

# Fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak lista i ploda vrste *Celtis australis* L.

---

Peršun, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:939695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

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



**Lucija Peršun**

**Fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak lista  
i ploda vrste *Celtis australis* L.**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022 .

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Maje Bival Štefan.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Maji Bival Štefan na pomoći pri odabiru teme za ovaj rad, na stručnom vodstvu, savjetima i razumijevanju tijekom izrade istog.*

*Hvala mojoj obitelji i dečku na strpljivosti, podršci i pruženoj pomoći tijekom cijelog studija.*

*Posebno hvala mojem najdražem djedu i mojem najvećem uzoru prof. Mišku bez kojega sve ovo ne bi bilo moguće. Hvala mu što je oduvijek vjerovao u mene, što me hrabrio u teškim trenucima i usmjerio na pravi put. Iako više nije s nama, već je na nekom ljepšem mjestu, ovaj rad posvećujem njemu jer znam koliko mu moj uspjeh znači i da se raduje zajedno sa mnom .*

# SADRŽAJ



<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1.</b> Botanička obilježja biljne vrste <i>Celtis australis</i> L.....	2
<b>1.2.</b> Pregled dosadašnjih istraživanja biljne vrste <i>Celtis australis</i> L.....	4
<b>1.3.</b> Sekundarni metaboliti.....	8
<b>1.3.1.</b> Fenolni spojevi.....	10
<b>1.3.1.1.</b> Flavonoidi i antocijani.....	10
<b>1.3.1.2.</b> Tanini (trjeslovine).....	12
<b>1.3.1.3.</b> Fenolne kiseline.....	12
<b>1.3.2.</b> Terpeni.....	14
<b>1.3.2.1.</b> Triterpeni i saponini.....	14
<b>1.4.</b> Oksidacijski stres i antioksidansi.....	15
<b>1.5.</b> Lipidna peroksidacija.....	18
<b>1.6.</b> NO i učinci.....	19
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	21
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	22
<b>3.1.</b> Istraživani biljni materijal.....	22
<b>3.2.</b> Laboratorijska aparatura i pribor.....	22
<b>3.3.</b> Reagensi, kemikalije i ostali standardi.....	22
<b>3.4. Analiza sastavnica metodom tankoslojne kromatografije</b> .....	25
<b>3.4.1.</b> Priprema uzoraka i standarda.....	25
<b>3.4.2.</b> Ispitivanje flavonoida.....	25
<b>3.4.3.</b> Ispitivanje fenolnih kiselina.....	25
<b>3.4.4.</b> Ispitivanje tjeslovina.....	26
<b>3.4.5.</b> Ispitivanje triterpenskih kiselina i fitosterola.....	26
<b>3.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola</b> .....	26
<b>3.5.1.</b> Određivanje flavonoida.....	26
<b>3.5.2.</b> Određivanje antocijana.....	27
<b>3.5.3.</b> Određivanje fenolnih kiselina.....	28
<b>3.5.4.</b> Određivanje trjeslovina.....	29

<b>3.6. Ispitivanje antioksidacijskog učinka</b> .....	30
<b>3.6.1.</b> Priprema biljnih ekstrakata.....	30
<b>3.6.2.</b> Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala.....	30
<b>3.6.3.</b> Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza (III).....	31
<b>3.6.4.</b> Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog (II) oksida.....	31
<b>3.7. Statistička obrada podataka</b> .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	33
<b>4.1. Analiza tankoslojnom kromatografijom</b> .....	33
<b>4.1.1.</b> Flavonoidi.....	33
<b>4.1.2.</b> Fenolne kiseline.....	36
<b>4.1.3.</b> Trjeslovine.....	38
<b>4.1.4.</b> Triterpenske kiseline i fitosteroli .....	39
<b>4.2. Određivanje sadržaja flavonoida, antocijana, fenolnih kiselina i trjeslovina</b> .....	40
<b>4.2.1.</b> Flavonoidi.....	40
<b>4.2.2.</b> Antocijani.....	42
<b>4.2.3.</b> Fenolne kiseline.....	43
<b>4.2.4.</b> Trjeslovine.....	44
<b>4.3. Ispitivanje antioksidacijskog učinka</b> .....	45
<b>4.3.1.</b> Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala.....	45
<b>4.3.2.</b> Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III).....	49
<b>4.3.3.</b> Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida.....	52
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	55
<b>6. LITERATURA</b> .....	57
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	62
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

## 1. UVOD

Ljekovite biljne vrste oduvijek su dio narodne medicine. Unatoč razvoju farmaceutske industrije, ljekovite biljne vrste i danas su zastupljene u profilaksi i liječenju nekih bolesti kao alternativa sintetskim lijekovima (Soulaïdopoulos i sur., 2022; Durazzo i sur.,2021). Mnoge biljne vrste su dobar izvor bioaktivnih spojeva koji imaju različite farmakološke učinke. Biološki aktivni spojevi iz ljekovitog bilja postali su predmet istraživanja zbog njihove dostupnosti i minimalnih nuspojava. Istraživanja ljekovitih biljnih vrsta sve su češća i zbog pojave rezistencije na mnoge postojeće lijekove (Sadoq i sur., 2019). Veliki broj istraživanja usmjeren je na utjecaj prirodnih antioksidansa na zaštitu ljudskog organizma od oksidativnog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima posebice zato što novija istraživanja upućuju na potencijalne nuspojave sintetskih antioksidansa (Hammash i sur.,2016).

Vrsta *Celtis australis* L. svrstana je u porodicu Cannabaceae. Košćela je do danas bila cijenjena uglavnom zbog svog drva. Plodovi košćele dozrijevaju u jesen kao kuglaste koštunice promjera 9-12 mm. Oni su mali i imaju relativno veliku sjemenku koja čini približno 38% mase suhog ploda s posljedičnim niskim prinosom mezokarpa. Ovo voće je trpkog okusa i rijetko se konzumira svježe, a ponekad se koristi za proizvodnju likera miješanjem sa voćnom rakijom. Plod ima visok sadržaj šećera (i do 81,5%), a svojim senzornim svojstvima i mineralnim sastavom usporediv je sa smokvama. Listovi *C. australis* sadrže rijetke flavonoidne C-glikozide, kao npr. acetin 7-O-glukozid, izoviteksin i citizozid (Ota i sur.,2017). U indijskoj tradicionalnoj medicini, dekoti lišća i plodova koriste se u liječenju amenoreje, jakih menstruacija, krvarenja između menstruacija te kod proljeva i peptičkog ulkusa. Pasta dobivena od kore *C. australis* predstavlja lijek za prijelome kostiju, a također se primjenjuje na prištiće, te za uganuća i bolove u zglobovima. U marokanskoj tradicionalnoj medicina, *C. australis* se obično naziva "Taghzaz" i uglavnom se koristi za liječenje gastrointestinalnih bolesti (Filali-Ansari i sur.,2016).

Biljna vrsta *C. australis* L. nema svoju monografiju u Europskoj farmakopeji, međutim njeni biološki učinci predmet su znanstvenih istraživanja. Dosadašnja istraživanja pokazala su da *C.australis* ima hepatoprotektivno djelovanje. Dokazano je antioksidacijsko i protuupalno djelovanje ekstrakata kore i plodova, dok su se ekstrakti plodova i lišća pokazali dobar antimikrobni učinak. Također je ispitano antioksidacijsko i antibakterijsko djelovanje triju sastavnica iz listova *C. australis*. Dosadašnje studije ukazale su na potrebu za daljnjim

određivanjem bioaktivnih spojeva i identificiranjem istih u listovima, plodovima i kori ove biljke. Potrebna su daljnja znanstvena istraživanja i klinička ispitivanja kako bi se potvrdili ovi rezultati i utvrdila terapijska učinkovitost.

U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak listova i plodova vrste *Celtis australis* L.

### **1.1. Botanička obilježja biljne vrste *Celtis australis* L.**

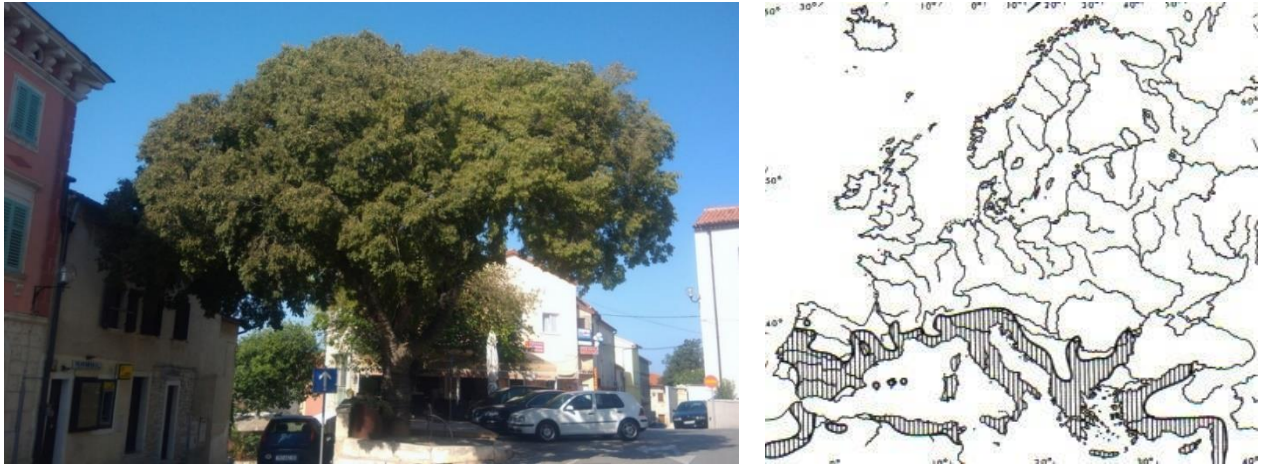
Biljna vrsta *Celtis australis* u narodu je poznata kao: (crna) koščela, crni koprivić, koprivica, kostanjula, ladonja, bobica, južnjačka kostela, fafarinka itd. To listopadno drvo posjeduje jako deblo koje doseže visinu do 20 metara, s okruglastom i prozračnom krošnjom. Istu sačinjavaju tanke sivosmeđe dlakave grančice. Kora je debela, sive boje, te dugo vremena ostaje glatka dok kod starog drveća potamni i sitno ispuca (Dorbić i sur., 2018; Grlić, 2005). Hrapavi listovi košćeke svojim sivozelenim naličjem prekrivenim mekanim dlačicama i oštro nazubljenim rubovima jako podsjećaju na lišće koprive. Lišće je duguljasto jajoliko, nesimetrično, produženog šiljastog vrha, 4-15 cm dugo, 1,5-6 cm široko i ima oko 1 cm dugu dlakavu peteljku. Sitni zelenkasti cvjetići pojavljuju se u rano proljeće u pazušcima listova (Šilić, 2005; Grlić, 2005). Cvjetovi su jednodomni, dvospolni i jednospolni, sitni, žućkaste boje. Rastu pojedinačno ili po 2–4 u skupinama. Vrijeme cvjetanja je istodobno s listanjem (travanj-svibanj). Razmnožava se sjemenom i vegetativno (Šilić, 2005).

Plod je okruglasta mesnata koštunica, do 1 cm široka, s velikom mrežasto izbrazdanom sjemenkom. Plodovi dozrijevaju u srpnju, kolovozu i rujnu, a na stablu mogu ostati preko čitave zime (Dorbić i sur., 2018; Grlić, 2005). Plodovi tijekom svog sazrijevanja mijenjaju boju od zelene, preko žute, a kad u rujnu sasvim sazriju kora im postaje tamnosmeđa (Grlić, 2005).

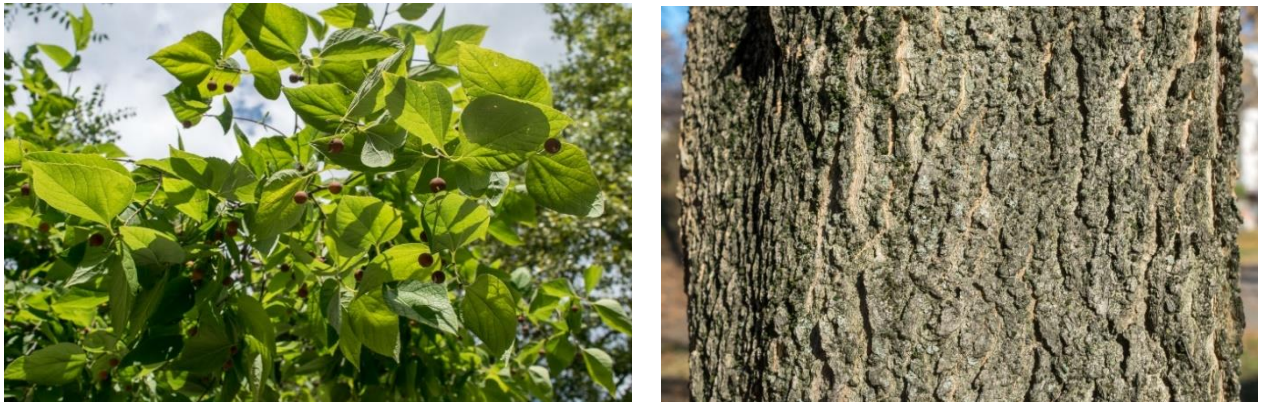
Košćela je rasprostranjena na području južne Europe, Male Azije, Kavkaza i sjeverne Afrike (Šilić, 2005). Odgovaraju joj većinom topli, sunčani, kameniti obronci, a nalazimo je uz vrtove, živice, ceste i putove. Njeno najčešće stanište su šikare i šume hrasta medunca u submediteranskim krajevima. Voli laka, rastresita, pjeskovita zemljišta na vapnencu. U Hrvatskoj raste pretežito u južnijim krajevima po naseljima uz primorski pojas, dok se u kontinentalnom dijelu zemlje sadi po parkovima. Samoniklo drvo se penje sve do 900 m nadmorske visine. Koščela je drvo sporog rasta,



a životni vijek joj je iznad 400 godina (Šilić,2005; Grlić, 2005). *C. australis* je drvo otporno na sušu, vjetar i onečišćenje zraka i sposobno je izdržati temperature i do  $-15^{\circ}\text{C}$  (Jurc i sur., 2016).



**Slika 1. i 2.** Fotografija stabla ladonje (košćele) starog 115 godina; na gradskom trgu u Medulinu (preuzeto s: [www.zastita-prirode-dnz.hr](http://www.zastita-prirode-dnz.hr)). Karta rasprostranjenosti biljne vrste *Celtis australis* L. (preuzeto s : [www.uv.es](http://www.uv.es) ) .



**Slike 3. i 4.** Fotografije grana (s plodovima i listovima) i debla biljne vrste *Celtis australis* L. (preuzeto s: [www.plantea.com.hr](http://www.plantea.com.hr) )



**Slika 5. i 6.** Fotografije ploda biljne vrste *Celtis australis* L. (preuzeto s: [www.plantea.com.hr](http://www.plantea.com.hr))



## 1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja biljne vrste *Celtis australis* L.

Fitokemijsku analizu flavonoida u košćeli proveli su Zehrmann i suradnici 2010. godine. Provedena je kapilarna elektroforetska separacija osam spojeva, od kojih su većina flavonski C-glikozidi. Sadržaj ukupnih flavonoida pokazao se usporedivim u svim ispitivanim uzorcima (0,26–0,30%), pri čemu se izoviteksin pokazao kao dominantan flavonoid (0,06–0,09%), a slijedi ga citizozid (0,04–0,07%).

Za rod *Celtis* karakteristično je prisustvo flavonskih C-glikozida. U studiji iz 2009. godine u listovima *C. australis* iz Italije potvrđeni su akacetin 7-O-glukozid (7,1 mg), izoviteksin (14,7 mg) i citizozid (12,5 mg) čije su strukture određene na temelju NMR i MS podataka (Spitaler i sur.,2009).

U studiji iz 2010. godine 2''- $\alpha$ -ramnopiranozilviteksin i 2''- $\alpha$ -ramnopiranozil-7-O-metilviteksin izolirani su po prvi put iz listova *C. australis* prikupljenih u Južnom Tirolu u Italiji (Kaltenhauser i sur.,2010).

Badoni i sur. (2010a) po prvi puta su iz ploda košćece izolirali celtisanin, sulfonirani fenol, a osim njega izolirana su i tri poznata spoja : apigenin, kvercetin i njegov glukozid. Badoni i sur. su 2011. godine po prvi put razjasnili strukturu novog bakteriohopanoida, 3b-hidroksi-35-(cikloheksil-50-propan-70-on)-33-etil-34-metil-baktereohopan koji je izoliran iz kore *C. australis*. .

Cascales i sur. (2021.) su utvrdili svojstva i sastav plodova biljne vrste *C. australis*. Svježi zreli plodovi ručno su frakcionirani na opnu (19,8%), jestivo usplođe (49,7%) i košćicu (29,4%). Činjenica da sadržaj usplođa u zrelim bobicama čini blizu 50% težine svježeg ploda je dobra osnova za primjenu košćece u prehrambenoj industriji. Određena je prosječna antioksidativna aktivnost (FRAP) od 4000  $\mu$ mol ekv. Fe<sup>2+</sup>/100 g i sposobnost hvatanja DPPH radikala s IC<sub>50</sub> vrijednosti od 7,0. Antioksidativna svojstva rezultat su sadržaja fenolnih spojeva i flavonoida, koji iznose 249,1 mg ekv. galne kiseline/100 g odnosno 28,2 mg ekv. kvercetina /100 g ploda. Potvrđen je visok sadržaj saharoze (12,8 g/100 g), glukoze (17,5 g/100 g) i fruktoze (21,8 g/100 g). Dijetalna vlakna u usplođu iznosila su 18 g/100 g. Sadržaj vitamina E, određen pomoću HPLC metode ,u usplođu iznosio je 1,0 mg/100 g. Sadržaj vitamina C u kori i usplođu plodova iznosio je 3,7 i 2,2 mg 100/g.

Studija iz 2020. godine imala je za cilj utvrditi nutritivna i fizikalno-kemijska svojstva ulja ekstrahiranog iz sjemenki košće radi proširenja njegove upotrebe u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u budućnosti. Peroksidni broj, kiselinski broj, saponifikacijski broj, jodni broj i ukupni sadržaj masti redom su iznosili: 4,9 meq O<sub>2</sub>/kg masti, 0,9 mg KOH/g masti, 193,6 mg KOH/g masti, 141,52 mg I<sub>2</sub>/g masti. Prevladavajuća masna kiselina koja se nalazi u plodu košće je linolna kiselina (73,38%±1,24), tj. omega-6 masna kiselina. Nadalje, ulje sjemenki *C. australis* sadrži visoke razine gama-tokoferola (87%) i β-sitosterola (81,2%). Utvrđeno je da ulje *C. australis* sadrži triacilglicerole koji imaju tri linolne kiseline na tri pozicije glicerola (Nodeh i sur., 2020).

Badoni i sur. (2010b) su po prvi put proveli analizu masnih kiselina i antimikrobnog djelovanja plodova *C. australis*. Metil-oleat (25,7%), metil-palmitat (22,2%), metil-trikoanoat (13,3%), metil-lineolat (7,8%), metil-dotriacenoat (2,6%) i metil-14-acetilhidroksipalmitat (2,1%) bili su glavni sastojci plodova. Etanolni ekstrakt plodova korišten je za procjenu antimikrobne aktivnosti protiv različitih mikroorganizama. Za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti korištena je metoda difuzije u agaru. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ekstrakta određena je metodom razrjeđivanja u epruvetama (turbimetrijska metoda). Značajni rezultati postignuti su protiv *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*.

Ahmad i sur. su 2012. godine procijenili antibakterijski potencijal metanolnih i vodenih ekstrakata lišća, disk difuzijskom metodom. Promjer zone inhibicije oko svakog diska uzet je kao mjera antibakterijskog djelovanja. Ekstrakti su ispitani na antibakterijsko djelovanje protiv *Streptococcus aureus* i *P. aeruginosa*, koristeći cefotaksim kao pozitivnu kontrolu. Najjača antibakterijska aktivnost je opažena protiv *S. aureus* pri koncentraciji od 200 mg/ml sa zonom inhibicije 10,5±0,57 mm. Zona inhibicije dobivena protiv *P. aeruginosa* pri koncentraciji 200 mg/ml iznosila je 9,00 ± 0,82 mm. Zone od 8,5±1,86 i 7,5±1,00 mm primijećene su u vodenom ekstraktu listova protiv *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Antibiotik cefotaksim pokazao je 15 i 12 mm zonu inhibicije protiv *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Povećanje koncentracije ekstrakata rezultiralo je povećanim antibakterijskim potencijalom za sve testirane ekstrakte. Utvrđeno je da su ekstrakti djelotvorni protiv *B. subtilis* i *P. aeruginosa* s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 250 i 125 µg/ml.

Ota i sur. 2017.godine su napravili studiju koja uključuje određivanje nutritivnih i fizikalno-kemijskih svojstva uz ispitivanje antibakterijske i antifungalne aktivnosti vrste *C. australis*. Nezreli

i zreli plodovi i listovi bili su prikupljeni u različitim fazama rasta, tj. krajem lipnja i krajem listopada u Istri (selo Marasi kraj Vrsara, Hrvatska). Plodu su odstranjene sjemenke i uzorci mezokarpa i sjemenki bili su liofilizirani. Mezokarp zrelih plodova sadržavalo je 30,0% vode, 3,4 g/100 g proteina i 10,2% ukupnih dijetalnih vlakana. Što se tiče sadržaja vitamina i minerala u mezokarpu je pronađena najveća koncentracija vitamina D, zatim Ca i P, a glavni element je bilo Fe (5,05 mg/100 g). Košćela ima mineralno-kemijski sastav sličan onom u smokve; posebno u odnosu na K, Ca i P. Količine ukupnih vlakana i proteina također su usporedive s onima promatranim za smokve. Što se tiče pigmenata u mezokarpu zrelog ploda,  $\beta$ -karoten je bio najzastupljeniji (5,58  $\mu\text{g/g}$ ), a slijede ga lutein (1,41  $\mu\text{g/g}$ ) i zeaksantin (0,74  $\mu\text{g/g}$ ).  $\alpha$ -tokoferol je bio najzastupljeniji među tokoferolima sa 150,13  $\mu\text{g/g}$  suhe tvari. Određen je i sadržaj klorofila kao 3,7  $\mu\text{g/g}$  suhe tvari. Sjemenke plodova sadržavale su uglavnom linolnu kiselinu (5,109 g/100 g sjemenki), koja je iznosila 76,25% svih masnih kiselina. Vodeni ekstrakt zrelog mezokarpa sadržavao je 0,27 g/100 g ukupnih fenola (izraženo kao ekvivalenti galne kiseline), a ekstrakt nezrelog mezokarpa 0,05 g/100 g ukupnih fenola. Sadržaj ukupnih fenola određen u etanolnom ekstraktu zrelog mezokarpa iznosio je 0,24 g/100 g ukupnih fenola, dok je u ekstraktu nezrelog mezokarpa iznosio 0,10 g/100g ukupnih fenola. Ukupna količina fenola određena u etanolnom ekstraktu listova, sakupljenog na krajem lipnja, iznosila je 0,07 g/100 g ukupnih fenola, međutim sadržaj se povećao deset puta (do 0,89 g/100 g) do kraja listopada.

Sommavilla i sur. su 2012. godine objavili studiju u kojoj su grafički prikazali sezonske varijacije ukupnih fenola u listovima *C. australis* prikupljenim između 13. travnja 2009. i 23. studenog 2009. Ukupni sadržaj fenola u ekstraktu lišća analiziran je pomoću HPLC/DAD metode. Evidentno je da mlado lišće sakupljeno u travnju sadrži najveću količinu fenola po gramu suhe tvari i da ta količina brzo opada do sredine svibnja. Nakon svibnja razina fenola varira, ali ne pokazuje vidljiv trend ni u jednom smjeru.

Filali-Ansari i sur. 2016.godine iz listova *C. australis* izolirali su  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glukozid i vanilinsku kiselinu .

Ispitan je antioksidacijski i citotoksični učinak listova *C. australis* L. i *C. occidentalis* L., koji su pripisani polarnim frakcijama n-butanola i glavnom izoliranom flavonoidu 2"-galaktozilviteksinu. Novi flavonoidni C-glikozid, 4"- $\alpha$ -ramnopiranozil-2"-O- $\beta$ -D-galaktopiranozilviteksin, izoliran je iz listova obje biljke. Ispitana su antioksidacijska svojstva flavonoidima bogatih n-butanolnih

frakcija listova kao i glavnog izoliranog flavonoida pomoću DPPH testa, ksantin-oksidadom inducirane generacije superoksidnih radikala i mjerenjem peroksidacije lipida stimulirane  $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  u homogenatima tkiva štakora. Svi testirani uzorci imali su značajan učinak hvatanja DPPH radikala. Najveću aktivnost među ispitanim uzorcima pokazao je 2''-O- $\beta$ -galaktopiranozilviteksin (84,8%), slijedi ga frakcija n-butanola (70,3%) i etanolni ekstrakt (67,2%). Zna se da fenolni spojevi inhibiraju stvaranje superoksidnog anionskog radikala u sustavu hipoksantin-ksantin-oksidaza. Izolirani 2''-O- $\beta$ -galaktopiranozilviteksin je pokazao najveću aktivnost s  $\text{IC}_{50}=24,2 \mu\text{M}$ , a slijede ga frakcije n-butanola obiju biljaka s  $\text{IC}_{50}=27,2 \mu\text{M}$ , odnosno  $38,5 \mu\text{M}$ . Etanolni ekstrakt i 2''-O- $\beta$ -galaktopiranozilviteksin pokazali su najveću aktivnost inhibicije peroksidacije lipida stimulirane  $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  u homogenatu tkiva mozga štakora (80,85 odnosno 80,78%). Također je proučavana citotoksična aktivnost pri čemu su stanične linije hepatocelularnog karcinoma, adenokarcinoma debelog crijeva i karcinoma želuca bili najosjetljiviji na aktivnosti ekstrakata (El-Alfy i sur., 2011).

Glavni cilj studije napravljene 2016. godine bio je utvrditi ukupni sadržaj fenola i koncentraciju flavonoida u metanolnim (80%) ekstraktima listova i kore *C. australis* korištenjem spektrofotometrijskih metoda, te ispitati antioksidacijsko djelovanje istih korištenjem *in vitro* modela. Ekstrakti su dobiveni maceracijom. Ukupni sadržaj fenola bio je veći u listovima ( $16.89 \pm 0.73 \text{ mg GA/g}$  suhe biljke) nego u kori ( $5,53 \pm 0,19 \text{ mg GA/g}$  suhe biljke). Koncentracija flavonoida u ekstraktu listova ( $14.00 \pm 0.19 \text{ mg RU/g}$  suhe biljke) bila je veća od one u ekstraktu kore ( $0.17 \pm 0.003 \text{ mg RU/g}$  suhe biljke). Antioksidacijska aktivnost određena je kao sposobnost ekstrakata da hvataju DPPH radikal ili reduciraju  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  (FRAP analiza) pri čemu su pri hvatanju DPPH radikala postigli istu  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti od  $0,12 \text{ mg/ml}$  (list i kora). Sposobnost redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  ispitana je za četiri koncentracije ( $0,02 - 0,2 \text{ mg/ml}$ ). Metanolni ekstrakti lista i kore imali su gotovo istu redukcijsku sposobnost pri niskim koncentracijama, ali pri većim koncentracijama ekstrakt kore pokazalo je nešto veću sposobnost redukcije od ekstrakta listova (Hammash i sur., 2016).

Oštećenja jetre povezuju se s oksidacijskim stresom. U studiji iz 2018. godine istražio se hepatoprotektivan učinak vodeno-alkoholnog ekstrakta *C. australis* na hepatotoksičnost izazvanu s  $\text{CCl}_4$  u miševa. Za procjenu hepatoprotektivne aktivnosti ekstrakta, životinje su prethodno tretirane s 200 i 400 mg/kg ekstrakta intraperitonealno tijekom 7 dana, a zatim su dobile  $\text{CCl}_4$  (0,5

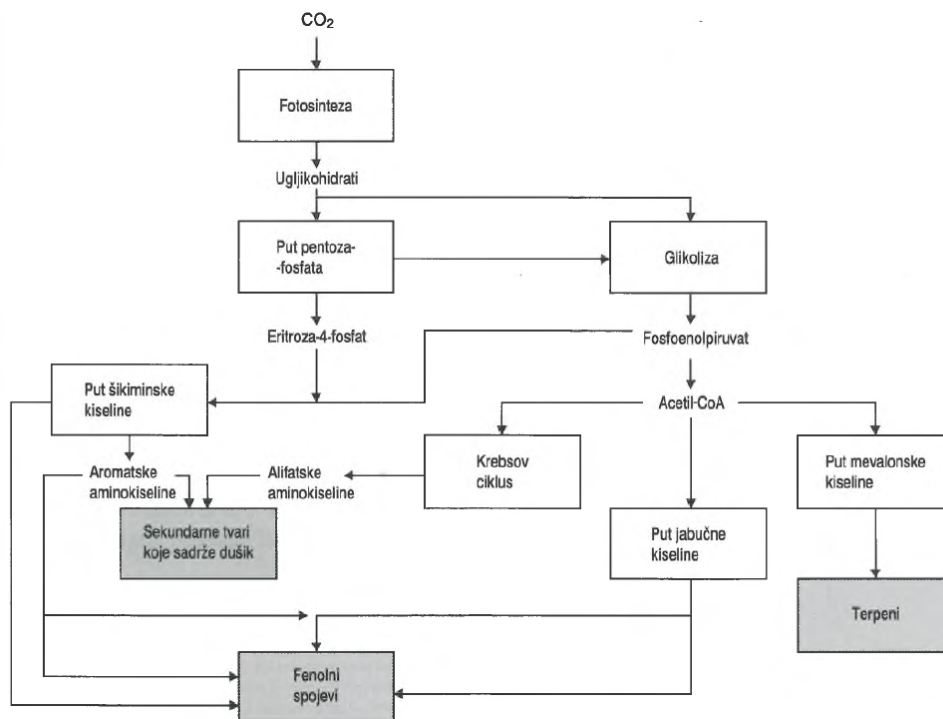
ml/kg u maslinovom ulju). Skupine miševa koje su primile ekstrakt *C.australis* (200 mg/kg i 400 mg/kg) nakon čega je uslijedila injekcija CCl<sub>4</sub> pokazale su značajno smanjenje aktivnosti biokemijskih parametara jetre (ALT, AST i ALP u serumu) u usporedbi sa skupinom koja je samo primala CCl<sub>4</sub>. Rezultati histopatoloških studija pružili su potporu dokazima biokemijske analize; jetra miševa koji su primali visoke doze metanolnih ekstrakata imala su normalnu strukturu (Shokrzadeh i sur.,2018).

### **1.3. Sekundarni metaboliti**

Primarni metaboliti su definirani kao spojevi koji imaju bitnu ulogu u procesima fotosinteze, disanja, rasta i razvoja biljke. Spojevi kao što su: ugljikohidrati, lipidi, nukleotidi, aminokiseline i organske kiseline uključeni su u ovu skupinu (Gómez-Caravaca i sur., 2014). Primarni metaboliti se nalaze u svim biljkama i obavljaju esencijalne metaboličke uloge (Croteau i sur., 2000). Biljke tijekom života proizvode mnogobrojne organske spojeve koji nemaju ulogu u primarnom metabolizmu, a nazivaju se sekundarnim metabolitima. Sekundarni metaboliti su ograničeno raspodijeljeni među vrstama unutar biljnog carstva. Ovi spojevi posjeduju važnu ekološku funkciju u biljkama jer predstavljaju zaštitu od herbivornih organizama i infekcije mikrobima. Sekundarni metaboliti omogućuju primamljivanje oprašivača i životinja koje rasprostranjuju sjemenke, te posreduju u kompeticiji biljka-biljka (Pevalek-Kozlina, 2003 ; Croteau i sur., 2000) . Oni također doprinose specifičnom mirisu, okusu i boji biljke. Neki se sekundarni metaboliti kontinuirano proizvode u biljkama, dok se drugi stvaraju kao odgovor na signale stresa za obranu od biotičkih i abiotičkih stresova. Biotički stres može biti uzrokovan bakterijama, gljivicama, drugim biljkama, kukcima, biljojedima, dok abiotički stres stvaraju visoke i niske temperature, suša, alkalnost, UV zračenje (Gómez-Caravaca i sur., 2014).

Sekundarni metaboliti pokazuju široki raspon bioloških i farmakoloških svojstva. Zbog toga su se neke biljke i produkti izolirani iz njih koristili ili se još uvijek koriste u tretiranju raznih bolesti. U fitoterapiji se obično koriste ekstrakti koji sadrže desetke ili čak stotine sekundarnih metabolita često iz nekoliko različitih strukturnih skupina. Aktivnost samog ekstrakta često je posljedica sinergijskih interakcija nekoliko prisutnih sekundarnih metabolita, što se ne može otkriti kada se pojedinačni spojevi procjenjuju sami. Ovakvi ekstrakti se često koriste za liječenje širokog spektra zdravstvenih poremećaja, a ne jednog stanja. Neki sekundarni metaboliti specifični su za jedan ili

ograničen broj molekularnih ciljeva (alkaloidi), dok većina sekundarnih metabolita prisutnih u ljekovitim biljnim ekstraktima (razni fenoli, terpenoidi) ima više meta, modulirajući aktivnost proteina, nukleinskih kiselina i biomembrana na manje specifičan način (Wink, 2015). Posljednjih godina raste broj istraživanja utjecaja trajnog niskog unosa sekundarnih metabolita na ljudsko zdravlje. Postoji sve više dokaza da dugoročni unosi mogu imati povoljan utjecaj na smanjenje učestalosti karcinoma i mnogih kroničnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti i dijabetes tipa II, koji se sve češće javlja u zapadnim populacijama (Crozier i sur., 2006). Iako se radi o kemijski vrlo složenim spojevima, na temelju načina njihove biosinteze sekundarni metaboliti se mogu podijeliti u tri skupine: (I) terpene, (II) fenolne spojeve, srodne fenolne i polifenolne spojeve, te (III) spojeve koji sadrže dušik i sumpor (Slika 7.) Terpeni su lipidi koji se nastaju iz acetil-CoA putem mevalonske kiseline. Putem šikiminske ili jabučne kiseline se sintetiziraju aromatske tvari koje se nazivaju fenolni spojevi. Sekundarni metaboliti koji sadrže dušik, npr. alkaloidi, primarno nastaju iz aminokiselina (Crozier i sur., 2006; Pevalek-Kozlina, 2003) .



**Slika 7.** Glavni putovi biosinteze sekundarnih metabolita (Pevalek-Kozlina, 2003)

### 1.3.1. Fenolni spojevi

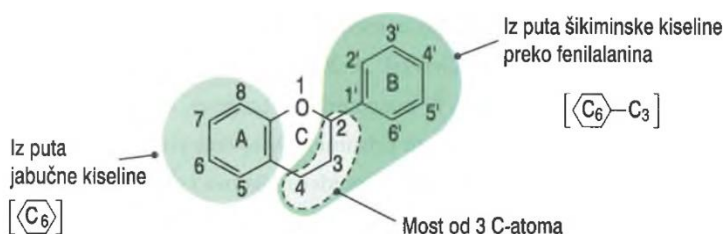
Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni po cijelom biljnom carstvu. To su spojevi koji imaju barem jednu fenolnu, tj. hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. Fenolni spojevi se mogu sintetizirati različitim putevima. Većina biljnih fenolnih spojeva sintetizira se putem šikiminske kiseline, dok put jabučne kiseline nije od nekog značenja u sintezi biljnih fenola. Većina fenolnih spojeva nastaje iz fenilalanina i tirozina uz ključni korak konverzije fenilalanina u cimetnu kiselinu, eliminiranjem jedne molekule amonijaka. Tu reakciju katalizira enzim fenilalanin-amonij-lijaza (Pevalek-Kozlina, 2003). Biljni fenoli su heterogena skupina spojeva raznolikih struktura od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline, do visoko polimeriziranih tvari, kao što su tanini. Većinom se pojavljuju u konjugiranom obliku s jednom ili više šećernih jedinica vezanih za hidroksilne skupine ili izravno vezanih na aromatski atom ugljika. Polifenoli su prisutni u biljkama kao aglikoni, glikozidi, esteri ili polimeri. Zabilježeno je više od 8000 različitih fenolnih struktura (Gómez-Caravaca i sur., 2014; Vladimir-Knežević i sur., 2012). Mogu se svrstati u različite skupine prema broju fenolnih prstenova u strukturi te prema strukturnim elementima koji povezuju međusobno te prstenove. Tako postoje: flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Vladimir-Knežević i sur., 2012). Crozier i sur., (2006) su pojednostavljeno podijelili fenolne spojeve u dvije skupine gdje jednu skupinu čine flavonoidi ,a drugu neflavonoidni fenolni spojevi. Skupinu neflavonoida čine C6-C1 fenolne kiseline (galna kiselina kao prekursor hidrolizirajućih tanina) ,C6-C3 hidroksicinamati i njihovi konjugirani derivati te C6–C2–C6 polifenolni stilbeni .

#### 1.3.1.1. Flavonoidi i antocijani

Flavonoidi su najbrojnija skupina biljnih polifenola s više od 6000 identificiranih struktura i nalaze se u cijelom biljnom carstvu (Vladimir-Knežević i sur., 2012; Crozier i sur., 2006). To su derivati 1,3-difenilpropana strukturne formule C6-C3-C6 s različitim stupnjem oksidacije središnjeg piranskog prstena (Shahidi i Nazck, 2004). Sastoje se od petnaest ugljika raspoređenih u dva aromatska prstena spojena mostom od tri ugljika (Crozier i sur., 2006). Ova struktura je rezultat dva različita biosintetska puta (Slika 8.). Aromatski prsten B i most nastaju sintezom iz fenilalanina u putu šikiminske kiseline, dok šest ugljikovih atoma prstena A proizlazi iz tri acetatne jedinice puta jabučne kiseline. Spajanje ova dva dijela strukture katalizira enzim halkon-sintetaza (Pevalek-Kozlina, 2003). Osnovni stuktorni kostur flavonoida može imati brojne supstituente. Hidroksilne skupine su obično prisutne na pozicijama 4,5 i 7. Šećeri su vrlo česti supstituenti jer mnogi



flavonoidi prirodno postoje kao glikozidi. Dok šećeri i hidroksilne skupine povećavaju topljivost flavonoida u vodi, drugi supstituenti poput metilnih skupina i izopentenilnih jedinica čine flavonoide lipofilnima (Crozier i sur., 2006; Pevalek-Kozlina, 2003). S obzirom na stupanj oksidacije mosta od tri ugljikova atoma flavonoidi se mogu klasificirati na antocijanine, flavone, flavonole i izoflavone. Dvije glavne podskupine flavonoida su flavoni i flavonoli koji su prisutni u cvjetovima i listovima svih zelenih biljaka. Oni se nakupljaju u epidermi listova i stabljike te štite biljke od UV-B zračenja, tj. apsorbiraju u UV-B području spektra (Pevalek-Kozlina, 2003). U visokim koncentracijama nađeni su u epidermi lišća i u plodovima, a mogu se pronaći i u korijenu, stabljikama te u cvjetovima (Feng i sur., 2017; Crozier i sur., 2006). Flavonoidi imaju važne i raznolike uloge u biljkama. Uključeni su u razne procese poput UV zaštite, pigmentacije, u fiksiranju dušika, u pružanju otpornosti na bolesti i u obrani (Crozier i sur., 2006; Pevalek-Kozlina, 2003). Flavonoidi utječu na mnoge interakcije između biljaka i životinja (Croteau i sur., 2000). Predmet mnogih istraživanja su razni potencijalni učinci flavonoida poput modulacije imunoloških i upalnih odgovora, utjecaja na funkciju glatkih mišića, antikancerogenog, antivirusnog, antitoksičnog, antidijabetičkog i hepatoprotektivnog djelovanja (Wang i sur., 2018; Croteau i sur., 2000). Neki flavonoidi pak posjeduju antioksidativno djelovanje jer imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala u organizmu. Nadalje, flavonoidi posjeduju različite farmakološke aktivnosti poput inhibicije aktivnosti enzima i protuupalnog djelovanja te mogu doprinijeti prevenciji degenerativnih bolesti, tumora, starenja ili kardiovaskularnih bolesti. Dodatno, postoji mogućnost primjene određenih flavonoidnih spojeva kao slabih hormona u liječenju menopauzalnog sindroma žena (Feng i sur., 2017).



**Slika 8.** Ugljični kostur flavonoida. Flavonoidi se sintetiziraju iz produkata puta šikiminske i jabučne kiseline (Pevalek-Kozlina, 2003).

Antocijanini su obojeni flavonoidi prisutni u cvjetovima i plodovima (Pevalek-Kozlina, 2003). Antocijanini sudjeluju u zaštiti biljaka od prekomjerne svjetlosti zasjenjivanjem stanica mezofila

lista i pomažu primamljivanju insekata i raznih životinja za oprašivanje i rasprostranjivanje sjemenaka (Crozier i sur., 2006 ; Pevalek-Kozlina,2003). Oni daju većinu crvene, ružičaste i plave boje biljkama. To su glikozidi sa šećerom najčešće na položaju 3, a rjeđe na drugim položajima. Bez svog šećera, aglikoni se nazivaju antocijanidini (Pevalek-Kozlina,2003). Poznato je šest antocijanidina: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delphinidin, petunidin i malvidin (Crozier i sur., 2006). Na boju antocijanina utječu brojni čimbenici poput broja hidroksilnih i metoksilnih skupina na prstenu B antocijanidina , prisutnosti kelatnih metala (Fe i Al), prisutnosti flavona i flavonskih kopigmenata, te pH vrijednosti vakuole u kojoj su pohranjeni. Veći broj OH skupina daje plavije tonove jer rezultira apsorpcijom većih valnih duljina. Zamjena OH skupine metoksilnom skupinom daje crveniju boju zbog apsorpcije kraćih valnih duljina (Pevalek-Kozlina, 2003).

#### **1.3.1.2. Tanini (trjeslovine)**

Tanini su biljni fenolni polimeri molekularne mase između 600 i 3000 Da. Oni imaju obrambena svojstva zahvaljujući njihovoj sposobnosti da vežu proteine. Postoje kondenzirani tanini i tanini koji se mogu hidrolizirati (galotanini i elagitanini). Kondenzirani tanini su oligomeri i polimeri flavonoidnih jedinica, posebno flavan-3-ola. Tanini koji se mogu hidrolizirati su heterogeni polimeri koji sadrže fenolne kiseline npr. galnu kiselinu i jednostavne šećere. Oni su manji od kondenziranih tanina i mogu se hidrolizirati djelovanjem razrijeđene kiseline. Tanini čine biljke nejestivima i tako odvrćaju većinu životinja od hranjenja biljkama koje ih sadrže. Mnogi nezreli plodovi imaju vrlo visok sadržaj tanina koji opada kako plodovi sazrijevaju. U ljudi vežu proteine slina pa uzrokuju oštar i stežući osjećaj u ustima. Blaga trpkost pojačava okus i teksturu brojnih prehrambenih proizvoda i pića. Tanini mogu inaktivirati probavne enzime biljojeda pri čemu se stvaraju agregati tanina i biljnih proteina koji su teško probavljivi. Herbivori su razvili zanimljive prilagodbe za uklanjanje tanina iz probavnog sustava. Biljni tanini služe i za obranu od mikroorganizama (Crozier i sur., 2006; Shahidi i Nazck, 2004; Pevalek-Kozlina, 2003).

#### **1.3.1.3. Fenolne kiseline**

Fenolne kiseline su najčešći neflavonoidni fenoli široko rasprostranjeni po cijelom biljnom carstvu. Na osnovu strukture, dijele se u dvije skupine: hidroksicimetne (C6-C3) i hidroksibenzojeve (C6-C1) kiseline. Broj i položaj hidroksilnih i metoksilnih skupina na benzenskim prstenovima daju različite derivate tih kiselina (Vladimir-Knežević i sur., 2012; Robbins, 2003). Naziv „fenolne kiseline“ ,općenito, opisuje fenole koji posjeduju jednu funkcionalnu karboksilnu skupinu (Kumar

i Goel, 2019; Robbins, 2003). Samo manji dio fenolnih kiselina postoji u slobodnom obliku, dok je većina je povezana esterskim, eterskim ili acetalnim vezama bilo na strukturne komponente biljke (celuloza, proteini, lignin), veće polifenole (flavonoide) ili manje organske molekule (npr. glukoza, kininska kiselina) (Vladimir-Knežević i sur., 2012 ; Robbins, 2003). Obično postoje kao amidi, esteri ili glikozidi (Kumar i Goel, 2019). Hidroksibenzojeve kiseline imaju zajedničku strukturu C6-C1 i izvedene su iz benzojeve kiseline. Nalaze se u topljivom obliku (konjugirani sa šećerima ili organskim kiselinama) i vezane za frakcije stanične stijenke npr. za lignin. Četiri najčešće pronađene hidroksibenzojeve kiseline su p-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina (Kumar i Goel, 2019). Galna kiselina, koja se ubraja u hidroksibenzojeve kiseline, je osnovna jedinica galotanina (Crozier i sur., 2006). Hidroksicimetne kiseline, dobivene iz cimetne kiseline, često dolaze kao jednostavni esteri s kininskom kiselinom ili glukozom kao npr. klorogenska kiselina koja je ester kafeinske i kininske kiseline. Četiri najčešće hidroksicimetne kiseline su ferulična, kafeinska, p-kumarinska i sinapinska kiselina (Kumar i Goel, 2019).

Iako je još mnogo toga nepoznato u pogledu uloge fenolnih kiselina u biljkama, one su povezane s različitim funkcijama uključujući hranjivi unos, sintezu proteina, aktivnost enzima, fotosintezu, strukturne komponente i alelopatiju (Kumar i Goel, 2019; Robbins, 2003). Derivati benzojeve i cimetne kiseline postoje u gotovo svim biljnim namirnicama: u voću, povrću i žitaricama. Nalaze se u cijeloj biljci (u sjemenkama, listovima, korijenima i stabljikama), iako nisu homogeno raspoređene po biljnim tkivima. Postoji velika varijabilnost u sadržaju tijekom različitih faza sazrijevanja i različitih uvjeta uzgoja, kao što je temperatura (Robbins, 2003). Fenolne kiseline se lako apsorbiraju kroz stijenku crijeva. One su korisne za ljudsko zdravlje zbog svojeg potencijalnog antioksidativnog učinka kojim mogu spriječiti oštećenje stanica uzrokovano reakcijama oksidacije. Fenolne kiseline posjeduju mnogo jače in vitro antioksidativno djelovanje od nekih dobro poznatih vitamina (Kumar i Goel, 2019). Interes za fenolne kiseline proizlazi iz njihove potencijalne zaštitne uloge, kroz unos voća i povrća, protiv bolesti uzrokovanih oksidativnim oštećenjem; koronarne bolesti srca, moždanog udara i raka (Robbins, 2003). Postoje studije s dokazima o njihovom antioksidativnom učinku kao i brojnim drugim zdravstveni zaštitnim učincima kao što su antimikrobni, antikancerogeni, protuupalni i antitumorigeni (Kumar i Goel, 2019).

### **1.3.2. Terpeni**

Terpeni ili terpenoidi su najveća skupina sekundarnih metabolita. Oni se sintetiziraju iz izopentenskih jedinica koje sadrže pet ugljikovih atoma i netopivi su u vodi. Pri visokim temperaturama terpeni se mogu razgraditi do izoprena pa se njihovi osnovni strukturni elementi ponekad nazivaju izoprenskim jedinicama. Terpeni se klasificiraju na: monoterpene koji sadrže dvije C5 jedinice (10 C-atoma), seskviterpene sa tri C5 jedinice, diterpene sa četiri C5 jedinice, triterpene sa šest C5 jedinica, tetraterpene sa osam C3 jedinica i politerpenoide sa  $(C_5)_n$  jedinica (gdje je  $n > 20$ ). Steroidi su derivati triterpena i komponenta su stanične membrane. Neki biljni terpeni su sekundarni metaboliti uključeni u obranu biljaka i otrovni su za mnoge kukce i sisavce (Pevalek-Kozlina, 2003).

#### **1.3.2.1. Triterpeni i saponini**

Triterpeni sadrže 30 C-atoma. U tu skupinu se ubrajaju steroidi od kojih su mnogi modificirani i sadrže manje od 30 ugljikovih atoma. Mnogi steroidni alkoholi (steroli) su važan sastojak biljne plazmatske membrane, dok su neki, kao npr. fitoekdisoni, važne obrambene tvari (Pevalek-Kozlina, 2003).

Saponini su sekundarni metaboliti koji imaju svojstva detergenata zahvaljujući svojoj strukturi. Triterpen topljiv u lipidima i šećerni dio strukture topljiv u vodi zajedno daju površinski aktivna svojstva. Saponine proizvode mnoge biljne vrste i njihova uloga u biljkama je vjerojatno u pružanju zaštite protiv napada potencijalnih patogena. Njihova toksičnost je rezultat oštećivanja membrane i hemolize eritrocita. Mogu se podijeliti u dvije skupine : (I) steroidni saponini, koji su gotovo isključivo prisutni u jednosupnicama i (II) triterpenoidni saponini koji se javljaju uglavnom u dvosupnicama. Saponini pokazuju antifungalni, antibakterijski, antimikrobni, antiparazitski i antitumorski učinak, a uz to i protuupalno djelovanje (Gómez-Caravaca i sur., 2014 ; Pevalek-Kozlina, 2003).

#### 1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi

Metaboličkim procesima u stanicama nastaju slobodni radikali i reaktivne kisikove vrste, prvenstveno tijekom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijima. Slobodni radikali imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskom elektronskom omotaču zbog čega posjeduju veliku reaktivnost koja je ključ njihovog štetnog djelovanja. Slobodni radikali su molekule ili dijelovi molekule kratkog poluživota i niske specifičnosti. Oni stupaju u reakciju sa prvom susjednom molekulom (proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinskih kiselina) i uzimaju njen elektron kako bi postigli elektronsku stabilnost, a pritom iz susjedne molekule nastaje novi slobodni radikal. Nastali slobodni radikali ulaze dalje u reakcije s drugim molekulama u svojoj blizini, pokrećući niz lančanih reakcija, što može dovesti do oštećenja staničnih komponenti poput DNA, proteina i lipida stanične membrane. Dok lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji pri čemu nastaju reaktivni aldehidi, proteini mogu izgubiti svoju funkciju, a oštećenje DNA potaknuti nastanak mutacija. Najveći broj slobodnih radikala nastaje od reaktivnih oblika kisika (engl. reactive oxygen species, ROS) i od reaktivnih oblika dušika (engl. reactive nitrogen species, RNS). U ROS se ubrajaju radikali kisika i njegovi reaktivni neradikalni derivati: superoksidni anion, perhidroksilni radikal, hidroksilni radikal, vodikov peroksid, hipokloritna kiselina itd. U RNS ubrajaju se dušikov (II) oksid, dušikov (IV) oksid, te nitrozilni kation i peroksinitrit. ROS i RNS istovremeno su štetni i korisni oblici (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Oksidativni stres nastaje uslijed neravnoteže između proizvodnje i uklanjanja slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta koje uzrokuju oksidaciju važnih biomolekula. Ta neravnoteža dovodi do staničnog oštećenja, poremećaja u funkciji stanica (uključujući i imunosne stanice), smrti te oštećenja važnih biomolekula i organa s potencijalnim utjecajem na cijeli organizam (Kindl i sur., 2015; Vladimir-Knežević i sur., 2011). Preciznije, oksidacijski stres je poremećaj ravnoteže prooksidacijskog i antioksidacijskog sustava u korist prooksidacijskog sustava (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Tu ravnotežu, u biljkama, može poremetiti nekoliko čimbenika poput niske temperature i soli; dovodeći biljke u uvjete oksidativnog stresa. Kako bi izbjegle štetu uzrokovanu ROS-om, biljke su razvile enzimske i neenzimatske sustave za čišćenje tih reaktivnih vrsta (Rodrigo i Libuy, 2014).

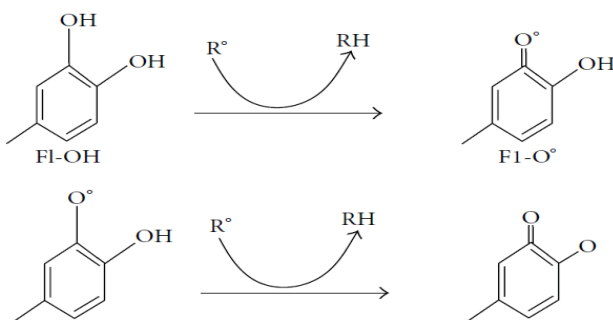
Sve one tvari koje u maloj količini, u kratkome vremenu, neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa nazivaju se antioksidansi. Antioksidansi mogu onemogućiti stvaranje slobodnih radikala u organizmu, uništiti već stvorene slobodne radikale ili sudjelovati u popravku

oštećenja u stanici nastalog djelovanjem slobodnih radikala. Antioksidansi mogu nastati u stanici ili se u organizam unose dodacima prehrani ili hranom. Antioksidansi se dijele na antioksidacijske enzime i malene molekule antioksidansa dobro topive u lipidima ili topive u vodi. Antioksidacijski enzimi, nastali u stanicama, razgrađuju aktivne oblike kisikovih radikala u nenabijene neaktivne molekule. Također postoji skupina enzima koji repariraju oštećene molekule DNA i proteina (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). To su npr. superoksid dismutaza za uklanjanje superoksidnoga radikala, katalaza, te glutation peroksidaza za uklanjanje vodikova peroksida i organskih peroksida (Štefan i sur., 2007). Drugu skupinu čine tzv. čistači slobodnih radikala. Čistači su molekule koje pretvaraju nezasićene, vrlo reaktivne molekule slobodnih radikala u zasićene, neaktivne i bezopasne oblike koji ne remete aktivnost organizma. Također, ovi antioksidansi mogu vezati potencijalno opasne metalne ione i spriječiti da sudjeluju u stvaranju slobodnih radikala. Ovu skupinu čine: vitamini A, C i E, beta-karoten, bilirubin, mokraćna kiselina, glutation, reducirani glutation, oksidirani glutation, koenzim Q10, albumin, transportni proteini i proteini odgovorni za deponiranje iona željeza i bakra i dr. (Parčetić-Kostelac i sur., 2016).

Iako, ROS i RNS igraju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima i uključene su u obranu domaćina, prekomjerna proizvodnja ovih vrsta može oštetiti ključne biomolekule te može uzrokovati oštećenje DNK koje može dovesti do mutacija. Ako ROS nisu učinkovito uklonjeni mogu stimulirati lančane reakcije slobodnih radikala koje naknadno oštećuju stanične biomolekule kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline i na kraju dovode do mnogih akutnih i kroničnih bolesti. ROS doprinose imunopatologiji velikog broja stanja uključujući razne upalne bolesti, kardiovaskularne, neurodegenerativne rak, aterosklerozu, dijabetes melitus, hipertenziju, AIDS i starenje (Kindl i sur., 2015; Wu i sur., 2011; Awah i Verla, 2010; Tohma i Gulçin, 2010).

Unutar carstva biljaka postoji širok raspon spojeva koji pokazuju antioksidacijsko djelovanje. Polifenoli se smatraju izvrsnim prirodnim antioksidansima, a spojevi poput flavonoida, fenolnih kiselina i tanina najviše doprinose antioksidacijskom djelovanju ljekovitog bilja, voća i povrća. Antioksidacijsko djelovanje polifenola je široko. Oni djeluju kao redukcijski agensi, donori vodika i čistači slobodnih radikala, a uz to imaju i sposobnost keliranja metala (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Biljni polifenoli dobivaju sve veći znanstveni interes zbog dobrih učinaka u prevenciji raznih bolesti povezanih s oksidativnim stresom, a znanstvena zajednica predstavila je mnogo radova koji se usredotočuju na njihovo antioksidacijsko djelovanje (Kindl i sur., 2015).

Antioksidacijsko djelovanje flavonoida ovisi o rasporedu funkcionalnih skupina, konfiguraciji, supstituciji i ukupnom broju hidroksilnih skupina. Hidroksilna skupina B prstena je najznačajnija za uklanjanje ROS i RNS jer donira vodik i elektron na hidroksilne, peroksilne i peroksinitritne radikale i stabilizira ih pri čemu se stvara i relativno stabilan flavonoidni radikal. Zbog njihovog nižeg redoks potencijala flavonoidi su termodinamički sposobni reducirati visoko oksidirajuće slobodne radikale donacijom vodikovog atoma. Svojom sposobnosti keliranja metalnih iona (željeza, bakra itd.), također inhibiraju slobodne radikale. Flavonoidi imaju sposobnost induciranja ljudskih zaštitnih enzimskih sustava, a smatra se da imaju ulogu i u inhibiciji oksidativne modifikacije LDL kolesterola koja je ključna tijekom procesa ateroskleroze (Kumar i Pandey, 2013).



**Slika 9.** Hvatanje ROS ( $R^{\circ}$ ) flavonoidima (Fl-OH) (Kumar i Pandey, 2013).

Utvrđivanje oksidacijskog stresa, npr. tijekom fizičke aktivnosti ili određenih bolesti i poremećaja, važno je zbog mogućeg pravovremenog uključivanja antioksidansa npr. u dodacima prehrani koji povećavaju antioksidacijski kapacitet ljudskog organizma. Sportaši često koriste razne OTC preparate s dodatkom antioksidansa kako bi djelovali protiv povećanog oksidacijskog stresa koji se javlja pri fizičkim naporima (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Antioksidansi se koriste kao dodaci hrani, za stabilizaciju hrane koja u prisutnosti kisika i drugih reaktivnih kisikovih vrsta može značajno izgubiti na kvaliteti uslijed razvoja užeglosti, radi oksidacije nezasićenih masti, što rezultira neugodnim mirisom i okusom te promjenom boje zbog oksidacije pigmentata ili druge komponente hrane (Awah i Verla, 2010., Tohma i Gulçin, 2010). U današnje vrijeme najviše korišteni antioksidansi BHA (butilhidroksi anizol) i BHT (butilhidroksi toluen) su ograničeni zakonskim propisima zbog sumnje u njihovu toksičnost i kancerogene učinke; stoga raste interes za prirodnim i sigurnijim antioksidansima u hrani (Tohma i Gulçin, 2010). Antioksidansi biljnog porijekla mogli bi biti korisni kao aditivi u hrani za sprječavanje kvarenja hrane, ali i za ljudsko



zdravlje u sprječavanju bolesti povezanih s oksidacijskim stresom (Awah i Verla, 2010). U posljednje vrijeme dolazi do povećanog zanimanja za antioksidanse biljnog podrijetla budući da imaju obećavajuće terapijske učinke na bolesti izazvane slobodnim radikalima (Kindl i sur., 2015; Awah i Verla, 2010).

### **1.5. Lipidna peroksidacija**

Peroksidacija lipida je proces u kojem oksidansi poput slobodnih radikala napadaju lipide koji sadrže ugljik-ugljik dvostruku vezu, posebno polinezasićene masne kiseline (PUFA) (Ayala i sur., 2014). Kao rezultat oksidacijskog stresa javljaju se lipidna peroksidacija i oksidacija proteina. Oksidacija rezultira stvaranjem vodikovog peroksida koji prelazi u reaktivni hidroksilni radikal (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal napadajući susjedne PUFA i oduzimajući im atom vodika. PUFA mogu dalje uzimati atome vodika drugim biološkim molekulama, uključujući tirole, što dovodi do stvaranja sumpornih radikala. Oni se mogu kombinirati s kisikom kako bi se stvorili sumporni radikali koji mogu oštetiti biološke molekule (Vladimir-Knežević i sur., 2011; Wu i sur., 2011). Kako je moždano tkivo obogaćenom višestruko nezasićenim masnim kiselinama, lipidna peroksidacija se lako provodi u njemu (Wu i sur., 2011). Visok sadržaj lipida u staničnim membranama čini ih jednim od glavnih meta reaktivnih vrsta kisika. Lipidna peroksidacija je određeni pokazatelj oksidativnog stresa u stanicama i tkivima. Uključena je u patogenezu raznih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, rak i neurodegenerativni poremećaji kao i u procese starenja (Güneş i sur., 2019; Ramana i sur., 2013). Glikolipidi, fosfolipidi i kolesterol također su mete štetne peroksidacijske modifikacije. Kao odgovor na peroksidaciju membranskih lipida, stanice mogu promovirati preživljenje stanice ili inducirati staničnu smrt. Oba procesa na kraju dovode do molekularnog oštećenja stanica koje može olakšati razvoj raznih patoloških stanja i potaknuti ubrzano starenje (Ayala i sur., 2014).

Antioksidansi mogu djelovati višestruko na proces lipidne peroksidacije. Oni mogu: spriječiti započinjanje lipidne peroksidacije hvatajući radikale koji mogu oduzeti vodik, smanjiti lokalnu koncentraciju kisika, ukloniti reaktivni kisik (koji može reagirati izravno s lipidima stanične membrane i stvarati peroksidge), vezati ione željeza i bakra, enzimi ukloniti peroksidge te prekinuti lanac lipidne peroksidacije uklanjanjem peroksil i alkoksil radikala. Antioksidansi obično koriste više mehanizama koji se međusobno nadopunjuju (Parčetić-Kostelac i sur., 2016).

Glavni primarni proizvodi lipidne peroksidacije su lipidni hidroperoksidi. Hidroperoksidi se također mogu razgraditi redukcijom i tako sudjelovati u širenju lančane reakcije, tj. mogu inducirati stvaranje novih hidroperoksida. U nizu lančanih reakcija nastaju višestruke razgradne molekule, kao što su malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE). Smatra se da je MDA najmutageni proizvod peroksidacije lipida, dok je 4-HNE najtoksičniji (Ayala i sur., 2014). Produkti lipidne peroksidacije, posebno aldehidi, puno su stabilniji od matičnih ROS i stoga mogu difundirati i nanijeti štetu dalje od mjesta nastanka. Oni mogu proširiti oštećenja koje pokreće ROS. Produkti lipidne peroksidacije su vrlo reaktivni i uzrokuju promjene u staničnoj signalizaciji i proteinima, te oštećuju DNK i stanice. Povećano stvaranje lipidnih peroksida i aldehida uočeno je kod ateroskleroze, ishemije, zatajenja srca, Alzheimerove bolesti, reumatoidnog artritisa, raka i drugih imunoloških poremećaja (Ramana i sur., 2013). ROS i RNS također doprinose kvarenju hrane. Oksidativna razgradnja lipida glavni je ograničavajući čimbenik rok trajanja namirnica. Lipidna peroksidacija je općenito odgovorna za propadanje hrane koja sadrži lipide pri čemu hrana gubi nutritivnu vrijednost i mijenja se njen kemijski sastav. Korištenje antioksidansa tijekom proizvodnog procesa može minimizirati učinak lipidne peroksidacije (Ayala i sur., 2014).

## **1.6. NO i učinci**

Dušikov monoksid bioaktivna je molekula i slobodni radikal koji ima vrlo važnu fiziološku ulogu. Sintetizira se iz aminokiseline L-arginina u nizu tkiva djelovanjem jedne od tri izoforme enzima sintaze dušikovog oksida, od kojih je jedna inducibilna i može stvarati velike količine NO. NO može stupiti u interakciju s proteinima koji sadrže željezo vežući se za hem. Na ovaj način NO aktivira enzim topljivu gvanilil ciklazu, koja sadrži hem, te dolazi do proizvodnje signalne molekule cikličkog GMP. NO je važna signalna molekula koja se može naći kao neurotransmiter u određenim vrstama živaca, a također je važan dio nespecifičnog imunskog odgovora na napad mikroorganizama, uz ostale slobodne radikale. NO inhibira kontrakcije glatkih mišića, dovodeći do opuštanja, čime se povećava protok krvi i spušta krvni tlak. NO može difundirati iz endotela u krvnu cirkulaciju i utjecati na aktivnost trombocita kontrolirajući i sprječavajući agregaciju trombocita (Bruckdorfer, 2005).

Bez obzira na sve fiziološke uloge NO, povećana proizvodnja NO može pridonijeti patogenezi neurodegenerativnih bolesti i upalnim ozljedama tkiva. NO može pridonijeti oksidativnom oštećenju stupajući u reakciju sa superoksidom pri čemu nastaju visoko reaktivne dušikove vrste

(Kindl i sur., 2015). Nastali oksidansi zatim modificiraju proteine nitrozacijom i nitriranjem tiolnih skupina proteina i aromatskih aminokiselina što rezultira modifikacijom funkcije istih. Peroksinitrit je snažan oksidans koji napada proteine, nukleinske kiseline i oksidira lipide. Peroksinitrit modificira proteine oksidacijom tiola ili nitriranjem aromatskih aminokiselina. Izlaganje proteina peroksinitritu u epruveti dovodi do gubitka njegovih bioloških svojstava ,ali pitanje je događa li se to in vivo. Ova svojstva peroksinitrita povezuju se s patologijom brojnih bolesti, uglavnom upalnih bolesti poput Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa (Bruckdorfer, 2005).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Biološki aktivni spojevi iz ljekovitog bilja postali su predmet zanimanja i mnogi su se istraživači usredotočili na proučavanje tradicionalnih biljnih lijekova zbog njihove sigurnosti i minimalnih nuspojava. Trenutno je velika pažnja usmjerena na korištenje prirodnih antioksidansa za zaštitu ljudskog tijela od oksidativnog oštećenja, zbog sumnje u toksičnost i kancerogene učinke sintetskih antioksidansa. Antioksidansi biljnog porijekla mogli bi biti korisni kao aditivi u hrani za sprječavanje kvarenja hrane, ali i za ljudsko zdravlje i sprječavanje bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Biljni polifenoli dobivaju sve veći znanstveni interes zbog svojih snažnih antioksidacijskih svojstava i potencijalnih učinaka u prevenciji raznih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom kao što su: kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, rak, dijabetes, autoimuni poremećaji i neke upalne bolesti. Polifenolni spojevi poput flavonoida, fenolnih kiselina i tanina smatraju se glavnim čimbenicima antioksidacijskog djelovanja ljekovitog bilja, voća i povrća.

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je ispitati fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje vrste *Celtis australis*.

Metoda tankoslojne kromatografije korištena je za identifikaciju bioaktivnih spojeva ( fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina, fitosterola, triterpenskih kiselina i saponina). Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina i antocijana određen je spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata plodova i listova *C.australis*, ispitan je spektrofotometrijskim određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala, sposobnosti hvatanja NO radikala i sposobnosti redukcije željeza (3+) u željezo (2+).

## 2. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Istraživani biljni materijal

Za potrebe eksperimentalnog dijela rada korišteni su na sobnoj temperaturi osušeni i prikladno usitnjeni plodovi i listovi vrste *Celtis australis* L. , sakupljeni u jesen 2020. godine u okolici Pule.

### 3.2. 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 ( $\gamma$ -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)

### 3.3. Reagensi, kemikalije i ostali standardi

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 korišteni su:

- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev(III) klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- bezvodni natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kloridna kiselina 37 % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina  $\geq 99,5$  % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)

Za kvantitativno određivanje antocijana upotrebljeni su :

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

Za kvantitativno određivanje fenolnih kiselina korišteni su:

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

Za kvantitativno određivanje trjeslovina korišteni su:

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

Za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala korišteni su:

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

Za određivanje sposobnosti redukcije korišteni su:

- 0,2 M fosfatni pufer (pH 6,6) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev heksacijanoferat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- trikloroocetna kiselina (Fluka, Buchs, Švicarska)
- željezov (III) klorid (Fluka, Buchs, Švicarska)

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)



### **3.4. Analiza sastavnica metodom tankoslojne kromatografije**

#### **3.4.1. Priprema uzoraka i standarda**

Očišćeni biljni materijal (plodovi ili listovi) se suši na zraku te samelje u prah (električnim mlincem). Uzima se po 1 g praškastog uzorka i ekstrahira 10 minuta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 60 °C, uz povratno hladilo. Dobiveni filtrati koriste su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti flavonoida, fenolnih kiselina, trjeslovina, saponina, triterpenskih kiselina i fitosterola.

Otopine standardnih flavonoidnih glikozida (kvercitrin, izokvercitrin i rutin) i fenolnih kiselina (klorogenska i ružmarinska kiselina) pripremaju su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05 %. Otopina standardnih trjeslovina (galna kiselina) pripremljena je otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05%. Otopina standardnih saponina pripremljena je otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05%. Otopine standardnih triterpenskih spojeva i fitosterola (stigmasterol i  $\beta$ -sitosterol) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05% (Wagner i Bladt, 1996).

#### **3.4.2. Ispitivanje flavonoida**

TLC analiza flavonoidnih glikozida provodi se na pločama s tankim slojem silikagela 60 F254, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci i otopine poredbenih supstancija (10  $\mu$ L). Za ispitivanje je korištena pokretna faza: etilacetat-mravlja 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 i Bladt, 1996).

#### **3.4.3. Ispitivanje fenolnih kiselina**

Dokazivanje fenolnih kiselina provodi se TLC analizom na pločama s tankim slojem silikagela 60 F254, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci i otopine standarda (10  $\mu$ L). Za ispitivanje je korištena pokretna faza: diizopropileter-aceton-mravlja kiselina u volumnom omjeru 5:3:1:1. 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 i Bladt, 1996).

#### **3.4.4. Ispitivanje tjeslovina**

TLC analiza trjeslovina provodi se na pločama s tankim slojem silikagela 60 F254, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci i otopine poredbenih supstancija (10 µL). Za ispitivanje je korištena 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 i Bladt, 1996).

#### **3.4.5. Ispitivanje triterpenskih kiselina i fitosterola**

TLC analiza triterpenskih kiselina i fitosterola provodi se na pločama s tankim slojem silikagela 60 F254, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci i otopine poredbenih supstancija (10 µL). Za ispitivanje je korištena 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 i Bladt, 1996).

### **3.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola**

#### **3.5.1. Određivanje flavonoida**

Određivanje sadržaja flavonoida provodi se spektrofotometrijskom metodom prema europskoj farmakopeji (EDQM 2019.).

##### Izrada ekstrakta:

0,600 g usitnjenog suhog biljnog materijala 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. Zatim se sadržaj tikvice filtrira preko malo pamuka, a ostatke biljne droge u tikvici i na pamuku (zajedno s pamukom) ponovo ekstrahira dva puta s po 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Filtrati se sjedine i ohlade te filtriraju preko filter-papira uz ispiranje tikvice u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopuni acetonom do oznake. Nakon toga, 20,0 mL acetonskog ekstrakta se prenese u lijevak za odjeljivanje i pomiješa s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku se mućka najprije s 15 mL etilacetata, a zatim tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjeni etilacetatni ekstrakti se dodatno 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:

U odmjernu tikvicu od 25 mL se prebaci 10,0 mL dobivenog ekstrakta, doda se 1,0 mL aluminijevog klorida i razrijedi 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake.

Poredbena otopina:

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

Apsorbancija ispitivane otopine mjeri se nakon 30 minuta na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu (ZERO BASE).

Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je pomoću specifične apsorbancije izokvercetrozida na 425 nm koja iznosi 500. Maseni udio flavonoida izračunat je prema izrazu:

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

gdje je  $A$  apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm, a  $m$  je masa droge (g).

### **3.5.2. Određivanje antocijana**

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

Izrada ekstrakta :

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).

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).

### 3.5.3. Određivanje fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih kiselina provodi se spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (EDQM 2019.).

Postupak se razlikuje ovisno o tome prema kojoj se fenolnoj kiselini, klorogenskoj ili ružmarinskoj, iskazuju rezultati. Glavna razlika je u valnoj duljini na kojoj se mjeri apsorbancija ispitivane otopine. U nastavku se vrijednosti navedene u zagradama odnose na postupak kada se sadržaj izražava kao klorogenska kiselina.

#### Izrada ekstrakta:

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

#### Ispitivana otopina:

1 mL dobivenog ekstrakta se prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL i doda se redom: 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa te 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 serazrijedi destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Ako se pak udio fenolnih kiselina izražava kao ružmarinska kiselina, potrebno je 1,0 mL ekstrakta pomiješati s 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline te 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida i razrijediti destiliranom vodom do 10 mL.

Odmah se izmjeri apsorbancija ispitivanih otopina na 505 (525) nm u odnosu na poredbenu otopinu (ZERO BASE).

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.

#### **3.5.4. Određivanje trjeslovina**

Određivanje sadržaja trjeslovina provodi se spektrofotometrijski prema europskoj farmakopeji (EDQM 2019.).

##### Izrada ekstrakta:

1,000 g praškasto usitnjene biljne droge 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 se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL te nadopuni vodom do oznake. Potrebno je pustiti da se čestice istalože. Ekstrakt se zatim profiltrira preko filter-papira, a prvih 50 mL filtrata se odbaci.

##### Određivanje ukupnih polifenola:

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 (290g/L) do oznake. Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (ZERO BASE).

##### Određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (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 (290g/L). Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (ZERO BASE).

##### Priprema standarda:

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-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode te nadopuni do oznake otopinom natrijevog

karbonata (290g/L). Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (ZERO BASE).

Sadržaj trjeslovina, izraženih kao pirogalol, računa se prema izrazu:

$$\% \text{ trjeslovina} = 6,25 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

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

### **3.6. Ispitivanje antioksidacijskog učinka**

#### **3.6.1. Priprema biljnih ekstrakata**

Za ispitivanje antioksidacijskog učinka potrebno je pripremiti biljne ekstrakte. 5,00 g praškasto usitnjenih plodova ili listova ispitivane biljke prelije se s otapalom (70%-tni etanol) u omjeru 1:10. Zatim se provodi ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 min. Dobivene ekstrakte potrebno je filtrirati, potom biljnom materijalu ponovo dodati 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. Iskorištenja dobivenih ekstrakata bila su : 39,96% za plod i 15,94% za list.

#### **3.6.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala**

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (antiradikalna aktivnost) ispituje se spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Vladimir-Knežević i sur. (2011). Određivanje se provodi u duplikatu. Pripremi se niz serijskih razrijeđenja uzorka u 1,5 mL 96%-tnog etanola tako da konačni raspon koncentracija uzoraka bude 0,2-100 µg/mL. U kontrolne epruvete se umjesto uzorka stavi 1,5 mL 96%-tnog etanola. U svaku se epruvetu, koristeći repetitivnu pipetu, zatim doda po 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH radikala. Reakcijska smjesa inkubira se na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, izmjeri se apsorbancija uzoraka na 517 nm uz 96%-tni etanol kao slijepu probu (ZERO BASE). Ukoliko su uzorci obojani, potrebno je prije mjerenja apsorbancije u epruvetu s 1,5 mL uzorka dodati 0,5 mL 96%-tnog etanola.

Postotak inhibicije radikala izračunat je prema izrazu:

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

gdje  $A_0$  predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala, a  $A_t$  predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za apsorbanciju samog uzorka. Iz odnosa izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih koncentracija uzoraka linearnom ekstrapolacijom se odrede koncentracije ispitivanih uzoraka koje su uzrokovale 50%-tnu inhibiciju DPPH radikala ( $IC_{50}$ ).

### **3.6.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza (III)**

Sposobnost redukcije iona željeza (III) ekstrakata ispituje se spektrofotometrijskom metodom (El Jemli i sur., 2016). Određivanje se provodi u duplikatu. U jažicama mikrotitarske pločice pripremi se niz serijskih razrjeđenja tako da konačne koncentracije uzorka budu u rasponu 0,3125 –40  $\mu\text{g/mL}$  (40  $\mu\text{L}$  prikladnog otapala (70% etanol)+ 40  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka ). U svaku jažicu doda se po 100  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera (0,2M, pH 6) zatim po 100  $\mu\text{L}$  1%-tne otopine kalijeva heksacijanoferata. Reakcijska smjesa inkubira se 20 min u termostatu na 50 °C. U smjesu se doda 100  $\mu\text{L}$  10%-tne otopine trikloroetene kiseline (po potrebi centrifugirati) koja se potom inkubira 10 min. Uzme se 125  $\mu\text{L}$  bistrog supernatanta i prebaci iz prethodnog reda u odgovarajuću jažicu novog reda te se pomiješa sa 125  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 25  $\mu\text{L}$  0,1%-tne otopine željezovog (III) klorida. Apsorbancija se mjeri na 700 nm .

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

### **3.6.4. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog (II) oksida**

Korištena je spektrofotometrijska metoda (Awah i Verla, 2010) u određivanju sposobnosti hvatanja radikala dušikovog(II) oksida. Određivanje se provodi u duplikatu. Pripremi se niz koncentracijskih razrjeđenja (7) uzorka u 80  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  prikladnog otapala (etanol). U svaku

jažicu doda se 80 µL otopine Na-nitroprusida u PBS-u (0,01 Mm, pH 7,4) te se sadržaj promiješa. Reakcijska smjesa 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 fosforu 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.

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 A0 apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (etanola), a A1 je apsorbancija ispitivane otopine umanjena za apsorbanciju samog uzorka.

Koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni učinak (IC<sub>50</sub>) dobivena je interpolacijom na temelju regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

### **3.7. Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel programskog paketa Microsoft Office 365 (Microsoft, SAD). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija dva određivanja. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak (IC<sub>50</sub>) dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

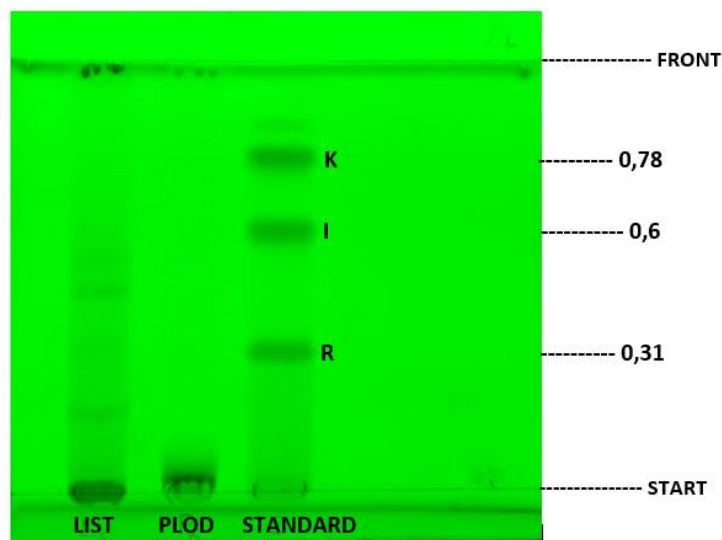
### 4.1. Analiza tankoslojnom kromatografijom

Kvalitativna analiza sastava lista i ploda biljne vrste *Celtis australis* L. provedena je tankoslojnom kromatografijom. Ispitana je prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina, trjeslovina, saponina, triterpenskih kiselina i fitosterola. Ispitivanja su provedena korištenjem silikagel ploče kao nepokretne faze, odgovarajućih smjesa otapala kao pokretne faze, te prikladnih reagensa za detekciju. Detekcija je odrađena promatranjem ploče prije i nakon prskanja ploče odgovarajućim reagensom, pod UV lampom ili na vidljivom svjetlu. Odijeljene sastavnice su karakterizirane faktorom zaostajanja ( $R_f$ ), tj. položajem odijeljenih vrpca, te bojom i intenzitetom vrpca u usporedbi s vrpcama referentnih spojeva.  $R_f$  vrijednost je izračunata kao omjer udaljenosti koju prijeđe supstancija i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza. S obzirom na navedeno, određivala se prisutnost poredbenih tvari u ispitivanom uzorku.

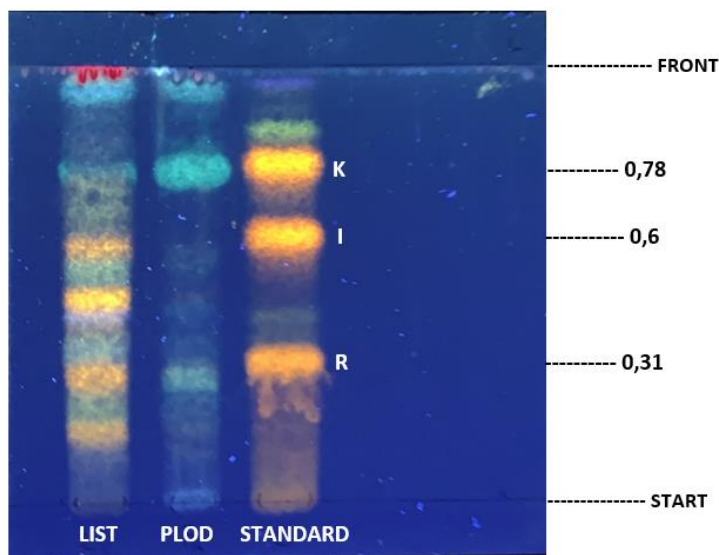
#### 4.1.1. Flavonoidi

Ispitivanje prisutnosti flavonoida provedeno je kromatografskim odjeljivanjem metanolnih ekstrakata lista i ploda vrste *C. australis* na tankom sloju silikagela uz primjenu smjese otapala etilacetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1 (V/V/V). Sastavnice su vizualizirane pod UV lampom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče NST/PEG reagensom. Kod lista je moguće uočiti dvije narančaste fluorescencije koje položajem i bojom odgovaraju poredbenim supstancijama rutinu ( $R_f=0,31$ ) i izokvercitrinu ( $R_f=0,6$ ). Prisustvo rutina u etanolnom ekstraktu lista potvrdili su El-Alfy i sur. (2011). S obzirom na dobiveni kromatogram, kvercitrin ( $R_f=0,78$ ) nije opažen u sastavu lista i ploda. Kod ploda nije zapažena nijedna vrpca koja bi odgovarala korištenim poredbenim tvarima (kvercitrin, izokvercitrin i rutin) (Slika 10. i 11.). U ispitivanim uzorcima moguće je uočiti dodatne narančaste i plave fluorescencije koje vjerojatno odgovaraju flavonoidima s drugačijom strukturom, te fenolnim kiselinama. Provedeno je ponovljeno ispitivanje prisutnosti flavonoida u koncentriranim ekstraktima ploda (P1 i P2) s obzirom da je u prethodnim istraživanjima u plodu (etanolni ekstrakt) potvrđena prisutnost flavonoidnih aglikona apigenina, kvercetina i njegovog glukozida (Badoni i sur.,2011; Badoni i sur.,2010a). U koncentriranom ispitivanom uzorku ploda vidljiva je narančasta fluorescencija koja položajem i bojom odgovara poredbenoj supstanci rutinu ( $R_f=0,27$ ). Isto tako, vidljiva je vrlo slaba narančasta fluorescencija koja bi položajem i bojom mogla odgovarati referentnom spoju

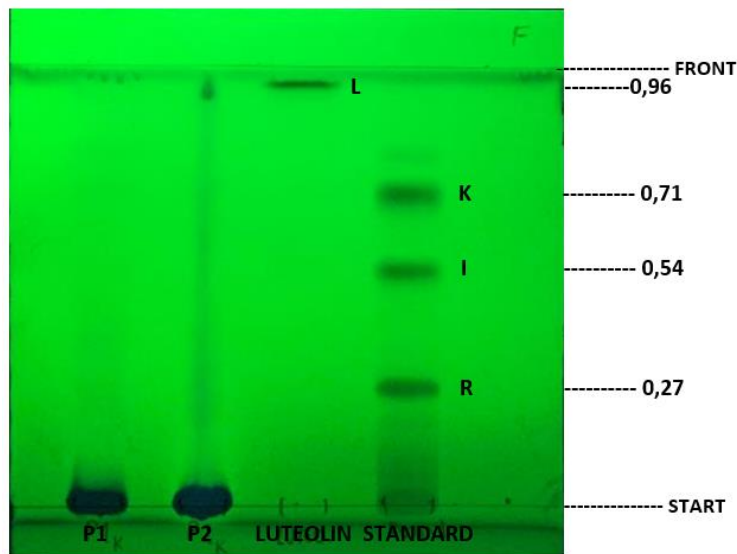
izokvercitrinu ( $R_f = 0,54$ ), no prisutnost izokvercitrina u plodu ne može se sa sigurnošću indentificirati . Prisutnost kvercitrina i luteolina nije opažena u sastavu uzorka ploda (Slika 12. i 13.).



**Slika 10.** Gašenje fluorescencije na kromatogramu flavonoida lista i ploda košće  
*Poredbene supstancije* : **K**-Kvercitrin ( $R_f = 0,78$ ), **I**-Izokvercitrin ( $R_f = 0,6$ ), **R**-Rutin ( $R_f = 0,31$ )  
*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 254nm



**Slika 11.** Kromatogram flavonoida lista i ploda košće  
*Poredbene supstancije* : **K**-Kvercitrin ( $R_f = 0,78$ ), **I**-Izokvercitrin ( $R_f = 0,6$ ), **R**-Rutin ( $R_f = 0,31$ )  
*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



**Slika 12.** Gašenje fluorescencije na kromatogramu flavonoida lista i ploda košće

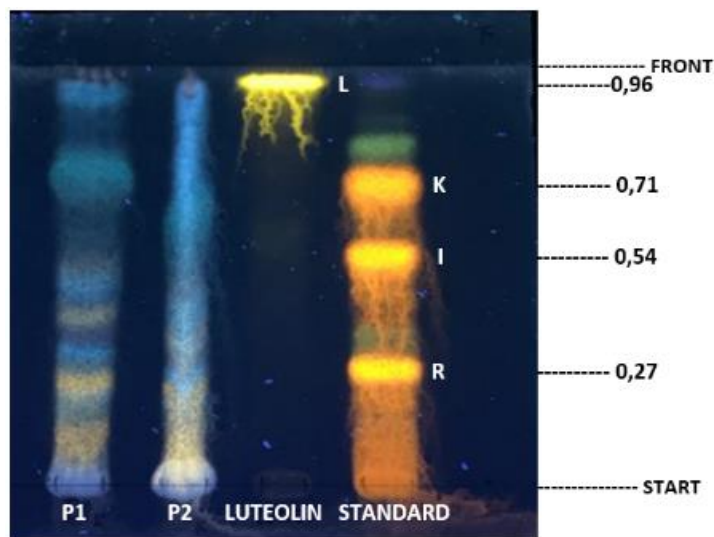
*Poredbene supstancije* : **L**- Luteolin ( $R_f = 0,96$ ), **K**-Kvercitrin ( $R_f = 0,71$ ), **I**-Izokvercitrin ( $R_f = 0,54$ ), **R**-Rutin ( $R_f = 0,27$ )

*Metanolni ekstrakti plodova*: **P1**-0,4 g usitnjenog ploda u 2ml metanola ,grijati na vodenoj kupelji ( $70^\circ \text{C}$ ), 2 min., **P2**-profiltrirani ekstrakt ukoncentrirati zagrijavanjem na vodenoj kupelji dok se volumen ne smanji za pola

*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 254nm



**Slika 13.** Kromatogram flavonoida lista i ploda košće

*Poredbene supstancije* : **L**- Luteolin ( $R_f = 0,96$ ), **K**-Kvercitrin ( $R_f = 0,71$ ), **I**-Izokvercitrin ( $R_f = 0,54$ ), **R**-Rutin ( $R_f = 0,27$ )

*Metanolni ekstrakti plodova*: **P1**-0,4 g usitnjenog ploda u 2ml metanola ,grijati na vodenoj kupelji ( $70^\circ \text{C}$ ), 2 min., **P2**-profiltrirani ekstrakt ukoncentrirati zagrijavanjem na vodenoj kupelji dok se volumen ne smanji za pola

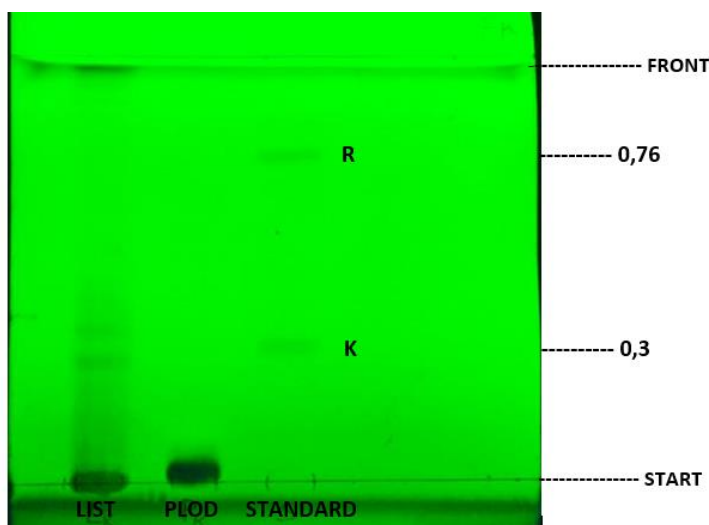
*Stacionarna faza* : Kiesel 60 F254 TLC ploča

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

*Detekcija* : NST + PEG, UV lampa na 254nm

#### 4.1.2. Fenolne kiseline

Metanolni ekstrakti ploda i lista nanjeni su na ploču s tankim slojem silikagela te odijeljeni korištenjem smjese otapala diizopropiletera, acetona, mravlje kiseline te vode u volumnim omjerima 5:3:1:1. Sastavnice su vizualizirane pod UV svjetlom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče NST/PEG reagensom. Iz dobivenog kromatograma, usporedbom položaja zona poredbenih supstancija i analiziranih uzoraka, kod lista je detektirana plava fluorescencija koja odgovara poredbenoj supstanci, ružmarinskoj kiselini ( $R_f = 0,76$ ). Uočena je vrlo slaba plava fluorescencija koja bi položajem i bojom mogla odgovarati vrpci poredbene otopine klorogenske kiseline, no nije moguće sa sigurnošću dokazati prisutnost klorogenske kiseline u uzorku lista. Kako su Somnavilla i sur. (2012) u ekstraktu lista identificirali kavenu kiselinu i njene derivate, među kojima je bila i klorogenska kiselina, može se zaključiti da je klorogenska kiselina uistinu prisutna u uzorku lista. U oba ispitivana uzorka vidljive su dodatne plave fluorescencije, među kojima se posebno ističe jedna intenzivna vrpca sa  $R_f$  vrijednosti od 0,53, koja vjerojatno odgovara nekoj drugoj fenolnoj kiselini (Slika 14 i 15.). U uzorku ploda nije bilo moguće odrediti prisutnost referentnih supstanci, stoga je provedeno ponovljeno ispitivanje prisutnosti flavonoida u koncentriranim ekstraktima ploda (P1 i P2). Na drugom kromatogramu, kod ploda je vidljiva slaba zona plave fluorescencije koja bojom i položajem odgovara referentnoj otopini ružmarinske kiseline ( $R_f = 0,75$ ) (Slika 16. i 17.).



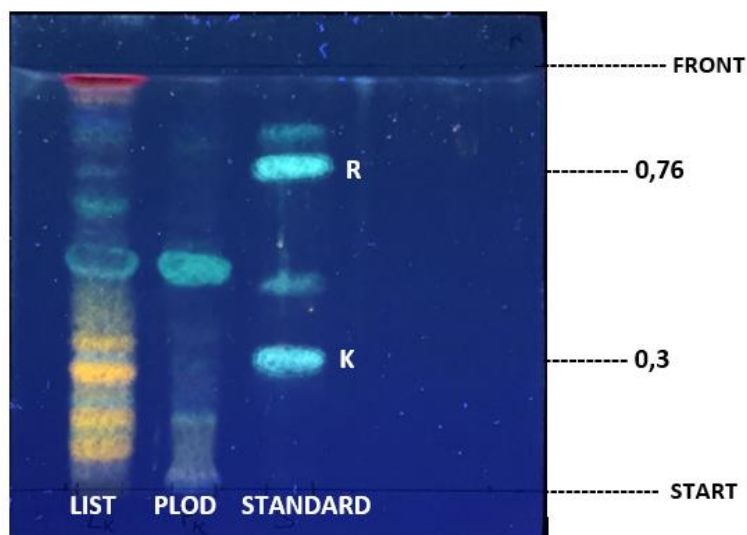
**Slika 14.** Gašenje fluorescencije na kromatogramu fenolnih kiselina lista i ploda košće

**R**-Ružmarinska kiselina ( $R_f = 0,76$ ), **K**-Klorogenska kiselina ( $R_f = 0,3$ )

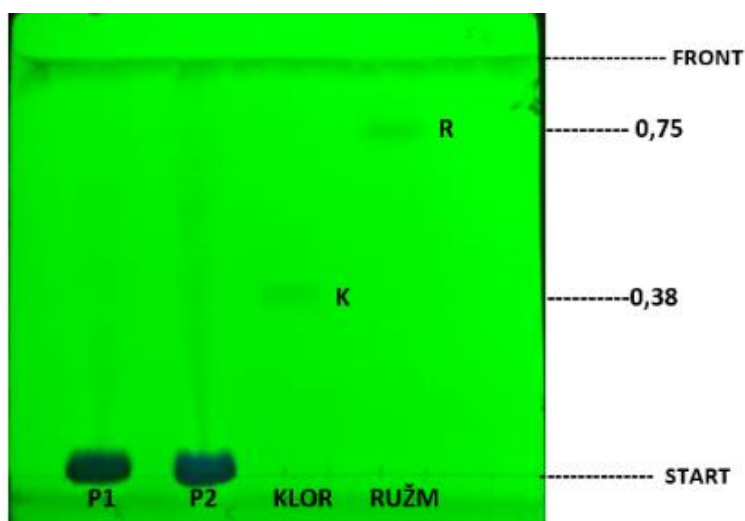
*Stacionarna faza* : Kiesel 60 F254 TLC ploča

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

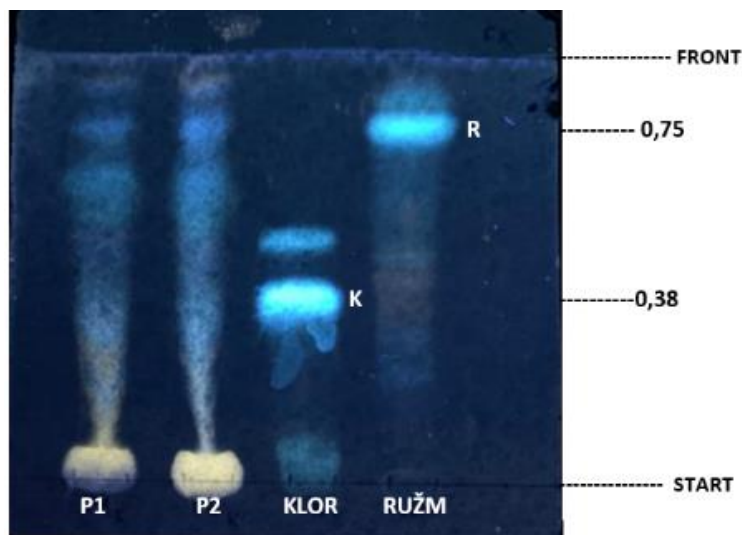
*Detekcija* : NST + PEG, UV lampa na 254nm



**Slika 15.** Kromatogram fenolnih kiselina lista i ploda košće  
**R**-Ružmarinska kiselina ( $R_f = 0,76$ ), **K**-Klorogenska kiselina ( $R_f = 0,3$ )  
 Stacionarna faza : Kiesel 60 F254 TLC ploča  
 Pokretna faza : diizopropileter-aceton-mravljja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)  
 Detekcija : NST + PEG, UV lampa na 365nm



**Slika 16.** Gašenje fluorescencije na kromatogramu fenolnih kiselina lista i ploda košće  
**RUŽM/R**-Ružmarinska kiselina ( $R_f = 0,75$ ), **KLOR/K**-Klorogenska kiselina ( $R_f = 0,38$ )  
 Metanolni ekstrakti plodova: **P1**-0,4 g usitnjenog ploda u 2ml metanola ,grijati na vodenoj kupelji ( $70^\circ\text{C}$ ), 2 min., **P2**-  
 profiltrirani ekstrakt ukoncentrirati zagrijavanjem na vodenoj kupelji dok se volumen ne smanji za pola  
 Stacionarna faza : Kiesel 60 F254 TLC ploča  
 Pokretna faza : diizopropileter-aceton-mravljja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)  
 Detekcija : NST + PEG, UV lampa na 254nm



**Slika 17.** Kromatogram fenolnih kiselina lista i ploda košće

**R**-Ružmarinska kiselina ( $R_f = 0,75$ ), **K**-Klorogenska kiselina ( $R_f = 0,38$ )

*Metanolni ekstrakti plodova:* **P1**-0,4 g usitnjenog ploda u 2ml metanola ,grijati na vodenoj kupelji ( $70^\circ \text{C}$ ), 2 min., **P2** profiltrirani ekstrakt ukoncentrirati zagrijavanjem na vodenoj kupelji dok se volumen ne smanji za pola

*Stacionarna faza :* Kiesel 60 F254 TLC ploča

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

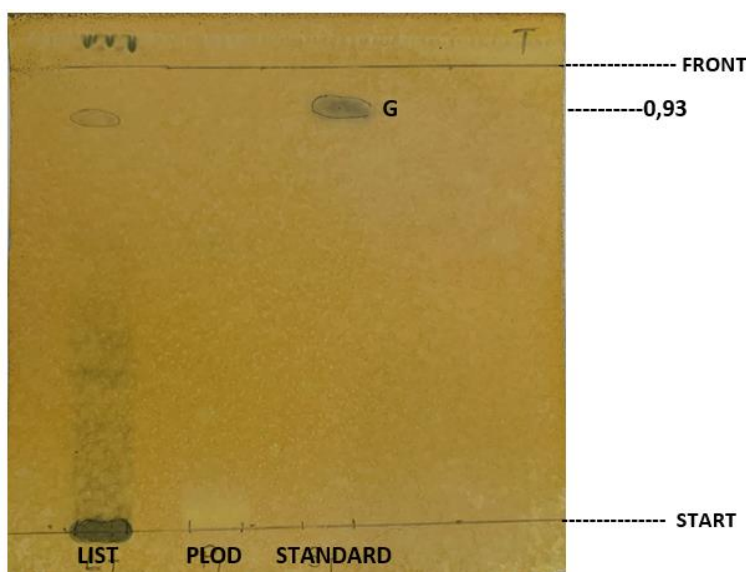
*Detekcija :* NST + PEG, UV lampa na 365nm

#### 4.1.3. Trjeslovine

Na ploču sa tankim slojem silikagela nanoseni su metanolni ekstrakti lista i ploda košće te odijeljeni korištenjem smjese otapala etilformijata, mravlje kiseline i vode u volumnom omjeru 8:1:1. Detekcija je omogućena nakon prskanja sa reagensom 10%-tnom vodenom otopinom  $\text{FeCl}_3$ . Kod uzorka lista vidljiva je mrlja koja bojom i položajem, tj.  $R_f$  vrijednošću odgovara korištenom standardu galne kiseline ( $R_f = 0,93$ ). Trjeslovine u uzorku ploda nisu detektirane (Slika 18.). Ota i sur. (2017) ispitali su prisutnost pojedinih fenolnih sastavnica u vodenim i etanolnim ekstraktima lista i mezokarpa ploda ubranih u različitim stadijima rasta, u lipnju i listopadu. Galna kiselina je detektirana u vodenom ekstraktu mezokarpa ploda ubranog u listopadu (0,114 mg/100g), te u vodenom ekstraktu lista ubranog u lipnju (0,013 mg/100g). U ostalim vodenim ekstraktima, kao i u svim etanolnim ekstraktima mezokarpa i lista nije zabilježena prisutnost galne kiseline. Kako su uzorci listova i plodova košće korištenih u ovom radu ubrani u jesen, dobiveni rezultati se ne podudaraju s rezultatima gore navedenog istraživanja. S obzirom da su korištena različita otapala za ekstrakciju (etanol/voda i metanol) i da je plod u studiji očišćen od koštice rezultati ovog rada se ne mogu izravno uspoređivati s rezultatom studije. I više nego očigledno je da razni parametri



poput vremena (mjeseca) uzorkovanja, tj. stadija rasta ploda i lista , izbora ekstrakcijskog otapala, te pripreme biljnog materijala utječu na krajnji rezultat provedene analize.

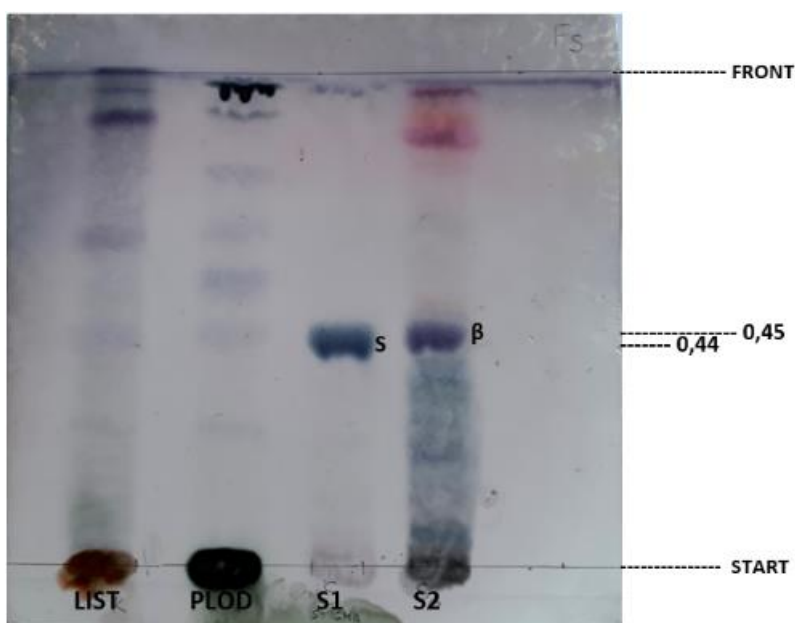


**Slika 18.** Kromatogram trjeslovina lista i ploda košćele  
**G**-Galna kiselina (  $R_f = 0,93$ )  
Stacionarna faza : Kiesel 60 F254 TLC ploča  
Pokretna faza : etilformijat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)  
Detekcija :  $FeCl_3$ , Vis

#### 4.1.4. Triterpenske kiseline i fitosteroli

Na silikagel ploču nanoseni su metanolni ekstrakti lista i ploda košćele te je kao pokretna faza korištena smjesa otapala diklormetana i etilacetata u volumnom omjeru 9 : 1. Nakon prskanja sa reagensom anisaldehyd-sumporna kiselina i sušenja na 100-105°C u ispitivanim uzorcima ploda i lista je opažena slabo ljubičasto obojana mrlja sa  $R_f$  vrijednosti od 0,45. Mrlje s obzirom na položaj, tj.  $R_f$  vrijednost vjerojatno odgovaraju standardu  $\beta$ -sitosterola ( $R_f = 0,45$ ), premda i drugi korišteni standard stigmasterol ima vrlo sličnu  $R_f$  vrijednosti od 0,44 (Slika 19.). Navedeni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima. Filali-Ansari i sur. (2016) su iz vodeno-metanolnog ekstrakta lista *C.australis* izolirali  $\beta$ -sitosterol , $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glukozid i vanilinsku kiselina. Nadalje, Nodeh i sur. (2020) pokazali su da ulje dobiveno iz sjemenki plodova *C.australis* sadrži visoke razine  $\beta$ -sitosterola (81,2%) i malu količinu stigmasterola (0,43%). Uzevši u obzir rezultate ove TLC analize i prethodna istraživanja može se zaključiti da plod košćele sadrži stigmasterol i  $\beta$ -sitosterol, dok list sadrži  $\beta$ -sitosterol. S obzirom na vrlo slične  $R_f$  vrijednosti i boje zona dviju

poredbenih tvari bilo bi dobro ispitati prisutnost ova dva spoja (u plodu i listu košće) na dvije različite silikagel ploče.



**Slika 19.** Kromatogram triterpenskikh kiselina i fitosterola lista i ploda košće

**S**-Stigmasterol(  $R_f = 0,44$ ), **β**-sitosterol ( $R_f = 0,45$ )

*Stacionarna faza* : Kiesel 60 F254 TLC ploča

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

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

## 4.2. Određivanje sadržaja flavonoida, antocijana, fenolnih kiselina i trjeslovina

Kvantitativna fitokemijska analiza fenolnih spojeva u listu i plodu vrte *C. australis* provedena je primjenom prikladnih spektrofotometrijskih metoda, te je određen sadržaj flavonoida, fenolnih kiselina i trjeslovina.

### 4.2.1. Flavonoidi

Sadržaj flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom. Nakon hidrolize flavonoidnih glikozida, aglikoni su odijeljeni izmućkivanjem s etilacetatom. Otopini aglikona dodan je aluminijev klorid čime su stvoreni žuto obojeni kompleksi sa maksimumom apsorbancije od 425 nm u vidljivom području. Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je pomoću specifične apsorbancije koja za izokvercetrozid iznosi 500 (Tablica 1.).



**Tablica 1.** Udio flavonoida u listu i plodu košćece

	Maseni udio flavonoida izražen kao izokvercetrozid (%)
LIST	0,316±0,010
PLOD	0,025±0,003

Sadržaj flavonoida u listu i plodu košćece znatno se razlikuje. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je list košćece znatno bogatiji flavonoidima u odnosu na plod. Udio u uzorku lista oko 12,64 x je veći od udjela u uzorku ploda.

Udio flavonoida u listu istražen ovim radom najbolje korelira sa rezultatima studije iz 2010.godine, iako je za određivanje korištena druga analitička metoda. Zehrmann i sur.(2010) predstavili su kapilarnu elektroforetsku separaciju kao prikladnu analitičku metodu za proučavanje rijetkih i farmakološki zanimljivih flavonoidnih C-glikozida u biljaka. Udio ukupnih flavonoida u ispitivanim uzorcima lista košćece iznosio je 0,26–0,30%, pri čemu se izoviteksin pokazao kao dominantan flavonoid (0,06–0,09%), a slijedi ga citozid (0,04–0,07%).

Korištenjem iste metode za određivanje sadržaja, Shokrzadeh i sur.(2018) su odredili sadržaj flavonoida u vodeno-alkoholnom ekstraktu lista, koji je iznosio 8,2 mg kvercetina/g suhog ekstrakta. Razina ukupnih fenola bila je visoka s koncentracijom od 109,4 mg galne kiseline/g suhog ekstrakta.

Hammash i sur.(2016) su također odredili sadržaj flavonoida korištenjem aluminijevog klorida kao reagensa. Koncentracija flavonoida u metanolnom ekstraktu lišća iznosila je  $14.00 \pm 0.19$  mg RU/g suhe biljke i bila je veća od one u ekstraktu kore ( $0.17 \pm 0.003$  mg RU/g suhe biljke). Ukupni sadržaj fenola, određen je pomoću Folin-Ciocalteu-a reagensa, bio je veći u listovima ( $16.89 \pm 0.73$  mg GA/g suhe biljke) nego u kori ( $5,53 \pm 0,19$  mg GA/g suhe biljke).

Udio flavonoida u plodu košćece istražen ovim radom najbolje korelira sa rezultatima studije iz 2021.godine u kojoj su Cascales i sur. utvrdili su pozitivnu korelaciju između antioksidativnih svojstva i određenih sadržaja fenolnih spojeva i flavonoida. Iako je sadržaj određen samo za jestivi dio ploda, tj. usplođe, sadržaj flavonoida od 28,2 mg ekv. kvercetina/100g odgovara rezultatu dobivenom u ovom radu za kompletni plod. Ukupni sadržaj fenolnih spojeva u usplođu (249,1 mg ekv. galne kiseline/100 g ) određen je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa.

Ota i sur.(2017) odredili su sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima lista i mezokarpa ploda košćece. Vodeni ekstrakt zrelog mezokarpa sadržavao je 0,27 g/100 g ukupnih fenola (izraženo kao ekvivalenti galne kiseline), a ekstrakt nezrelog mezokarpa 0,05 g/100 g ukupnih fenola. Sadržaj ukupnih fenola određen u etanolnom ekstraktu zrelog mezokarpa iznosio je 0,24 g/100 g ukupnih fenola, dok je u ekstraktu nezrelog mezokarpa iznosio 0,10 g/100 g ukupnih fenola. Ukupna količina fenola određena u etanolnom ekstraktu lišća ,sakupljenog na kraju lipnja, iznosila je 0,07 g/100 g ukupnih fenola, međutim sadržaj se povećao deset puta (do 0,89 g/100 g) do kraja listopada.

Prethodne dvije studije pokazuju isti ukupan sadržaj fenola u jestivom dijelu ploda (cca 2,4 mg GA /g ), dok ukupan sadržaj fenola u listovima pokazuje velike varijacije od studije do studije (8,9 mg GA/g suhog uzorka- 109,4 mg GA/g suhog uzorka). Iako postoji nekoliko studija koje izvještavaju o sadržaju flavonoida u listu i plodu košćece ,standardizacija rezultata na različite spojeve otežava njihovu usporedbu.

#### **4.2.2. Antocijani**

Određivanje sadržaja antocijana temelji se na njihovom karakterističnom ponašanju u vrlo kiselim uvjetima (pH=1) koji uzrokuju transformaciju antocijana u crveno obojeni flavilium kation. U vrlo kiselom mediju crveni flavilium kation je dominantan oblik. Flavilium kation je glavni dio antocijana, aglikon, koji sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za apsorpciju svijetla pri valnim duljinama oko 500 nm (Vladimir-Knežević i sur., 2012). Određivanje se provodi spektrofotometrijskom metodom gdje antocijani na valnoj duljini 582 nm u kiseloj sredini povećavaju apsorpciju. Udio antocijana računa se kao cijanidin-3-glukozid klorid čija je specifična apsorpcija 718.

Ovom metodom sadržaj antocijana u listu i plodu nije bilo moguće odrediti.

Ota i sur. (2017) ispitali su prisutnost pojedinih fenolnih sastavnica u vodenim i etanolnim ekstraktima lista i mezokarpa ploda ubranih u različitim stadijima rasta, u lipnju (nezrelo) i listopadu(zrelo). Fenolne sastavnice su identificirane i kvantitativno im je određen sadržaj uz pomoć UHPLC metode spregnute sa QqQ-MS/MS. Količine pojedinačnih fenolnih spojeva bile su manje u vodenim ekstraktima u usporedbi sa etanolnim ekstraktima. Cijanidin-3,5-di-O-glukozid proglašen dominantnim fenolnim spojem u etanolnom ekstraktu mezokarpa i nezrelog (0,04

mg/100g uzorka) i zrelog ploda(0,051 mg/100g uzorka).Slijedi ga pelargonidin-3,5-di-O-glukozid sa najmanje deset puta većim količinama u zreloom mezokarpu (0,033 mg/100g uzorka) nego u nezreloom(0,002 mg/100g uzorka).Pelargonidin-3,5-di-O-glukozid (0,007mg/100g uzorka) i cijanidin-3,5-di-O-glukozid(0,005 mg/100g uzorka) pronađeni su u etanolnom ekstraktu ubranog lišća u lipnju. Tijekom sljedeća četiri mjeseca do branja u listopadu, razina cijanidin-3,5-di-O-glukozida bila je gotovo udvostručena (0,011 mg/100g uzorka). U vodenim ekstraktima plodova i listova ubranih u lipnju antocijani nisu detektirani, dok su u uzorcima sakupljenim u listopadu pronađene znatno manje koncentracije antocijana u usporedbi sa etanolnim ekstraktima. Delfinidin-3,5-di-O-glukozid je detektiran samo u vodenom ekstraktu lista ubranog u listopadu (0,004 mg/100 g uzorka ).

S obzirom da su korištene različite analitičke metode za određivanje sadržaja (UV-Vis spektrofotometar u ovom radu / UHPLC u studiji ) i da je plod u studiji očišćen od koštice te je korišten samo mezokarp , rezultati ovog rada se ne mogu izravno uspoređivati s rezultatom gore navedene studije. I više nego očigledno je da razni parametri poput vremena(mjeseca) uzorkovanja, tj. stadija rasta ploda i lista, izbora ekstrakcijskog otapala, pripreme biljnog materijala, vremena i uvjeta skladištenja, odabrane metoda ispitivanja i osjetljivosti iste utječu na krajnji rezultat provedene analize. Može se zaključiti da plodovi i listovi košće sadrže određenu količinu antocijana koja je zavisna o stadiju rasta, tj. vremenu uzorkovanja te da je UHPLC puno osjetljivija i time bolja metoda analize sadržaja istih.

#### 4.2.3. Fenolne kiseline

Sadržaj fenolnih kiselina, tj. derivata hidroksicimetne kiseline određen je spektrofotometrijskom metodom. Žuto obojen kompleks, nastao reakcijom o-dihidroksifenolne skupine i nitrit-molibdatova regensa, nakon dodatka lužine prelazi u narančastocrvenu boju. Izmjerena je apsorbancija ispitivane otopine na 525 /505 nm. Rezultat sadržaja izražen je kao klorogenska (525nm) i ružmarinska kiselina (505nm) te je prikazan u Tablici 2.

**Tablica 2.** Udio fenolnih kiselina u listu i plodu košće

	Udio klorogenske kiseline(%)	Udio ružmarinske kiseline(%)
LIST	3,16±0,02	1,66±0,02
PLOD	0,38±0,04	0,18±0,01

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u listu košćeke kreće se od 1,66% do 3,16% ,a u plodu od 0,18 % do 0,38 %. Rezultati pokazuju 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 (3,16% i 0,38%) u odnosu na udio ružmarinske kiseline (1,66% i 0,18%).

#### 4.2.4. Trjeslovine

Sadržaj trjeslovina određen je spektrofotometrijskom metodom. Ukupni polifenoli sastoje se od netaninskih polifenola i trjeslovina. Nakon obrade uzoraka sa kožnim praškom na koji se vežu trjeslovine, iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na prašak, dobiven je sadržaj trjeslovina .Postotni udio trjeslovina izražen je kao pirogalol (Tablica 3.). Polifenolne sastavnice s Folin-Ciocalteuovim reagensom tvore plavo obojane komplekse, a apsorbancija nastalih plavih otopina izmjerena je na 760 nm.

**Tablica 3.** Udio trjeslovina u listu i plodu košćeke

	Udio trjeslovina izražen kao pirogalol (%)
LIST	1,61±0,18
PLOD	0,39±0,02

Sadržaj trjeslovina u uzorku lista i ploda košćeke znatno se razlikuje. Udio u uzorku lista oko 4,21x je veći od udjela u uzorku ploda.

Prema dobivenim rezultatima, najzastupljeniji fenolni spojevi u uzorku lista košćeke su fenolne kiseline, a slijede ih trjeslovine. Flavonoidi su daleko najmanje zastupljene fenolne sastavnice u uzorku ploda i u uzorku lista. Najzastupljeniji fenolni spojevi u uzorku ploda su trjeslovine i fenolne kiseline izražene kao klorogenska kiselina.

### 4.3. Ispitivanje antioksidacijskog učinka

U svrhu procjene antioksidativnog potencijala etanolnih ekstrakata lista i ploda vrste *C. australis* provedena su slijedeća spektrofotometrijska ispitivanja: određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala, određivanje sposobnosti redukcije i određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida. Antioksidativno djelovanje polifenola je široko, oni djeluju kao redukcijski agensi, donori vodika i čistači slobodnih radikala, a uz to imaju i sposobnost keliranja metala. Iz tog razloga, u ovoj studiji korišteni su različiti testovi kako bi se pretpostavili mogući mehanizmi antioksidativnog djelovanja ekstrakta ploda ili lista.

#### 4.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala

Za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala ekstrakata lista i ploda *C. australis* korištena je spektrofotometrijska metoda. DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je komercijalno dostupan stabilni slobodni radikal ljubičaste boje koji značajno apsorbira u vidljivom dijelu spektra (517 nm). Antioksidansi stupaju u reakciju s DPPH radikalima i reduciraju ih donirajući im elektron ili atom vodika pri čemu nastaju stabilne molekule 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina svijetlo žute boje. Obezbojenje otopine DPPH•, tj. smanjenje intenziteta obojenja reakcijske smjese proporcionalno je antiradikalnoj aktivnosti ispitivanog ekstrakta. Izračunata je inhibicija slobodnih DPPH radikala, izražena u postotcima, za različite koncentracije uzorka. Koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni učinak (IC<sub>50</sub>) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 4., 5. i 6. i na Slici 20.

**Tablica 4.** Sposobnost hvatanja DPPH radikala u listu košće. Rezultati su izraženi u postotcima (%), kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

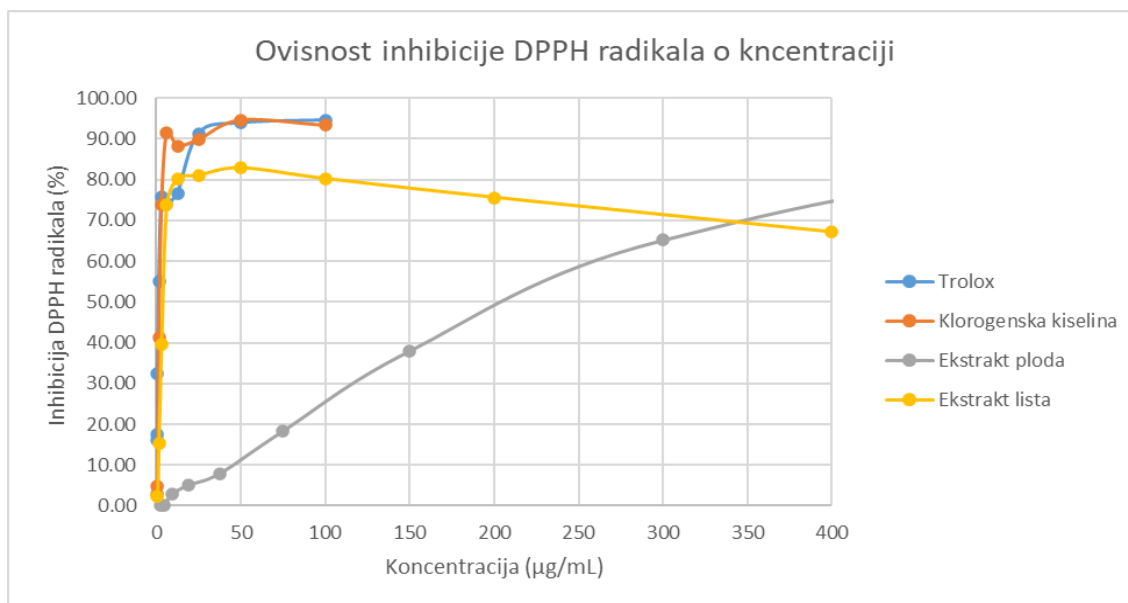
Koncentracija (µg/mL)	Inhibicija DPPH radikala u listu (%)
400	67,13±2,76
200	75,61±2,11
100	80,21±1,29
50	82,83±1,00
25	80,98±3,05
12,5	80,14±2,53
6,25	73,83±6,91
3,13	39,51±8,30
1,56	15,26±11,93
0,78	2,21±12,78

**Tablica 5.** Sposobnost hvatanja DPPH radikala u plodu košće. Rezultati su izraženi u postotcima (%), kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibicija DPPH radikala u plodu (%)
1200	85,37 $\pm$ 0,12
600	84,53 $\pm$ 0,35
300	65,17 $\pm$ 1,48
150	37,92 $\pm$ 1,71
75	18,25 $\pm$ 0,75
37,5	7,83 $\pm$ 2,56
18,75	4,96 $\pm$ 0,55
9,38	2,77 $\pm$ 1,29
4,69	0
2,34	0

**Tablica 6.** Sposobnost hvatanja DPPH radikala referentnih spojeva (%). Rezultati su izraženi u postotcima (%), kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	Trolox	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
3,125	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 20.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti inhibicije DPPH radikala za različite koncentracije etanolnih ekstrakata lista i ploda košćele i referentnih otopina

Antiradikalna aktivnost lista i ploda košćele uglavnom opada smanjenjem koncentracije ispitivanih uzoraka. Iz tablica se može iščitati da list posjeduje sposobnost hvatanja DPPH radikala, koja raste s porastom koncentracije uzorka sve do koncentracije od 50 µg/ml. Pri navedenoj koncentraciji uzorak lista doseže plato, te daljnjim povećanjem koncentracije uzorka dolazi do blagog smanjena antiradikalne aktivnosti. Antiradikalna aktivnost ploda raste s porastom koncentracije, a na najvišoj testiranoj koncentraciji od 1200 µg/mL uzorak doseže plato (Slika 20.). Pri koncentraciji uzorka ploda od  $221,76 \pm 5,79$  µg/mL ostvaren je 50%-tni antioksidacijski učinak. Uzorak lista pri koncentraciji od  $4,30 \pm 0,83$  µg/mL ostvaruje isti antioksidacijski učinak što znači da list ima znatno veću sposobnost inhibicije radikala. Vrijednosti  $IC_{50}$  standardnih otopina iznose  $1,56 \pm 0,34$  µg/mL za troloks, odnosno  $2,07 \pm 0,16$  µg/mL za klorogensku kiselinu. Uspoređujući uzorke, moguće je zaključiti da plod košćele pokazuje vrlo slabu antiradikalnu aktivnost. List košćele ima puno veću sposobnost hvatanja DPPH radikala u usporedbi s plodom, no ona je manja u odnosu na sposobnost hvatanja DPPH radikala korištenih standarda.

El-Alfy i sur. (2011) su pokazali da je sadržaj flavonoida (C-flavonoidni glikozidi) odgovoran za učinke čišćenja radikala, a to se može pripisati njihovoj sposobnosti doniranja vodika. Svi testirani uzorci pri koncentraciji od 100 µg/ml imali su značajan učinak čišćenja DPPH radikala. Najveću aktivnost među ispitanim uzorcima pokazao je 2"-O-β-galaktopiranozilviteksin (84,8%), slijedi ga

frakcija n-butanola (70,3%) i etanolni ekstrakt lista (67,2%). Izmjerene aktivnosti bile su veće od referentnih standarda  $\alpha$ -tokoferola i BHT (66,5 i 55,3%).

Cascales i sur.(2021) ručno su frakcionirali svježe zrele plodove na opnu (19,8%), jestivo usplođe (49,7%) i košticu (29,4%). Određeni DPPH kapacitet čišćenja ( $IC_{50}$ ) za usplođe iznosio je 7,1.

Ota i sur. (2017) ispitali su antioksidativno djelovanje u vodenim i etanolnim ekstraktima lista i mezokarpa ploda ubranih u različitim stadijima rasta, u lipnju i listopadu. Veći antioksidativni potencijal zabilježen je u vodenom ekstraktu mezokarpa plodova ubranih u listopadu (0,35 mg galne kiseline/g uzorka), nego u etanolnom ekstraktu (cca 1,2 mg galne kiseline/g uzorka). Etanolni ekstrakt listova ubranog krajem listopada sadržavao je 50 puta veću razinu antioksidansa (2,5 mg galne kiseline/g uzorka) od ubranog lišća krajem lipnja. Ovo je u skladu sa sto puta većom razinom epikatehina, koji pokazuje pozitivnu korelaciju s antioksidativnim kapacitetom, i udvostručenim razinama cijanidin-3,5-di-O-glukozida i vanilinske kiseline. Antioksidativno djelovanje vodenih i etanolnih ekstrakata raste s ukupnim sadržajem fenola.

Filali-Ansari i sur.(2016) procijenili su antioksidativnu aktivnost izoliranih spojeva iz listova košćele in vitro mjerenjem aktivnosti hvatanja radikala DPPH i inhibicijom konjugiranih diena (CD) i TBARS (reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline) tijekom peroksidacije linolne kiseline. Svi testirani spojevi pokazali su značajan učinak hvatanja DPPH radikala ovisan o dozi. U koncentraciji od 16  $\mu$ g/ml, vanilinska kiselina je pokazala najveću aktivnost od svih ispitivanih uzoraka (75%). Slijede ju  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glukozid (66 %) i  $\beta$ -sitosterol (64 %) koji su bili viši od BHT (58%). Vrijednosti  $IC_{50}$  testiranih spojeva potvrđuju njihovu veću sposobnost hvatanja radikala u usporedbi sa BHT(12  $\mu$ g/ml ). Vanilinska kiselina bila je najaktivnija (8,2  $\mu$ g/ml), a slijede ju  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glukozid (9,5  $\mu$ g/ml) i  $\beta$ -sitosterol (10  $\mu$ g/ml).

Shokrzadeh i sur. (2018) procijenili su aktivnost hvatanja DPPH radikala vodeno-alkoholnog ekstrakta listova *C. australis*. Srednja vrijednost  $IC_{50}$  ,za standard askorbinske kiseline, bila je  $14,3 \pm 1,08$   $\mu$ g/ml, a srednja vrijednost  $IC_{50}$  vodeno-alkoholnog ekstrakta lista *C. australis* bila je  $80,5 \pm 1,73$   $\mu$ g/ml.

Hammash i sur. (2016) usporedili su sposobnost gašenja DPPH radikala ekstrakata lista i kore . Ekstrakti lista i kore imali su gotovo iste vrijednosti ( $IC_{50}$ list =  $0,1169 \pm 0,003$  mg/ml,  $IC_{50}$ kora =  $0,117 \pm 0,005$  mg/ml). BHT standard je imao nižu vrijednost  $IC_{50}$  od biljnih ekstrakata ( $IC_{50}$ BHT

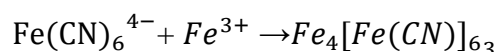
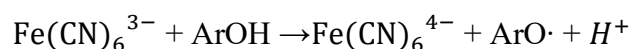


= 0,016 ± 0,001 mg/ml) što znači da je njegova sposobnost hvatanja radikala mnogo veća nego u biljnim ekstraktima. Sposobnost dva ekstrakta da gase radikalni DPPH bila je gotovo ista što se može objasniti se sličnošću sadržaja fenola u ekstraktima (mg/ml) u istoj koncentraciji. Ova studija pokazuje da metanolni( 80%) ekstrakti listova i kore biljne vrste *C. australis* imaju sposobnost doniranja protona i mogu poslužiti kao inhibitori slobodnih radikala.

Rezultat dobiven u ovom eksperimentalnom radu za etanolni ekstrakt lista ( $IC_{50}=4,30\pm 0,83$ ) pokazuje bolji antioksidativni potencijal od rezultata u gore navedenim istraživanjima metanolnog (80%) i vodeno -alkoholnog ekstrakta lista ( $IC_{50} = 0,1169\pm 0,003$  mg/ml i  $IC_{50}= 80,5 \pm 1,73$  µg/ml). U studiji iz 2011. godine etanolni ekstrakt lista u koncentraciji od 100 µg/ml također pokazuje manju sposobnost hvatanja DPPH radikala (67,2%) od našeg uzorka lista (80,21%). Studija iz 2021. godine pokazuje da u plodu leži puno veći antioksidativni potencijal ( $IC_{50}$  usplode= 7,1), od onog nađenog u ovom eksperimentalnom radu ( $IC_{50}$  plod= 221,76 ±5,799), što ukazuje na potrebu za daljnjim ispitivanjima u tom smjeru.

#### 4.3.2. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza (III)

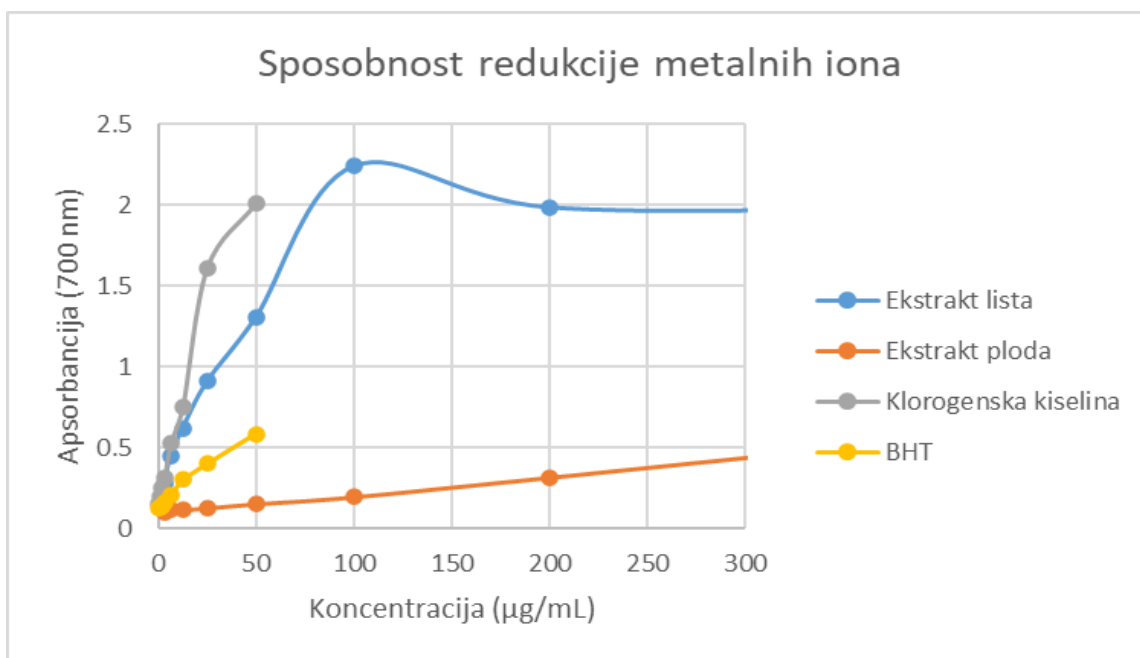
Mnoga istraživanja su pokazala da sposobnost doniranja elektrona, tj. sposobnost redukcije odražava antioksidativni potencijal bioaktivnih spojeva. Doniranjem elektrona zaustavlja se lančana reakcija stvaranja štetnih slobodnih radikala, a mogu se reducirati i oksidirani intermedijeri procesa lipidne peroksidacije (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Metoda određivanja sposobnosti redukcije temelji se na redukciji kalijevog heksacijanoferata, tj. redukciji  $Fe^{3+}$  iona u  $Fe^{2+}$  ion (prvi korak). U drugom koraku dodatkom soli trovalentnog željeza nastaje plava otopina (Berlinsko modriilo). Žuta boja ispitivanih otopina mijenja se u razne nijanse plave i zelene boje ovisno redukcijskoj moći ispitivanih uzoraka. Naveden koraci metode mogu se prikazati na sljedeći način:



Apsorbancija je mjerena na 700 nm. Redukcijska moć ispitivanih uzorka procijenjena je pomoću  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih interpolacijom iz odnosa srednje vrijednosti izmjenjenih apsorbancija te pripadajućih koncentracija uzoraka.  $IC_{50}$  predstavlja 50%-tnu redukcijску sposobnost ,a iskazana je kao koncentracija pri kojoj apsorbancija iznosi 0,5. Korišteni standardi su BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol) i klorogenska kiselina. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7.te na Slici 21.

**Tablica 7.** Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata listova i plodova vrste *C.australis* i referentnog spoja BHT i klorogenske kiseline. „/“ -nije mjereno. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije ± standardna devijacija.

Koncentracija (µg/mL)	Apsorbancija lista	Apsorbancija ploda	Apsorbancija BHT	Apsorbancija klorogenske kiseline
400	1,979±0,09	0,5595±0,04	/	/
200	1,9875±0,21	0,3165±0,04	/	/
100	2,2435±0,00	0,1975±0,01	/	/
50	1,31±0,04	0,1545±0,01	0,5865±0,05	2,0075±0,78
25	0,9125±0,02	0,1295±0,01	0,4035±0,03	1,6105±0,03
12,5	0,6225±0,04	0,119±0,02	0,304±0,02	0,756±0,01
6,25	0,4485±0,04	0,1195±0,02	0,212±0,01	0,5275±0,02
3,13	0,2845±0,01	0,1005±0,01	0,1655±0,01	0,3175±0,01
1,56	/	/	0,1355±0,00	0,252±0,01
0,78	/	/	0,136±0,01	0,2025±0,01
0,39	/	/	0,129±0,00	0,152±0,00



**Slika 21.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije metalnih iona za različite koncentracije etanolnih ekstrakata lista i ploda košćele i referentne otopine

Redukcijska sposobnost ekstrakata ploda i lista košćele ispitana je u koncentracijskom nizu od 3,13-400 µg/mL. Koncentracija uzorka lista pri kojoj je postignuta 50%-tna redukcijska sposobnost iznosi 9,27±1,00 µg/mL, a za uzorak ploda 340,03±29,42 µg/mL. IC<sub>50</sub> standarda klorogenske kiseline i BHT iznose 6,65±0,23 µg/ml, odnosno 38,55±6,79 µg/mL. To znači da list ima veću sposobnost redukcije od standarda BHT i od ploda, a nešto manju od standarda klorogenske

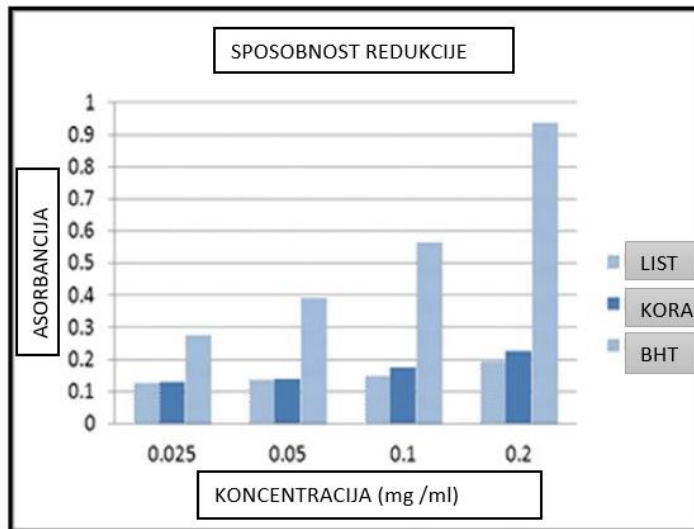
kiseline. Iz grafičkog prikaza (Slika 21.) vidljivo je da redukcijska moć uzoraka raste s porastom koncentracije, no kod lista sposobnost redukcije kreće padati iznad koncentracije od 100 µg/ml. Plod je opet pokazao daleko manji antioksidativni učinak od ostalih ispitivanih uzoraka.

Nakon ručnog frakcioniranja zrelih plodova na opnu (19,8%), jestivo usplođe (49,7%) i košticu (29,4%), Cascales i sur. (2021) odredili su prosječnu antioksidativnu aktivnost usplođa (FRAP) izraženu kao 3977 µmol ekv. Fe<sup>2+</sup>/100 g.

Shokrzadeh i sur.(2018) odredili su sposobnost redukcije metanolnih ekstrakta lista FRAP metodom. Vrijednosti dobivene za metanolne ekstrakte listova *C. australis* (595,98 µM Fe(II)/g) bile su značajno niže od vrijednosti askorbinske kiseline (1382,98 µM Fe (II)/g) i kvercetina (895,98 µM Fe (II)/g).

Hammash i sur. (2016) odredili su antioksidacijsku aktivnost kao sposobnost ekstrakata lista i kore da reduciraju Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup> (FRAP= ferric reducing ability power). Sposobnost redukcije ispitana je spektrofotometrijom za četiri koncentracije (0,025, 0,05, 0,1, 0,2) mg/ml svakog od dva ekstrakta i kontrolu. Rezultati su izraženi u dijagramu u usporedbi s vrijednostima za BHT kao ovisnost apsorbancije o koncentraciji uzorka. Metanolni (80%) ekstrakti lišća i kore imali su gotovo istu redukcijsku sposobnost pri niskim koncentracijama, ali pri većim koncentracijama ekstrakt kore pokazalo je nešto veću sposobnost redukcije od ekstrakta lišća. Sposobnost redukcije oba ekstrakta bila je niža od BHT-a. Superiornost redukcijske sposobnosti ekstrakta kore u odnosu na ekstrakt lista mogla bi se objasniti vrstom fenola koji se nalaze u svakom od dva ekstrakta.

Usporedba dijagrama (Slika 22.) studije iz 2016. godine sa rezultatima dobivenim u ovom radu za četiri iste koncentracije (24,50,100 i 200 µg/mL) dovodi do zaključka da ekstrakt lista u ovom eksperimentalnom radu pokazuje veću redukcijsku moć, tj. apsorbanciju (0,9125, 1,31, 2,2435 i 1,9875) od ekstrakta iz studije, u svim navedenim koncentracijama. Apsorbancija ekstrakta iz studije ne prelazi vrijednost od 0,2 čak ni pri najvećoj koncentraciji od 200 µg/mL (Slika 22.). Također, u ovom eksperimentalnom radu list je pokazao veću redukcijsku moć od standarda BHT, za razliku od navedene studije .



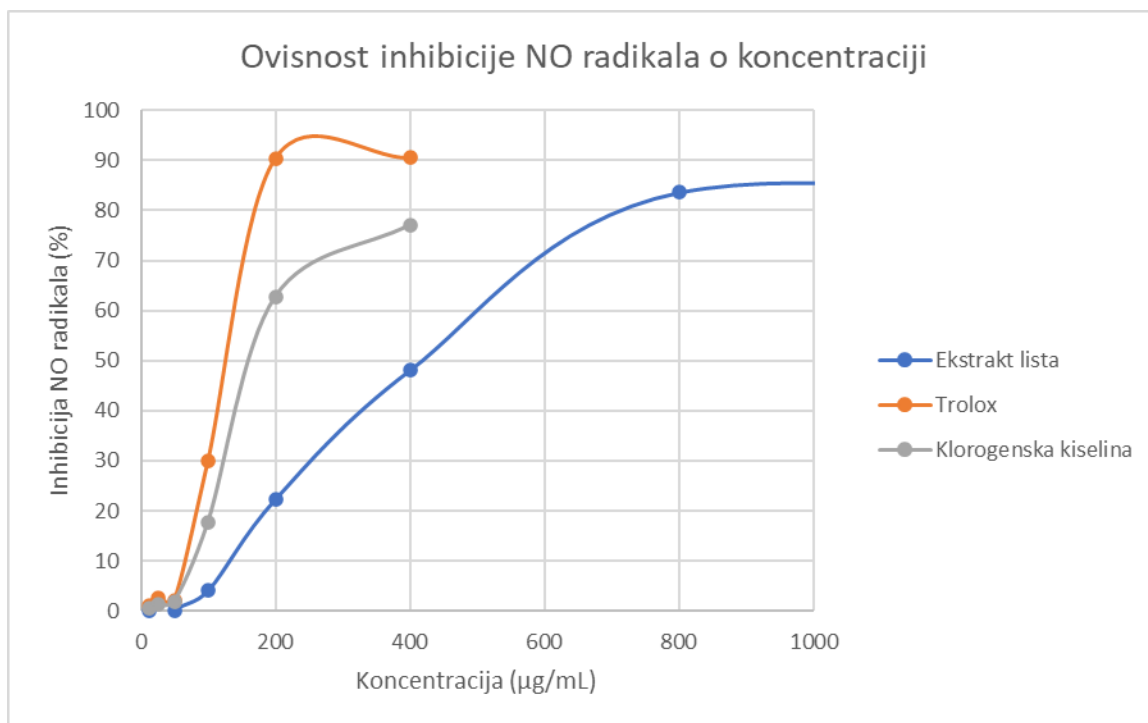
**Slika 22.** Prikaz sposobnosti redukcije ispitane za četiri koncentracije ekstrakta lista i kore (Hammash i sur., 2016)

#### 4.3.3. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida

Iako je NO važna signalna molekula uključena u regulaciju raznih fizioloških procesa, povećana proizvodnja NO može pridonijeti patogenezi neurodegenerativnih bolesti i upalnim ozljedama tkiva. NO može reagirati sa superoksidom i tako mogu nastati visoko reaktivne vrste dušika koje doprinose oksidativnom oštećenju (Kindl i sur., 2015). Da bi se ispitala sposobnost hvatanja slobodnih radikala dušikovog (II) oksida provedeno je spektrofotometrijsko ispitivanje ekstrakata ploda i lista *C.australis*. Reagens natrijev nitroprusid u vodenoj otopini pri fiziološkom pH (7,4) spontano oslobađa NO<sup>-</sup>, tj. on predstavlja izvor NO radikala. Nastali NO radikal reagira s kisikom, pri čemu nastaju nitrit ioni kojima se koncentracija u reakcijskoj smjesi određuje spektrofotometrijski na temelju Griess-ove reakcije diazotacije. Nitrit ioni u reakciji sa sulfanilamidom i NED-om (naftiletildiamin) pri kiselom pH daju ljubičasti kompleks čija se apsorbancija mjeri na 540 nm. Na temelju dobivenih apsorbancija u usporedbi s troloksom i klorogenskom kiselinom koji su korišteni kao poredbene tvari, izračunan je postotak inhibicije. Koncentracija uzorka koja ostvaruje 50%-tni učinak (IC<sub>50</sub>) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka. Dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 8. te na Slici 23.

**Tablica 8.** Sposobnost hvatanja slobodnih NO(II) radikala etanolnog ekstrakta lista vrste *C.australis* i referentnih spojeva, troloxa i klorogenske kiseline. „/“-nije mjereno. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije ± standardna devijacija.

Koncentracija (µg/mL)	Inhibicija NO radikala (%) LIST	Inhibicija NO radikala (%), Trolox	Inhibicija NO radikala (%) ,Klorogenska kiselina
1600	80,64±0,10	/	/
800	83,61±0,28	/	/
400	48,12±0,13	90,53±0,18	77,16±1,66
200	22,40±2,54	90,43±0,58	62,82±1,08
100	4,16±4,82	29,95±1,56	17,76±1,21
50	0,12±0,43	2,13±1,16	1,90±0,73
25	-6,71±0,15	2,68±0,88	1,39±0,45
12,5	0,05±1,03	1,10±0,25	0,44±0,38
6,25	/	-3,98±0,85	-4,99±0,23



**Slika 23.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti inhibicije NO radikala za različite koncentracije etanolnih ekstrakata lista košće i referentnih otopina

Uzorak ploda u ispitanom koncentracijskom nizu (6,25-1600 µg/mL) nije pokazao sposobnost inhibicije NO radikala, tj. antioksidacijski učinak. Uzorak lista pri koncentraciji od 452,86±7,54 µg/mL neutralizira 50% slobodnih radikala dušikovog (II) oksida. IC<sub>50</sub> za referentne antioksidanse troloks i klorogensku kiselinu, iznose 132,17±0,87 µg/mL i 171,26±2,62 µg/mL. Iz grafičkog prikaza (Slika 23.) vidljivo je da iznad određene koncentracije (800 µg/mL), tj. nakon postizanja

maksimalne inhibicije, list postepeno gubi antioksidativnu sposobnost. Može se zaključiti da ekstrakt lista ima manju sposobnost inhibicije NO radikala, tj. slabiji antioksidativni učinak od standarda (troloksa i korogenske kiseline), što je u skladu s rezultatima dobivenim DPPH testom.

**Tablica 9.** Usporedni pregled sadržaja flavonoida, fenolnih kiselina i trjeslovina uzorka lista i ploda košće, te njihovih IC50 vrijednosti.

	Udio sastavnice u %				IC50 (µg/mL)		
	Flavonoidi	Klorogenska kis.	Ružmarinska kis.	Trjeslovine	Sposobnost hvatanja DPPH•	Sposobnost redukcije	Sposobnost hvatanja NO•
<b>LIST</b>	0,316±0,01	3,16±0,02	1,66±0,02	1,61±0,18	4,30±0,83	9,27±1,00	452,86±7,54
<b>PLOD</b>	0,025±0,003	0,38±0,04	0,18±0,01	0,39±0,02	221,76±5,79	340,03±29,42	Nema učinak

Polifenolni spojevi poput flavonoida, fenolnih kiselina i tanina smatraju se glavnim doprinosiocima antioksidativnog djelovanja ljekovitog bilja, voća i povrća. List košće je pokazao znatno veći antioksidativni potencijal od ploda, što je u skladu s puno većim sadržajem polifenolnih spojeva (Tablica 9.). Može se zaključiti da postoji pozitivna korelacija između sadržaja polifenolnih sastavnica i antioksidacijskog djelovanja košće, što je u skladu s prethodnim istraživanjima na tu temu. Flavonoidi su pronađeni u mnogo manjim postocima od ostalih polifenola. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da antioksidacijskoj sposobnosti vrste *C. australis* L. vjerojatno doprinose fenolne kiseline i trjeslovine. Kako bismo utvrdili prisustvo i utjecaja flavonoida na antioksidacijsku sposobnost košće potrebna su dodatna istraživanja.

## 5. ZAKLJUČCI

Ovim diplomskim radom provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza sastava lista i ploda biljne vrste *Celtis australis* L., te je ispitan njen antioksidacijski potencijal. Tankoslojnom kromatografijom potvrđena je prisutnost rutina, izokvercitrina, ružmarinske i klorogenske kiseline, galne kiseline i  $\beta$ -sitosterola u listu. U plodu košćele identificirani su rutin, ružmarinska kiselina i  $\beta$ -sitosterol. Spektrofotometrijskim metodama određen je udio flavonoida, fenolnih kiselina i trjeslovina u listu i plodu košćele. Sadržaj flavonoida izražen kao izokvercetrozid u listu iznosi 0,316%, a u plodu 0,025%. Udio fenolnih kiselina, izraženih kao klorogenska kiselina, u listu iznosi 3,16%, a u plodu 0,38%. Udio fenolnih kiselina, izraženih kao ružmarinska kiselina, u listu iznosi 1,66%, a u plodu 0,18%. Udio trjeslovina u listu i plodu iznosi 1,61% i 0,39%. List košćele je daleko bogatiji polifenolnim sastavnicama od ploda. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata lista i ploda ispitan je primjenom triju spektrofotometrijskih metoda, a rezultati su uspoređeni s učinkom klorogenske kiseline kao sastavnice, te poredbenim antioksidansima, troloksom i BHT-om. Ispitivanom ekstraktu lista određena je sposobnost hvatanja DPPH radikala ( $IC_{50} = 4,30 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$ ), sposobnost redukcije  $Fe^{3+}$  iona ( $IC_{50} = 9,27 \pm 1,00 \mu\text{g/mL}$ ), te sposobnost hvatanja NO radikala ( $IC_{50} = 452,86 \pm 7,54 \mu\text{g/mL}$ ). Plod nije pokazao sposobnost hvatanja NO radikala, a dobivene  $IC_{50}$  vrijednosti za sposobnost hvatanja DPPH radikala i redukcije  $Fe^{3+}$  iona iznosile su  $221,76 \pm 5,79 \mu\text{g/mL}$  i  $340,03 \pm 29,42 \mu\text{g/mL}$ . Ekstrakt lista pokazao je bolju antiradikalnu aktivnost i veću redukcijsku moć od ekstrakata ispitivanih u prethodnim istraživanjima. Upravo suprotno, prethodne studije pokazuju da u plodu leži veći antioksidacijski potencijal od potencijala nađenog u ovom eksperimentalnom radu. Sve tri metode potvrdile su superiorniji antioksidacijski potencijal lista u odnosu na plod, što je u skladu s većim sadržajem polifenolnih sastavnica u listu. Moguće je zaključiti da postoji pozitivna korelacija između sadržaja polifenola i antioksidacijskog učinaka. S obzirom da su flavonoidi pronađeni u mnogo manjim postocima od ostalih polifenolnih sastavnica, pronađena antioksidacijska sposobnost ne može se povezati s njihovom prisutnošću. Čini se da su fenolne kiseline i trjeslovine bioaktivne sastavnice koje pridonose antioksidacijskom potencijalu lista i ploda košćele.

Ovaj rad je u određenoj mjeri potvrdio primjenu lista *C. australis* u tradicionalnoj medicini. Iz rezultata proizlazi da upotreba ploda i lista (u znatno većoj mjeri od ploda) vrste *Celtis australis* kao prirodnih izvora antioksidansa može pripomoći u prevenciji bolesti i poremećaja koji se povezuju s oksidacijskim stresom. Iz istih razloga trebalo bi razmotriti potencijalnu primjenu

košće u prehrambenoj industriji. Navedeni rezultati dobar su temelj za daljnja ispitivanja na listu i plodu košće pri čemu bi se trebalo usredotočiti na izolaciju , pročišćavanje i identifikaciju aktivnih komponenti što bi pridonijelo razjašnjavanju njenih bioloških učinaka.



## 6. LITERATURA

Ahmad S, Sharma R, Mahajan S, Gupta A. Antibacterial activity of *Celtis australis* by invitro study. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2012, 4, 629-631.

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

Ayala A, Muñoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hidroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014, 1-31.

Badoni R, Semwal DK, Rawat U, Singh GJP. Celtisanin, a novel sulphonated phenolic from *Celtis australis* L. fruits. *Nat Prod Res*, 2010, 24, 1282-1286.

Badoni R, Semwal DK, Rawat U. Fatty acid composition and antimicrobial activity of *Celtis australis* L. fruits. *J Sc Res*, 2010, 2, 397-402.

Badoni R, Semwal DK, Badoni PP, Kothiyal SK, Rawat U. A novel bacteriohopanoid from *Celtis australis* L. bark. *Chin Chem Lett*, 2011, 22, 81-84.

Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*, 2005, 26, 3-31.

Cascales EV, Prencipe D, Nocentini C, Sánchez RL, García JMR. Characteristics and composition of hackberries (*Celtis australis* L.) from Mediterranean forests. *Emir J Food Agric*, 2021, 37-44.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. U: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, urednici, Blackwell Publishing Ltd, 2006, str. 1-25.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural Products (Secondary Metabolites). U: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan B, Gruissem W, Jones R, urednici, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 2000, str. 1250-1251.

Dorbić B, Dukić S, Friganović E, Davitkovska M, Bogevska Z, Vujošević A, Popović S. Percepcije i stavovi o ukrasnim karakteristikama i primjeni submediteranskog listopadnog drveća u zimskom razdoblju-Perceptions and attitudes about ornamental characteristics of sub-mediterranean deciduous trees during the winter season. *Glasiilo Future*, 2018, 1, 1-16.

Durazzo A, Nazhand A, Lucarini M, Silva AM, Souto SB, Guerra F, Santini A. Astragalus (*Astragalus membranaceus* Bunge): botanical, geographical, and historical aspects to pharmaceutical components and beneficial role. *Rend Lincei Sci Fi Nat*, 2021, 32, 625-642.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 9. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2019, str. 288., 1376-1378., 1384-1385.

El-Alfy TS, El-Gohary H, Sokkar NM, Hosny M, Al-Mahdy DA. A new flavonoid C-glycoside from *Celtis australis* L. and *Celtis occidentalis* L. leaves and potential antioxidant and cytotoxic activities. *Sci Pharm*, 2011, 79, 963-975.

Feng W, Hao Z, Li M. Isolation and Structure Identification of Flavonoids. U: Flavonoids From biosynthesis to human health. Justino J, urednik, Rijeka, Intech, 2017, str.17-18.

Filali-Ansari N, El Abbouyi A, Kijjoa A, El Maliki S, El Khyari S. Antioxidant and antimicrobial activities of chemical constituents from *Celtis australis*. *Der Pharma Chem*, 2016, 8, 338-347.

Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Caboni MF. Phenolic Compounds and Saponins in Plants Grown Under Different Irrigation Regimes. U: Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Watson RR, urednik, Elsevier, 2014, str. 37-48.

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Rijeka, Ex libris, 2005 ,str.66.

Güneş A, Kordalib Ş, Turanc M, Usanmaz Bozhüyükd A. Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. *Ind Crops Prod*, 2019, 137, 208-213.

Hammash D, Kitaz A, Sabbagh G. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of leaves and bark extracts of *Celtis australis* L. *Int J Pharm Sci Nanotech*, 2016, 9, 3188-3192.

Jurc M, Csóka G, Hrašovec B. Potentially important insect pests of *Celtis australis* in Slovenia, Croatia and Hungary. *Šumar List*, 2016, 140, 577-588.

Kaltenhauser M, Ellmerer EP, Zidorn C. Rhamnopyranosylvitexin derivatives from *Celtis australis*. *J Serb Chem Soc*, 2010, 75, 733-738.

Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six Thymus species. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015.

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

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*, 2013,2013.

Nodeh HR, Rashidi L, Gabris MA, Gholami Z, Shahabuddin S, Sridewi N. Chemical and physical characterization of the hackberry (*Celtis australis*) seed oil: Analysis of tocopherols, sterols, ECN and fatty acid methyl esters. *J Oleo Sci* , 2020, ess20128.

Ota A, Višnjevec AM, Vidrih R, Prgomet Ž, Nečemer M, Hribar J, Ulrich NP. Nutritional, antioxidative, and antimicrobial analysis of the Mediterranean hackberry (*Celtis australis* L.). *Food Sci Nut.*, 2017, 5, 160-170.

Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Kopačin T, Jozinović A, Jović T, Đidara M. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva*, 2016, 70, 71-92.

Pevalek-Kozlina B. Fiziologija bilja. Zagreb, Profil International, 2003, str. 470-485.

Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. Lipid peroxidation products in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* , 2013, 2013, 1-2.

Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 2866-2887.

Rodrigo R, Libuy M. Modulation of plant endogenous antioxidant systems by polyphenols. *Polyphenols in Plants* , Academic Press, 2014, 65-85.

Sadoq IZ, Abubakar FS, Ibrahim B, Usman MA, Kudan ZB. Medicinal plants for management and alternative therapy of common ailments in Dutsin-Ma (Katsina State) in Nigeria. *Herba Pol*, 2019, 65.

Shahidi F, Nazck M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton, Florida, CRC press LLC, 2004, str. 1-82.

Shokrzadeh M, Jouybari HB, Hosseinpour M, Ziar A, Habibi E. Antioxidant and protective effect of hydroalcoholic extract of *Celtis australis* L. on CCL4 induced liver toxicity. *Pharm biomed res*, 2018, 4, 26-31.

Sommavilla V, Haidacher-Gasser D, Sgarbossa M, Zidorn C. Seasonal variation in phenolics in leaves of *Celtis australis* (Cannabaceae). *Biochem Syst Ecol*, 2012, 41, 110-114.

Soulaidopoulos S, Tsiogka A, Chrysohoou C, Lazarou E, Aznaouridis K, Doundoulakis I, Lazaros G. Overview of Chios Mastic Gum (*Pistacia lentiscus*) Effects on Human Health. *Nutrients*, 2022, 14, 590.

Spitaler R, Gurschler S, Ellmerer E, Schubert B, Sgarbossa M, Zidorn C. Flavonoids from *Celtis australis* (Cannabaceae). *Biochem Syst Ecol*, 2009, 37, 120-121.

Šilić Č. Atlas dendroflora (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine. Sarajevo, Čitluk: Matica hrvatska : Franjevačka kuća; Masna Luka, 2005, str. 140.

Štefan L, Tepšić T, Zavidović T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.

Tohma HS, Gulçin I. Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Aerial Parts and Roots of Turkish Liquorice (*Glycyrrhiza Glabra* L.). *Int J Food Prop*, 2010, 13, 657-671.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: *Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health*. Rao V, urednik, London, IntechOpen, 2012, str.155-180.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Alegro A, Koszegi T, Petrik J. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules*, 2011, 16, 1454-1470.

Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin, Springer, 1996, str.195-244.

Wang T, Li Q, Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm*, 2018, 13, 12-23.

Wink M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* 2015, 2, 251-286.

Wu CR, Lin WH , Hseu YC, Lien JC, Lin YT, Kuo TP, Ching H. Evaluation of the antioxidant activity of five endemic Ligustrum species leaves from Taiwan flora in vitro. *Food Chem*, 2011, 127, 564-571.

Zehrmann N, Zidorn C, Ganzera M. Analysis of rare flavonoid C-glycosides in *Celtis australis* L. by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal* , 2010, 51, 1165-1168.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Ovim diplomskim radom analiziran je fitokemijski sastav te je ispitano antioksidacijsko djelovanje listova i plodova vrste *Celtis australis* L., sakupljenih u jesen 2020. godine na području Istre. Tankoslojnom kromatografijom potvrđena je prisutnost rutina, izokvercitrina, ružmarinske i klorogenske kiseline, galne kiseline i  $\beta$ -sitosterola u listu. U plodu su identificirani rutin, ružmarinska kiselina i  $\beta$ -sitosterol. Primjenom spektrofotometrijskih metoda određen je sadržaj flavonoida, fenolnih kiselina i trjeslovina. Sadržaj flavonoida listu iznosi 0,316%, a u plodu 0,025%. Udio fenolnih kiselina u listu iznosi 3,16% (klorogenska kiselina) i 1,66% (ružmarinska kiselina), a u plodu 0,38% (klorogenska kiselina) i 0,18% (ružmarinska kiselina). Udio trjeslovina u listu i plodu iznosi 1,61% i 0,39%. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata određen je trima spektrofotometrijskim metodama. Određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala (list:  $IC_{50}=4,30\pm 0,83 \mu\text{g/mL}$ , plod:  $IC_{50}=221,76\pm 5,79 \mu\text{g/mL}$ ) određivanjem sposobnosti redukcije  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$  (list:  $IC_{50}=9,27\pm 1,00 \mu\text{g/mL}$ , plod:  $IC_{50}=340,03\pm 29,42 \mu\text{g/mL}$ ) i određivanjem sposobnosti hvatanja NO radikala (list:  $IC_{50}=452,86\pm 7,54 \mu\text{g/mL}$ ) utvrđen je superiorniji antioksidacijski potencijal lista u odnosu na plod.

This graduation thesis examined the composition and antioxidant activity of leaves and fruits of the plant *Celtis australis* L., harvested in 2020 (autumn) in Istria. Thin-layer chromatography confirmed the presence of rutin, isoquercitrin, rosmarinic and chlorogenic acid, gallic acid and  $\beta$ -sitosterol in the leaf. Rutin, rosmarinic acid and  $\beta$ -sitosterol were identified in the fruit. The content of flavonoids, phenolic acids and tannins was determined using spectrophotometric methods. The content of flavonoids in the leaf is 0.316%, and in the fruit 0.025%. The proportion of phenolic acids in the leaf is 3.16% (chlorogenic acid) and 1.66% (rosmarinic acid), and in the fruit 0.38% (chlorogenic acid) and 0.18% (rosmarinic acid). The proportion of tannins in the leaf and fruit is 1.61% and 0.39%. The antioxidant effect of ethanol extracts was determined by three spectrophotometric methods. By determining the ability to capture the DPPH free radical (leaf:  $IC_{50}=4.30\pm 0.83 \mu\text{g/mL}$ , fruit:  $IC_{50}=221.76\pm 5.79 \mu\text{g/mL}$ ) by determining the ability to reduce  $Fe^{3+}$  in  $Fe^{2+}$  (leaf:  $IC_{50}=9.27\pm 1.00 \mu\text{g/mL}$ , fruit:  $IC_{50}=340.03\pm 29.42 \mu\text{g/mL}$ ) and by determining the ability to trap NO radicals (leaf:  $IC_{50}=452.86\pm 7.54 \mu\text{g/mL}$ ) the superior antioxidant potential of the leaf compared to the fruit was proved.

## **Fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak lista i ploda vrste *Celtis australis* L.**

**Lucija Peršun**

### **SAŽETAK**

Ovim diplomskim radom analiziran je fitokemijski sastav te je ispitano antioksidacijsko djelovanje listova i plodova vrste *Celtis australis* L. ,sakupljenih u jesen 2020. godine na području Istre. Tankoslojnom kromatografijom potvrđena je prisutnost rutina, izokvercitrina , ružmarinske i klorogenske kiseline, galne kiseline i  $\beta$ -sitosterola u listu. U plodu su identificirani rutin, ružmarinska kiselina i  $\beta$ -sitosterol. Primjenom spektrofotometrijskih metoda određen je sadržaj flavonoida, fenolnih kiselina i trjeslovina. Sadržaj flavonoida listu iznosi 0,316%, a u plodu 0,025%. Udio fenolnih kiselina u listu iznosi 3,16% (klorogenska kiselina ) i 1,66% (ružmarinska kiselina), a u plodu 0,38%(klorogenska kiselina) i 0,18% (ružmarinska kiselina). Udio trjeslovina u listu i plodu iznosi 1,61% i 0,39%. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata određen je trima spektrofotometrijskim metodama. Određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala (list:  $IC_{50}=4,30\pm 0,83$   $\mu\text{g/mL}$ , plod:  $IC_{50}=221,76\pm 5,79$   $\mu\text{g/mL}$ ) određivanjem sposobnosti redukcije  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ (list:  $IC_{50}=9,27\pm 1,00$   $\mu\text{g/mL}$ , plod:  $IC_{50}=340,03\pm 29,42$   $\mu\text{g/mL}$ ) i određivanjem sposobnosti hvatanja NO radikala (list:  $IC_{50}=452,86\pm 7,54$   $\mu\text{g/mL}$ ) utvrđen je superiorniji antioksidacijski potencijal lista u odnosu na plod.

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

Rad sadrži: 62 stranice, 23 grafičkih prikaza, 9 tablica i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Celtis australis* L., list, plod, antioksidacijski učinak, fenolni spojevi, apsorbanacija, spektrofotometrija, tankoslojna kromatografija

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

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

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

**Dr. sc. Ana Marija Domijan**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: studeni 2022.

## **Phytochemical composition and antioxidant effect of leaf and fruit of *Celtis australis* L.**

**Lucija Peršun**

### **SUMMARY**

This graduation thesis examined the composition and antioxidant activity of leaves and fruits of the plant *Celtis australis* L., harvested in 2020 (autumn) in Istria. Thin-layer chromatography confirmed the presence of rutin, isoquercitrin, rosmarinic and chlorogenic acid, gallic acid and  $\beta$ -sitosterol in the leaf. Rutin, rosmarinic acid and  $\beta$ -sitosterol were identified in the fruit. The content of flavonoids, phenolic acids and tannins was determined using spectrophotometric methods. The content of flavonoids in the leaf is 0.316%, and in the fruit 0.025%. The proportion of phenolic acids in the leaf is 3.16% (chlorogenic acid) and 1.66% (rosmarinic acid), and in the fruit 0.38% (chlorogenic acid) and 0.18% (rosmarinic acid). The proportion of tannins in the leaf and fruit is 1.61% and 0.39%. The antioxidant effect of ethanol extracts was determined by three spectrophotometric methods. By determining the ability to capture the DPPH free radical (leaf:  $IC_{50}=4.30\pm 0.83$   $\mu\text{g/mL}$ , fruit:  $IC_{50}=221.76\pm 5.79$   $\mu\text{g/mL}$ ) by determining the ability to reduce  $Fe^{3+}$  in  $Fe^{2+}$  (leaf:  $IC_{50}=9.27\pm 1.00$   $\mu\text{g/mL}$ , fruit:  $IC_{50}=340.03\pm 29.42$   $\mu\text{g/mL}$ ) and by determining the ability to trap NO radicals (leaf:  $IC_{50}=452.86\pm 7.54$   $\mu\text{g/mL}$ ) the superior antioxidant potential of the leaf compared to the fruit was proved.

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

Thesis includes: 62 pages, 23 figures, 9 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Celtis australis* L., 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: November 2022.



