 4,83 \mu\text{g/mL}$. Uzorak ploda u navedenim koncentracijama nije pokazao sposobnost redukcije NO radikala, tj. antioksidacijski učinak. IC_{50} za referentni antioksidans trolox te klorogensku kiselinu, iznose $132,17 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ i $171,26 \pm 2,62 \mu\text{g/mL}$, što znači da ekstrakt lista ima manju sposobnost inhibicije od standarda. Nakon postizanja maksimalne inhibicije, antioksidacijska učinkovitost se postupno smanjuje.

4.3.3. Određivanje sposobnosti redukcije željeza (3⁺) u željezo (2⁺) u mikrotitarskoj pločici

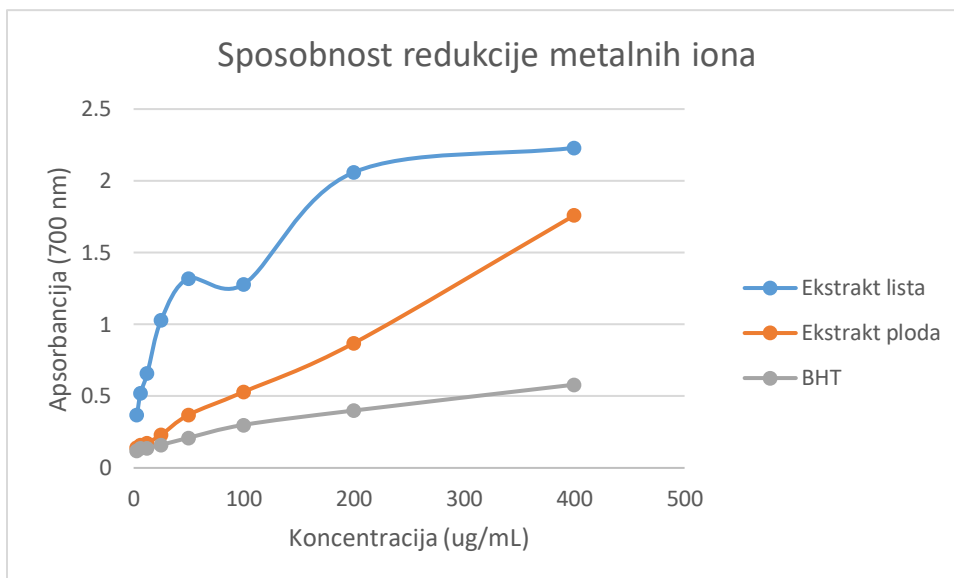
Ova metoda temelji se na redukciji kalijevog heksacijanoferata koji nakon toga dodatkom soli trovalentnog željeza oboji otopinu u razne nijanse plave boje ovisno o jačini antioksidansa. Apsorbancija je mjerena na 700 nm. Antioksidacijska moć ispitivanih uzoraka iskazana je kao koncentracija pri kojoj apsorbancija iznosi 0,5 i predstavlja redukciju od 50%. Korišteni standard je BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol). Rezultati su prikazani u Tablici 9. i 10. te na Slici 19.

Tablica 9. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji uzorka ploda i lista maginje

Koncentracija (µg/mL)	Apsorbancija lista	Apsorbancija ploda
400	2,232±0,152	1,760±0,310
200	2,062±0,036	0,867±0,117
100	2,282±0,017	0,528±0,006
50	1,323±0,009	0,368±0,003
25	1,033±0,020	0,233±0,003
12,5	0,667±0,010	0,175±0,004
6,25	0,524±0,012	0,159±0,007
3,13	0,376±0,013	0,143±0,017

Tablica 10. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda BHT

Koncentracija (µg/mL)	Apsorbancija
50	0,5865±0,033
25	0,4035±0,02
12,5	0,304±0,012
6,25	0,212±0,008
3,13	0,1655±0,005
1,56	0,1355±0,001
0,78	0,136±0,004
0,39	0,129±0,001



Slika 19. Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije metalnih iona za različite koncentracije etanolnih ekstrakata lista i ploda maginje i referentne otopine

Koncentracija uzorka lista pri kojoj je postignut 50%-tni antioksidacijski učinak iznosi $6,53 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$, a za uzorak ploda $93,03 \pm 9,29 \mu\text{g/mL}$. IC_{50} standarda BHT-a je $38,55 \pm 6,79 \mu\text{g/mL}$. To znači da list ima veću antioksidacijsku sposobnost i od standarda i od ploda.

Anghel i suradnici su 2021. godine u sličnom istraživanju dobili sljedeće rezultate. Ekstrakt lista dobiven ekstrakcijom na vodenoj kupelji uz povratno hladilo pri koncentraciji od $57.41 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$ pokazuje 50%-tni učinak redukcije, dok ekstrakt lista dobiven ekstrakcijom na ultrazvučnoj kupelji 50%-tni učinak postiže pri koncentraciji od $43.78 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$. Korišteni standard je galna kiselina čiji IC_{50} iznosi $88.6 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$. Ekstrakti lista i u ovom slučaju pokazuju bolje antioksidacijsko djelovanje od standarda koje je povezano s bogatim polifenolnim sastavom iskazanim kao taninska kiselina ($32.84 \pm 2.45 \%$ i $10.44 \pm 3.61 \%$).

5. ZAKLJUČAK

U ovom eksperimentalnom diplomskom radu kvalitativno i kvantitativno je analiziran fitokemijski sastav lista i ploda biljke *Arbutus unedo* L. te je ispitan i njen antioksidacijski potencijal. Pomoću tankoslojne kromatografije u listu su identificirane ružmarinska i klorogenska kiselina, kvercitrin i galna kiselina. U plodu maginje identificirana je ružmarinska kiselina i stigmasterol. Saponini nisu identificirani ni u listu ni u plodu. Kvantitativni sastav određen je spektrofotometrijskim metodama. Udio fenolnih kiselina, izraženih kao klorogenska kiselina, u listu iznosi 3,85%, a u plodu 1,20%. Udio fenolnih kiselina, izraženih kao ružmarinska kiselina, u listu iznosi 1,99%, a u plodu 0,59%. Sadržaj flavonoida izražen je kao izokvercetrozid u listu iznosi 0,79%, a u plodu 0,025%. Udio trjeslovina u listu i plodu iznosi 3,65% i 1,12%

Antocijani su izraženi kao cijanidin-3-glukozid klorid. Njihov udio u plodu iznosi 0,17%. Sveukupno gledano list ima veći udio fenolnih kiselina, flavonoida i trjeslovina u odnosu na plod. No, u listu nisu određeni antocijani dok u plodu jesu.

Antioksidacijska sposobnost ispitana je trima metoda. Redukcijom DPPH radikala određena je IC_{50} vrijednost lista koja iznosi $3,38 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ i ploda koja je $25,91 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$. Iz metode hvatanja NO radikala dobivena vrijednost IC_{50} za list je $301,95 \pm 4,83 \mu\text{g/mL}$. Plod nije pokazao antioksidacijski učinak. Posljednja metoda temelji se na redukciji željeza 3^+ u željezo 2^+ te su vrijednosti IC_{50} sljedeće: za list $6,53 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$ i za plod $93,03 \pm 9,29 \mu\text{g/mL}$. Na temelju svih analiza može se zaključiti da list maginje ima veći antioksidacijski potencijal od ploda. Antioksidacijska svojstva listova i plodova prepoznatljivo su povezana s bogatim polifenolnim sastavom pa tako i s potencijalnom primjenom kod bolesti posredovanim slobodnim radikalima. Daljnjim fitokemijskim pročišćavanjem i identifikacijom aktivnih spojeva biljke postat će jasnije njeno antimikrobno, antidiabetičko, antiagregirajuće, antihipertenzivno i protuupalno djelovanje.

6. LITERATURA

Awah FM, Verla AW. Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. *J Med Plant Res*, 2010, 4, 2479-2487.

Anghel AI, Ancuceanu R, Popescu ML, Gard CE, Dinu M, Hovanet MV, Nencu I. Preliminary research regarding the cytotoxicity and antioxidant activity of *Arbutus unedo* L. leaves. *Farmacia*, 2021, 69(2), 260-266.

Brčić Karačonji I, Jurica K, Gašić U, Dramićanin A, Tešić Ž, Milojković O, Špenica D. Comparative study on the phenolic fingerprint and antioxidant activity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves and fruits. *Plants*, 2022, 11, 25.

Domitrovic, R. The Molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. *Curr Med Chem*, 2011, 18, 4454-4469.

El-Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. Radical-scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.) *Adv Pharmacol and Pharmac Sci*, 2016, 2016, 1-7

Gylling H, Plat J, Turley S, Ginsberg HN, Ellegard L, Jessup W, Jones PJ., Lütjohann D, Maerz W, Masana L, Silbernagel G, Staels B, Boren J, Catapano AL, De Backer G, Deanfield J, Descamps OS, Kovanen PT, Riccardi G, Tokgözoğlu L, Chapman MJ. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2014, 232(2), 346-360.

Haouari ME, Assem N, Changan S, Kumar M, Dastan SD, Rajkovic J, Taheri Y, Sharifi-Rad J. An insight into phytochemical, pharmacological, and nutritional properties of *Arbutus unedo* L. from Morocco. *Evid Based Complement Altern Med*, 2021, 1794621, 19.

Imtara, H, Kmail, A, Touzani, S, Khader, M, Hamarshi, H, Saad, B, Lyoussi B. Chemical Analysis and Cytotoxic and Cytostatic Effects of Twelve Honey Samples Collected from Different Regions in Morocco and Palestine *Evid Based Complement Altern Med*, 2019, 287, 1-11.

Jurišić Grubešić R. Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2003.

Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep*, 2019, 241, 1-10.

Mariotto S, Esposito E, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, de Prati AC, Darra E, Vincenzi S, Cucinotta G, Caminiti R, Suzuki H, Cuzzocrea S. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol Res*, 2008, 57, 110–124.

Mekhfi H, Haouari ME, Bnouham M, Aziz M, Ziyat A, Legssyer A. Effects of Extracts and Tannins from *Arbutus unedo* Leaves on Rat Platelet Aggregation. *Phytoth Res*, 2006, 20(2), 135–139.

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties. *Molecules*, 2014, 19(10), 15799-15823.

Morgado S, Morgado M, Placido AI, Roque F, Duarte AP. *Arbutus unedo* L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy. *J Ethnopharmacol*, 2018, 225, 90-102.

Pabuccuoglu A, Kıvçak B, Bas M, Mert T. Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoterapia*, 2003, 74, 597–599.

Pevalek-Kozlina, B. Fiziologija bilja. Zagreb, Profil International, 2003, str. 566.

Šic Žlabur J, Bogdanović S, Voća S, Skendrović Babojelić M. Biological Potential of Fruit and Leaves of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) from Croatia. *Molecules*, 2020, 25, 5102.

Šošević S. Biološka aktivnost saponina na primjeru zlatice. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 2012, 1 (2), 48-51.

Španjol Ž, Dorbić B, Vučetić M. Planika (*Arbutus unedo* L.) i lovor (*Laurus nobili* L.)- značajne (važne) vrste našeg mediteranskog krša. *Vatrogastvo i upravljanje požarima*, 2021, 9, 29-71.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B., Bival Štefan M, Kindl M. Praktikum iz Farmakognozije 1, Interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2019, str. 32-45.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, nastavni materijal. Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.

Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin, Springer, 2010, str. 195-244.

7. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Ovim diplomskim radom analiziran je sastav te je ispitano antioksidacijsko djelovanje listova i plodova biljke *Arbutus unedo* L., sakupljenih na području Istre. Identifikacija fenolnih kiselina (ružmarinske i klorogenske), flavonoida (kvercitrina, izokvercitrina i rutina), trjeslovina (galne kiseline), saponina te triterpenskih kiselina i fitosterola (stigmasterola i beta-sitosterola) provedena je primjenom prikladne metode tankoslojne kromatografije (TLC). U listu je utvrđena prisutnost ružmarinske kiseline, klorogenske kiseline, kvercitrina i galne kiseline. U plodu je nađena ružmarinska kiselina i stigmasterol. Kvantifikacija fenolnih kiselina (ružmarinske i klorogenske), flavonoida (izokvercetrozida), trjeslovina (pirogalola) i antocijana (cijanidin-3-glukozid klorida) provedena je spektrofotometrijskim metodama. U listu je udio fenolnih kiselina 1,99% (ružmarinska kiselina) i 3,85% (klorogenska kiselina), a u plodu 0,59% (ružmarinska kiselina) i 1,20% (klorogenska kiselina). Sadržaj flavonoida izražen kao izokvercetrozid u listu iznosi 0,79%, a u plodu 0,025%. Udio trjeslovina u listu iznosi 3,65%, a u plodu 1,12%. U plodu je udio antocijana 0,1748%, dok u listu oni nisu utvrđeni. Antioksidacijsko djelovanje definirano je spektrofotometrijskim metodama : određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala (list : $IC_{50} = 3,38 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$, plod : $IC_{50} = 25,91 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$), određivanjem sposobnosti hvatanja NO radikala (list : $IC_{50} = 301,95 \pm 4,83 \mu\text{g/mL}$) i određivanjem sposobnosti redukcije željeza 3^+ u željezo 2^+ (list : $IC_{50} = 6,53 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$, plod : $IC_{50} = 93,03 \pm 9,29 \mu\text{g/mL}$). Ovaj rad doprinosi utvrđivanju fitoterapijske vrijednosti vrste *Arbutus unedo* L.

SUMMARY

In this graduation thesis were examined the composition and antioxidant activity of leaves and fruits of the plant *Arbutus unedo* L., harvested in 2020 in the area of Istria. The identification of phenolic acids (rosmarinic and chlorogenic), flavonoids (quercitrin, isoquercitrin and rutin), tannins (gallic acid), saponins and triterpenic acids and phytosterols (stigmasterol and beta-sitosterol) was carried out using a suitable thin-layer chromatography (TLC) method. Leaves showed the presence of rosmarinic acid, chlorogenic acid, quercitrin and gallic acid. In fruit were found rosmarinic acid and stigmasterol. Quantification of phenolic acids (rosmarinic and chlorogenic), flavonoids (isoquercitroside), tannins (pyrogallol) and anthocyanins (cyanidin-3-glucoside chloride) was carried out by spectrophotometric methods. The amount of phenolic acids in leaf is 1.99% (rosmarinic acid) and 3.85% (chlorogenic acid), and in fruit 0.59% (rosmarinic acid) and 1.20% (chlorogenic acid). The content of flavonoids expressed as isoquercitroside in leaf is 0.79%, and in fruit 0.025%. The portion of tannins in leaf is 3,65%, and in fruit 1,12%. The amount of anthocyanins in fruit is 0.1748%, while in leaf they are not determined. The antioxidant activity was defined by spectrophotometric methods: by determining the ability to capture DPPH free radical (leaf : $IC_{50} = 3.38 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$, fruit: $IC_{50} = 25.91 \pm 2.42 \mu\text{g/mL}$), by determining the ability to capture NO radical (leaf : $IC_{50} = 301.95 \pm 4.83 \mu\text{g/mL}$) and by determining the ability to reduce iron 3^+ into iron 2^+ (leaf : $IC_{50} = 6.53 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$, fruit : $IC_{50} = 93.03 \pm 9, 29 \mu\text{g/mL}$). This work contributes to the determination of phytotherapeutic values of *Arbutus unedo* L.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje lista i ploda vrste *Arbutus unedo* L. (Ericaceae)

Lucija Jagarinec

SAŽETAK

Ovim diplomskim radom analiziran je sastav te je ispitano antioksidacijsko djelovanje listova i plodova biljke *Arbutus unedo* L., ubranih 2020.-te godine na području Istre. Identifikacija fenolnih kiselina (ružmarinske i klorogenske), flavonoida (kvercitrina, izokvercitrina i rutina), trjeslovina (galne kiseline), saponina te triterpenskih kiselina i fitosterola (stigmasterola i beta-sitosterola) provedena je primjenom prikladne metode tankoslojne kromatografije (TLC). U listu je utvrđena prisutnost ružmarinske kiseline, klorogenske kiseline, kvercitrina i galne kiseline. U plodu je nađena ružmarinska kiselina i stigmasterol. Kvantifikacija fenolnih kiselina (ružmarinske i klorogenske), flavonoida (izokvercetrozida), trjeslovina (pirogalola) i antocijana (cijanidin-3-glukozid klorida) provedena je spektrofotometrijskim metodama. U listu je udio fenolnih kiselina 1,99% (ružmarinska kiselina) i 3,85% (klorogenska kiselina), a u plodu 0,59% (ružmarinska kiselina) i 1,20% (klorogenska kiselina). Sadržaj flavonoida izražen kao izokvercetrozid u listu iznosi 0,79%, a u plodu 0,025%. Udio trjeslovina u listu iznosi 0,0036%, a u plodu 0,0011%. U plodu je udio antocijana 0,1748%, dok u listu oni nisu utvrđeni. Antioksidacijsko djelovanje definirano je spektrofotometrijskim metodama : određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala (list : $IC_{50} = 3,38 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$, plod : $IC_{50} = 25,91 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$), određivanjem sposobnosti hvatanja NO radikala (list : $IC_{50} = 301,95 \pm 4,83 \mu\text{g/mL}$) i određivanjem sposobnosti redukcije željeza 3^+ u željezo 2^+ (list : $IC_{50} = 6,53 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$, plod : $IC_{50} = 93,03 \pm 9,29 \mu\text{g/mL}$). Ovaj rad doprinosi utvrđivanju fitoterapijske vrijednosti vrste *Arbutus unedo* L.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 19 grafičkih prikaza, 10 tablica i 22 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Arbutus unedo* L. Ericaceae, list, plod, antioksidacijski učinak, fenolni spojevi, apsorpcija, spektrofotometrija, tankoslojna kromatografija

Mentor: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Biljana Blažeković, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Phytochemical composition and antioxidant activity of leaf and fruit of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae)

Lucija Jagarinec

SUMMARY

In this graduation thesis were examined the composition and antioxidant activity of leaves and fruits of the plant *Arbutus unedo* L., harvested in 2020 in the area of Istria. The identification of phenolic acids (rosmarinic and chlorogenic), flavonoids (quercitrin, isoquercitrin and rutin), tannins (gallic acid), saponins and triterpenic acids and phytosterols (stigmasterol and beta-sitosterol) was carried out using a suitable thin-layer chromatography (TLC) method. Leaves show the presence of rosmarinic acid, chlorogenic acid, quercitrin and gallic acid. In fruit were found rosmarinic acid and stigmasterol. Quantification of phenolic acids (rosmarinic and chlorogenic), flavonoids (isoquercitroside), tannins (pyrogallol) and anthocyanins (cyanidin-3-glucoside chloride) was carried out by spectrophotometric methods. The amount of phenolic acids in leaf is 1.99% (rosmarinic acid) and 3.85% (chlorogenic acid), and in fruit 0.59% (rosmarinic acid) and 1.20% (chlorogenic acid). The content of flavonoids expressed as isoquercitroside in leaf is 0.79%, and in fruit 0.025%. The portion of tannins in leaf is 0.0036%, and in fruit 0.0011%. The amount of anthocyanins in fruit is 0.1748%, while in leaf they are not determined. The antioxidant activity was defined by spectrophotometric methods: by determining the ability to capture DPPH free radical (leaf : $IC_{50} = 3.38 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$, fruit: $IC_{50} = 25.91 \pm 2.42 \mu\text{g/mL}$), by determining the ability to capture NO radical (leaf : $IC_{50} = 301.95 \pm 4.83 \mu\text{g/mL}$) and by determining the ability to reduce iron 3^+ into iron 2^+ (leaf : $IC_{50} = 6.53 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$, fruit : $IC_{50} = 93.03 \pm 9, 29 \mu\text{g/mL}$). This work contributes to the determination of phytotherapeutic values of *Arbutus unedo* L.

Thesis includes: 49 pages, 19 figures, 10 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Arbutus unedo* L. Ericaceae, leaf, fruit, antioxidant effect, phenolic compounds, absorbance, spectrophotometry, thin-layer chromatography

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

Reviewers: **Maja Bival Štefan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Blažeković, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana-Marija Domijan, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.