Udio flavonoida u ekstraktima lista rogača (Ceratonia siliqua L.): utjecaj lokaliteta i spola biljke

Lovrić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:754250

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Maja Lovrić

Udio flavonoida u ekstraktima lista rogača (Ceratonia siliqua L.): utjecaj lokaliteta i spola biljke

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Veliko hvala mentorici Dubravki Vitali Čepo na razumijevanju, podršci i ogromnoj pomoći oko izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se mojim roditeljima i mojim dragim sestrama Mirni i Mihaeli na svom razumijevanju, ljubavi i strpljenju u svim situacijama kada mi je upravo to bilo potrebno. Posebno hvala mami Leli i tati Radeku koji su me ponosno i s povjerenjem pratili kroz studij, ali i kroz cijeli život do sada. Isto tako veliko hvala bakama Miri i Giti na svim molitvama i dobrim mislima koje me uvijek prate.

Zahvaljujem se mojem Luki na svoj ljubavi koju mi nesebično daje od prvog dana kada me upoznao. Zbog njega se sve teške situacije uvijek čine gotovo bezazlene. Isto tako, veliko hvala Lukinim roditeljima na iznimnoj snazi koju su mi dali kada mi je to bilo najpotrebnije.

Hvala mojoj najboljoj prijateljici Andrei koja me uvijek prati kroz sve moje tuge i sreće, dobre i loše situacije, zdravlje i bolest. Zahvaljujem se mojim curkama, kolegicama, ali na prvom mjestu dragim prijateljicama Maji i Marini na svakom prekrasnom zajedničkom trenutku za vrijeme studija i između. Zbog njih je cijelo ovo iskustvo obojano šarenim bojama, veselo i puno smijeha, a bez njih bi bilo jednobojno.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.2. Rogač 2
1.2.1. Općenito o rogaču 2
1.2.2. Primjena rogača u prehrani 4
1.2.3. Farmaceutska primjena rogača 5
1.3. Flavonoidi 5
1.3.1. Djelovanje flavonoida 6
1.3.1.1. Antioksidativno djelovanje 6
1.3.1.2. Antiupalno djelovanje 7
1.3.1.3. Antimikrobno djelovanje 8
1.3.1.4. Hepatoprotektivno djelovanje 8
1.3.1.5. Antidijabetsko djelovanje 9
1.3.1.6. Antikancerogeno djelovanje 9
1.3.1.7. Kardioprotektivno djelovanje 9
1.4. Metode separacije i određivanja flavonoida u uzorku 10
1.4.1. Priprema uzorka 10
1.4.2. LC – tekućinska kromatografija 10
1.4.3. Druge 12
1.4.3.1. Plinska kromatografija 12
1.4.3.2. Tankoslojna kromatografija 12
1.4.3.3. Kapilarna elektroforeza 12
2. OBRAZLOŽENJE TEME 14
3. MATERIJALI I METODE 16
3.1. Materijali 17
3.1.1. Ispitivani materijal 17
3.1.2. Kemikalije i reagensi 17
3.1.3. Korišteni instrumenti 17
3.2. Metode 17
3.2.1. Određivanje lipida metodom po Soxhletu 18
3.2.2. Određivanje flavonoida spektrofotometrijskom metodom s $AlCl_3$ 19
3.2.2.1. Princip metode 19

3.2.2.2. Priprema uzorka 20
3.2.2.3. Izrada baždarnog dijagrama 20
3.2.2.4. Statistička analiza 21
4. REZULTATI 22
4.1. Udio masti u listovima rogača 23
4.2. Udio flavonoida u listu rogača 24
5. RASPRAVA 25
5.1. Utjecaj spola na udio flavonoida u listu 26
5.2. Utjecaj lokalteta na udio flavonoida u listu rogača 29
6. ZAKLJUČCI 32
7. LITERATURA 34
8. SAŽETAK/SUMMARY 38
8.1. Sažetak 39
8.2. Summary 40

1. UVOD

1.2. Rogač

1.2.1. Općenito o rogaču

Rogač (*Ceratonia sliqua, L.)* je biljka iz porodice mahunarki, *Fabaceae* (Biner i sur., 2007) te pripada podporodici *Caesalpinioidae*. To je višegodišnja bljka, a raste kao zimzeleni grm ili stablo te je podrijetlom iz mediteranske regije gdje vlada subtropska mediteranska klima. Osim mediterana nastanjuje i područja Kalifornije, Australije, Južne Amerike, Čilea te područje od Srednjeg Istoka do Zapadne Azije pa čak i Kanarske otoke i Makroneziju.
Stablo rogača (Slika 1.) raste kao zimzeleni grm do visine od 15 m, a može biti muško, žensko ili dvospolno. Za život ovo drvo zahtijeva minimalnu brigu te mu životni vijek traje čak do 150g. Listovi drveta rogača su dugi do 7 cm, postavljeni parno perasto, zimzeleni su i kožasti, a opadaju u srpnju svake druge godine te se u proljeće djelomično obnavljaju (Batlle i Tous, 1997). Drvo cvijeta ujesen, a cvjetovi su mali, mnogobrojni, neprimjetni i jednospolni. Plodovi se javljaju tek nakon 5 do 6 godina, a razvijaju se u obliku mahune koja se sastoji od pulpe ili mezokarpa i sjemenki. Muško drvo ne proizvodi plodove.



Slika 1. Stablo rogača (Ceratonia siliqua, Fabaceae)

Sirovi plodovi rogača koriste se u prehrani još od antičkih vremena (Owen i sur., 2003.). Danas su plodovi pronašli široku primjenu te se osim u svrhu prehrane koriste i u proizvodnji kozmetičkih i farmaceutskih pripravaka (Batlle i Tous, 1997) te u proizvodnji guma.

Kroz mnoga stoljeća rogač se koristi u prehrani, kako kod ljudi tako i kod životinja, te je zbog toga važan sastavni dio mediteranske vegetacije.



Slika 2. Ceratonia siliqua, L. (Thomé, 1885)

1.2.2. Primjena rogača u prehrani

Upotreba rogača u prehrambene svrhe seže još iz antičkog doba, kada su Stari Grci i Egipćani konzumirali pečene sjemenke i vodene ekstrakte rogača kao dio prehrane (Marakis, 1996).
Danas se također, u modernom društvu, mahune rogača koriste u različitim prehrambenim proizvodima.
Važan proizvod je brašno rogača koje se koristi u ljudskoj prehrani, a dobiva se sijanjem rogača bez sjemenki te tostiranjem i mljevenjem. Prah je dobre nutritivne vrijednosti i dugog roka trajanja, a ističe se visokim udjelom šećera i niskim udjelom masti. Zbog svog sastava od 46% šećera, 7% proteina i malih količina brojnih minerala i vitamina, rogač je kao prehrambena namirnica vrlo hranjiv. Osim šećera koji se nalazi u znatnim količinama sadrži i prehrambena vlakna u sastavu do 40% (Marakis, 1996), te polifenolne komponente do 20% (Makris i Kefalas, 2004), a bogat je željezom i fosforom. Nutritivna vrijednost mahuna rogača je usporediva s onom žitarica poput pšenice i ječma (Battle i Tous, 1997).
Brašno rogača koristi se kao sastojak hrane, zamjena za kakao ili kao sirovina za proizvodnju dijetetskih proizvoda.
Rogač je idealna zamjena za kakao, a njegova se prednost može pripisati činjenici da brašno rogača ne sadrži kofein, teobromin i oksalnu kiselinu, a ima nizak sadržaj masti (maksimalno 2.3%) (Biner i sur., 2007). Osim ovih kvaliteta, rogač sadrži i veću količinu prehrambenih vlakana od kakaa (Yousif i Aghzawi, 2000), te viši udio šećera zbog čega smanjuje potrebu za dodatnim šećerima i zaslađivačima (Kumazawa i sur., 2002). Zbog ove karakteristike postoje brojni prehrambeni proizvodi kao što su mliječni proizvodi, instant napitci na bazi rogača, peciva i kolači (Gruendel i sur., 2006.) koji idealno zamjenjuju slične čokoladne proizvode.

Osim kao zamjena za kakao, rogač se koristi kao prirodni dodatak hrani (E 410), a za to je zaslužan galaktomanan kojeg dobivamo iz endosperma sjemena (Barracosa i sur., 2007.). Također, rogač se koristi za proizvodnju šećera i melasa, a prirodni antioksidansi koji se nalaze u sjemenoj ovojnici i plodu danas su potencijalne sirovine u prehrambenoj industriji (Barracosa i sur., 2007.)

1.2.3. Farmaceutska primjena rogača

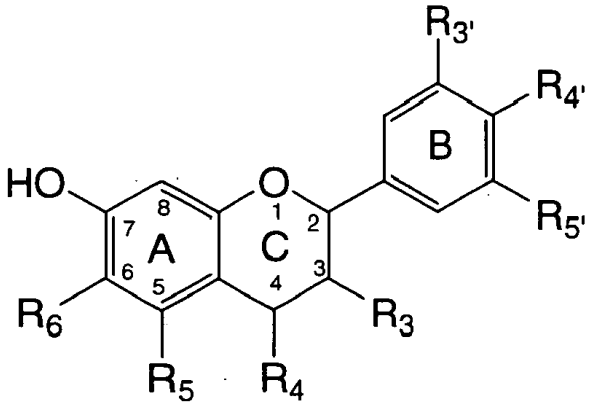
Pod nazivom, *Ceratonia siliqua* L., nalazimo drogu rogača, tamnosmeđe boje i slatkastog okusa.
Još u doba Starih Grka i Rimljana nezreli plodovi rogača koristili su se kao lijek. Danas se na tržištu mogu naći različiti ljekoviti pripravci upravo na bazi rogača.
Rogača je dobar stabilizator probave što ga čini upotrebljivim sredstvom protiv proljeva ili dijareje (kod dojenčadi i male djece), kod enteritisa ili upale intestinalne mukozne sluznice i dispepsije ili otežane probave. Također, danas se kod odraslih osoba koristi i za liječenje gastritisa te gastroenteritisa. Svoje povoljno djelovanje na probavu rogač posjeduje zahvaljujući trjeslovinama, pektinu i ligninu. Trjeslovine su snažni adstringensi, a adstringentno djelovanje se javlja uslijed reakcije trjeslovina s proteinima zbog čega dolazi do taloženja proteina i stvaranja zaštitnog polisaharidnog sloja na sluznici. Ovakav formirani zaštitni sloj smanjuje podražaj u crijevima, a upotrebom rogačevog pripravka nakon 2 dana dolazi do formacije stolice te nakon 6 do 8 dana do potpunog oporavka (Samaržija, 2013.).

Osim kao probavni antidijaroik, rogač se koristi i u preparatima za mršavljenje te u kozmetičkim proizvodima.

S obzirom na svoj sastav koji uključuje mnoštvo komponenata, između ostalog jednostavne fenole, polifenole, slobodne flavonoide, glikozilirane flavonoide i ostale antioksidativne spojeve, danas se list rogača ispituje kao potencijalni jeftini izvor antioksidansa. Zbog tih svojstava rogač je također zanimljiv i sve više istraživan u farmaceutskoj industriji.

1.3. Flavonoidi

Flavonoidi spadaju u skupinu polifenolnih spojeva koje sintetiziraju biljke. Dijele se u podrazrede, a u njih spadaju flavoni, flavonoli, flavanoni, biflavonoidi, flavonolignani i izoflavonoidi. Zbog svojih dobrobiti koje imaju na zdravlje znanstvenici su povećali svoj interes kako bi objasnili njihove učinke i djelovanja.



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida

Tablica 1. Flavonoidni spojevi, Kuštrak 2005.

Flavonoidi	Flavoni	apigenin, luteonin, viteksin
	Flavonoli	kemferol, kvercetin, miricetin, izoramnetin, hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin, rutin, astragalin
	Flavanoni	hesperetin, naringenin
	Biflavonoidi	amentoflavon
	Flavonolignani	silibin, silikristin silidianin
	Izoflavonoidi	daidzein, genistein

1.3.1. Djelovanje flavonoida

1.3.1.1. Antioksidativno djelovanje

Najbolje opisano svojstvo skoro svake grupe flavonoida je njihovo antioksidativno djelovanje. Flavoni i katehini su najmoćniji flavonoidi koji čuvaju organizam od reaktivnih kiskovih spojeva (ROS). Povećana produkcija reaktivnih kisikovih spojeva u organizmu prati većinu tkivnih ozljeda i zbog toga su povezani sa upalnim, imunološkim, kardiovaskularnim i

kancerogenim oboljenjima. Kvercetin, kamferol, morin, miricetin i rutin sa svojim antioksidativnim djelovanjem imaju značajno antiupalno, antialergijsko, antivirusno i antikancerogeno djelovanje koje je povezano sa njihovom sposobnosti donacije hidrogena. Fenolne grupe flaovonoida služe kao izvor H^+ atoma. Hidroksil grupa na B prstenu je najvažnija za neutralizaciju ROS i RNS jer donira hidrogen i jedan elektron hidroksilnom, preoksidnom i peroksinitritnom radikalu te ih na taj način stabilizira. Flavonoidi inhibiraju enzime uključene u stvaranje ROS kao što su mikrosomalna monooksigenaza, glutation S-transferaza, mitohondrijalna sukcioksigenaza, NADH oksidaza i sl. Prisutnost, pozicija, struktura i ukupan broj uglikohidratnih skupina u flavonoidima igraju veliku ulogu u njihovom antioksidativnom djelovanju. Aglikoni su puno potentniji antioksidansi u usporedbi sa njihovim glikozidima. Što se tiče djelovanja flavonoida, danas se zna da su oni učinkoviti hvatači slobodnih radikala u *in vitro* testovima (Heijnen i sur., 2001., Chun i sur., 2003.). Međutim, doprinos flavonoida iz hrane antikosidativnoj funkciji u plazmi i tkivima je mali ili nikakav. Isto tako, teorija o djelovanju flavonoida isključivo kao antioksidansa opovrgnula je teorija u kojoj se opisuje njihovo djelovanje kao modulatora signalnih puteva u stanici (Williams i sur, 2004.).

1.3.1.2. Antiupalno djelovanje

Određeni flavonoidi imaju značajan utjecaj na imunološki sustav i upalne stanice. Hesperidin, apigenin, luteolin i kvercetin imaju dokazano antiupalno i analgetsko djelovanje. Flavonoidi mogu utjecati posebno na funkciju enzima koji su uključeni u upalni proces, posebno na tirozin, serin-treonin i protein kinazu. Inhibicija kinaza događa se zbog kompetitivnog povezivanja flavonoida sa ATP-om na katalitičkoj strani samog enzima. Isto tako, zabilježeno je da flavonoidi imaju sposobnost inhibicije ekspresije izoformi inducibilne nitrit-oksid sintaze, ciklooksigenaze i lipooksigenaze, koje su odgovorne za produkciju velike količine nitrit oksida, prostanoida, leukotrijena i ostalih medijatora upale kao što su citokini, kemokini ili adhezivne molekule. Zabilježeno je da kvercetin inhibira mitogen stimuliranu sekreciju imunoglobulina IgG, IgM, IgA *in vitro*.

Također, dokazano je da aglikoni flavonoida i glikozidi flavona i flavonola imaju značajno antiupalno djelovanje u akutnim i kroničnim upalama kad su dani *per os* ili topikalno

animalnim modelima. Isto tako, hesperedin - citrusni flavonoid posjeduje značajno antiupalno i analgetsko djelovanje (Tanwar i Modgil, 2012.).

1.3.1.3. Antimikrobno djelovanje

Flavonoidi su također ispitani obzirom na njihovo antibakterijsko, antifungalno i antivirusno djelovanje.

Antibakterijsko djelovanje je pronađeno u različitim flavonoidima. Zabilježeno je da kvercetin ima potpuno inhibitorno djelovanje na rast bakterije *Staphylococcus aureus*. Antibakterijsko djelovanje flavonoida ima više ciljanih mjesta djelovanja u stanici bakterije, a jedna od njih je tvorba kompleksa sa proteinima kroz nespecifične veze kao što je hidrogen veza i hidrofobne veze ali i formacija kovalentne veze. Također, antimikrobno djelovanje može biti povezano sa sposobnosti flavonoida da inaktiviraju bakterijske adhezine, enzime i transport proteina. Lipolitički flavonoidi mogu ometati i funkciju bakterijskih membrana (Kumar i K. Pandey, 2013.).

Antivirusno djelovanje flavonoida poznato je još iz 1940.-ih, ali tek od nedavno je bolje istraženo. Kvercetin, morin, rutin, dihidrokvercetin, apigenin, katehin i hesperidin imaju zabilježeno antivirusno djelovanje na 11 različitih tipova virusa. Pretpostavljen mehanizam antivirusnog djelovanja je inhibicija virusnih polimeraza i povezivanje virusnih nukleinskih kiselina ili njihovih kapsularnih proteina. Njihovo djelovanje je povezano sa neglikozidnim komponentama flavonoida i hidroksilacijom na poziciji 3. Danas se proučava i njihovo djelovanje na HIV-1 i HIV-2 viruse, s time da flavan-3-oli imaju najznačajnije djelovanje (Tanwar i Modgil, 2012.).

1.3.1.4. Hepatoprotektivno djelovanje

Nekoliko flavonoida kao što su katehin, apigenin, kvercetin, naringenin i rutin imaju zabilježeno hepatoprotektivno djelovanje.

Silimarin je flavonoid sa tri strukturalne komponente: silibin, silidianin i silikristin koji su ekstrahirani iz sjemenke i ploda biljke *Silybum marianum* (Compositae). Silimarin ima stimulativno enzimatsko djelovanje na DNA ovisnu RNA polimerazu 1 i biosintezu RNA te

proteina čime potiče DNA sintezu i proliferaciju stanice, a time i regeneraciju oštećenog tkiva jetre. Na taj način silimarin povećava proliferaciju hepatocita. Zbog tih djelovanja silimarin ima kliničku primjenu kod ciroze jetre, ishemija i toksičnog hepatitisa uzrokovanog paracetamolom ili drugim toksinima (Kumar i K. Pandey, 2013.).

1.3.1.5. Antidijabetsko djelovanje

Od flavonoida, posebno za kvercetin zabilježeno je da posjeduje antidijabetsko djelovanje. U animalnim studijama dokazano je da kvercetin doprinosi regeneraciji stanica gušterače i time vjerojatno povećava otpuštanje inzulina što je dokazano na modelima štakora sa dijabetesom. Također je zabilježeno da kvercetin stimulira otpuštanje inzulina i poboljšava unos kalcijevih iona u stanice gušterače (Kumar i K. Pandey, 2013).

1.3.1.6. Antikancerogeno djelovanje

Osim njihovog dokazanog antioksidativnog djelovanja, pokazali su i druge pozitivne učinke na smanjenje proliferacije karcinoma. Flavonoidi mogu modulirati signalne puteve u stanici te na taj način mogu pomoći u sprečavanju nastanka karcinoma i kardiovaskularnih oboljenja. Konkretno, modulacija signalnih puteva u sprečavanju nastanka karcinoma se provodi na sljedeće načine (Lambert i Yang, 2003.):

1. Očuvanjem normalne regulacije staničnog ciklusa
2. Inhbiranjem proliferacije i induciranjem apoptoze
3. Stimuliranjem detoksificirajuće aktivnosti enzima faze 2
4. Inhibiranjem invazije tumora i angiogeneze
5. Smanjenjem upale

1.3.1.7. Kardioprotektivno djelovanje

Flavonoidi imaju vazodilatacijsko, antiaterosklerotsko i antitrombotsko djelovanje. Oni relaksiraju endotel krvnih žila, štite od oksidacije LDL kolesterola (kvercetin i glikozidi kvercetina) i inhibiraju agregaciju eritrocita. Studije dokazuju da se dugotrajnom upotrebom

flavonoida može smanjiti pojavljivanje kardiovaskularnih oboljenja te njihovih posljedica (Tanwar i Modgil, 2012.).

1.4. Metode separacije i određivanja flavonoida u uzorku

1.4.1. Priprema uzorka

Izolacija flavonoida iz uzorka je obično preduvjet za bilo kakve daljnje analize. Tokom godina mnoge metode predobrade razvile su se za određivanje flavonoida u različitim tipovima uzoraka. Tri su glavna tipa flavonoidno-sadržavajućih uzoraka: biljke, hrana i uzorci tekućina kao što su biološke izlučevine i pića. Čvrsti uzorci se obično prvo homogeniziraju, što može biti prethođeno (ledenim) sušenjem ili leđenjem tekućim dušikom. Sljedeći korak je izolacija analita. Za ovu svrhu, otapalo za ekstrakciju (SE) – koje može slijediti ekstrakcijom čvrstom fazom (SPE) – je i dalje najviše korištena tehnika, uglavnom zbog njezine jednostavnosti korištenja i široke primjenjivosti. Tekući uzorci obično se prvo filtriraju i/ili centrifugiraju, nakon čega je uzorak ili direktno ubrizgan u separacijski sustav ili su češće analiti izolirani koristeći tekućina-tekućina ekstrakciju /LLE ili SPE.

Iako se mnoge tradicionalne metode pripreme uzorka za flavonoide i dalje koriste, unazad par godina pojavio se trend prema: (1) korištenju uzoraka inicijalno manjih veličina, manjeg volumena ili bez organskih otapala; (2) veće specifičnosti ili veće specifičnosti u ekstrakciji; (3) veća obnovljivost ili bolja reproducibilnost; i (4) povećan potencijal automatizacije. Priprema uzorka može se vršiti i pomoću tekuće ekstrakcije pod pritiskom (PLE), mikrovalovima-pomognutom ekstrakcijom (MAE), superkritična-tekućinska ekstrakcija (SFE), ekstrakcija čvrstom fazom (SPE), disperzija matriksom čvrste faze (MSPD) i mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME).

1.4.2. LC – tekućinska kromatografija

Analiza flavonoida tekućinskom kromatografijom se obično izvodi kromatografijom obrnutih faza na C18 ili C8 silika-gel kolonama. Duljine od 100-250 mm te dijametra od 3,9 – 4,6 mm. Također, koristi se i Sephadex i poliamidne kolone. Kao mobilna faza koristi se

acetonitril i/ili metanol u kombinaciji sa vodom uz dodatak acetata ili formata. Tekućinska kromatografija se obično izvodi pri sobnoj temperaturi ali ponekad su preporučljive temperature iznad 40°C kako bi se skratilo vrijeme analize i zbog toga što su termostatirane kolone višeopetovane. Ako je uloga analize uzorka ispitati glavne flavonoide, vrijeme potrebno za separaciju 5-10 komponenata uzet će od 0,5-1 h vremena.
Ako se ispituje veći broj sastojaka biti će potrebna 2 sata za separaciju 30-50 komponenata sa mnogim konjugatima kao što su glikozidi, malonati i acetati. S pojavom ultra-performance LC sistema (UPLC) dostupna je nova tehnologija koja omogućuje ispitivanje pri visokom tlaku (1000 bara, u usporedbi sa 400 bara kod LC-a). Na ovaj način LC kromatografija je unaprijeđena: vrijeme analize flavonoida je skraćeno, rezolucija i osjetljivost je viša (Liu i sur., 2008.).

Danas se za detekciju često koriste UV detektori. Svi aglikonski dijelovi flavonoida sadrže barem jedan aromatski prsten i efikasno apsorbiraju UV zračenje. Prvi maksimum koji se može naći između 240-285 nm pojavljuje se zbog A prstena, a drugi maksimum između 300-550 nm zbog supstitcije i konjugacije C prstena. Jednostavne supstitucije kao što su metil, metoksi i hidroksil grupe uglavnom daju male razlike u maksimumu apsorpcije. Prije nekoliko godina UV spektrofotometrija bila je još uvijek popularna metoda detekcije i kvantitativne analize aglikona flavonoida. Nedavno se otkrilo kako diodni detektori (DAD) daju bolje informacije o cijelom spektru navedenih komponenata (Liu i sur., 2008.). Ove dvije metode detekcije postala su preferirane metode u LC analizi.

U analizi flavonoida fluorescentna detekcija se ne koristi često zbog toga što je broj flavonoida koji pokazuju fluorescenciju ograničen. Flavonoidi koji ju pokazuju su: izoflavonoidi, flavonoidi sa OH grupom na poziciji 3 i metoksilirani flavoni. Kada se fluorescentna detekcija koristi u kombinaciji sa UV detekcijom oni daju mogućnost razlikovanja fluorescentnih od nefluorescentnih komponenata koje se u koeluaciji.
Od nedavno se koriste i elekrokemijski detektori za detekciju flavonoida baziranu na njihovim redoks potencijalima zahvaljujući prisutnosti fenolne grupe (Liu i sur., 2008.).

Dobar način opsežnije analize flavonida predstavlja kombinacija dvaju metoda; tekućinske kromatografije i masene spektrofotometrije (LC-MS). LC-MS kombinira efikasnu sposobnost separacije tekućinske kromatografije i veliku moć strukturalne karakterizacije i visoke osjetljivosti masene spektrofotometrije. Zbog tog razloga MS je vrhunska metoda detekcije u

tekućinskoj kromatografiji. Isto tako, NMR tehnika je postala važna tehnika u biomedicinskim, farmaceutskim, okolišnim, prehrambenim i kozmetičkim analizama te također za identifikaciju metabolita lijekova. NMR spektroskopija je moćna tehnika za strukturalno objašnjenje organskih molekula te se zbog toga koristi u kombinaciji sa tankoslojnom kromatografijom u određivanju flavonoida (Rijke i sur., 2006.).

1.4.3. Druge

1.4.3.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija se koristi za analizu flavonoida još od 1960.-ih. Prednosti ove metode leže u njezinoj visokoj osjetljivosti detekcije za skoro sve ishlapljive kemijske komponente ili derivatizirane neishlapljive komponente. Za analizu flavonoida neizbježna je njihova derivatizacija upotrebom trimetilsilietera (TMS) čime dobivamo derivate TMS flavonoida. Derivatizacijom sa TMS-om flavonoidima se povećava ishlapljivost i termalna stabilnost. S takvim derivatima se ulazi u analizu plinskom kromatografijom. Zbog tog koraka, očito je da plinska kromatografija nije popularna koliko i tekućinska (Liu i sur., 2008.).

1.4.3.2. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (TLC) se također koristi za analizu flavonoida još od ranih 1960.-ih. Tankoslojna kromatografija je posebno korisna u kombinaciji sa UV detekcijom jer omogućuju analizu mnogih uzoraka istovremeno za brzo ispitivanje biljnih ili medicinskih ekstrakata koji sadrže aktivne supstance. Detekcija se vrši upotrebom UV zračenja na 350-365 nm ili 250-260 nm, a koristi se i denzitometrija pri istim valnim duljinama (Rijke i sur., 2006.).

1.4.3.3. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je relativno nova tehnika koja se brzo razvila nakon njezinog pojavljivanja. To je moćna tehnika koja se široko koristi u farmaceutskoj analizi, a u zadnjih

10 godina i u analizi flavonoida. U usporedbi sa ostalim kromatografskim analizama kapilarna elektroforeza (CE) ima mnoge prednosti kao što su: visoka sposobnost odjeljivanja, visoka razlučivost, kratko vrijeme analize, mogućnost lake automatizacije te mala potrošljivost otapala i uzorka. Unutar analize kapilarnom elektroforezom najviše se koriste kapilarna zonska elektroforeza (CZE), micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC) i kapilarna elektrokromatografija (CEC). Za detekciju se obično koriste UV detektori zbog njihove jednostavnosti, prikladnosti i dostupnosti, ali isto tako elektrokemijski detektori, fluorescentni, amperometrijski i MS detektori. Još uvijek je ponekad teško CE metodom točno odrediti kompleksne uzorke te se zbog toga koriste određeni modifikatori (Liu i sur., 2008.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

List rogača ima primjenu u tradicionalnoj medicini, uglavnom kao antidijaroik, a novija istraživanja su pokazala da sadrži različite, biološki vrlo aktivne spojeve, polifenolnog tipa. Unutar velike i heterogene skupine biljnih polifenola, upravo se flavonoidi odlikuju brojnim biološkim učincima pa je glavni cilj ovog rada bio utvrditi udio flavonoida u u ekstraktima lista rogača prikupljenim na 14 lokaliteta na dalmatinskoj obali i otocima.

Kemijski sastav i količina polifenolnih spojeva u biljkama uvjetovani su genotipom biljke, ali i izloženošću biljke raznim (štetnim?) okolišnim čimbenicima. Upravo se iz tog razloga može očekivati da će se biljke koje rastu u različitim mikroklimatskim uvjetima međusobno razlikovati obzirom na udio i kemijski sastav flavonoida.

Sorte rogača koje samoniklo rastu duž hrvatske obale potpuno su neistražene. Stoga ovaj diplomski rad, kao dio šireg istraživanja kemijskog sastava lista i ploda rogača, predstavlja originalni doprinos dosadašnjim saznanjima o kemijskom sastavu lista rogača, mogućnostima njegovog korištenja u razvoju fitoterapeutika te utjecaju genotipa, lokaliteta i spola stabla na udio biološki aktivnih sastavnica u listu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitivani materijal

Ispitivanja su provođena na uzorcima lista rogača (*Ceratonia siliqua L., Fabaceae*) koji su sakupljeni sa muških, ženskih i dvospolnih stabala rogača na lokacijama duž dalmatinske obale. Ubrani su listovi podjednake starosti i veličine u listopadu 2012. godine. Sušeni su na 60°C 24h, zatim su mljeveni te homogenizirani čuvani na sobnoj temperaturi do trenutka analize.

3.1.2. Kemikalije i reagensi

- Kalijev acetat (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska) – otapanjem 9.6 g kalijevog acetata u 10 mL destilirane vode
- Aluminijev klorid heksahidrat – za pripremu 10% $AlCl_3$ x 6 H_20: otapanjem 1 g aluminijevog klorida heksahidrata u 10 mL destilirane vode
- Etilni alkohol (etanol) (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

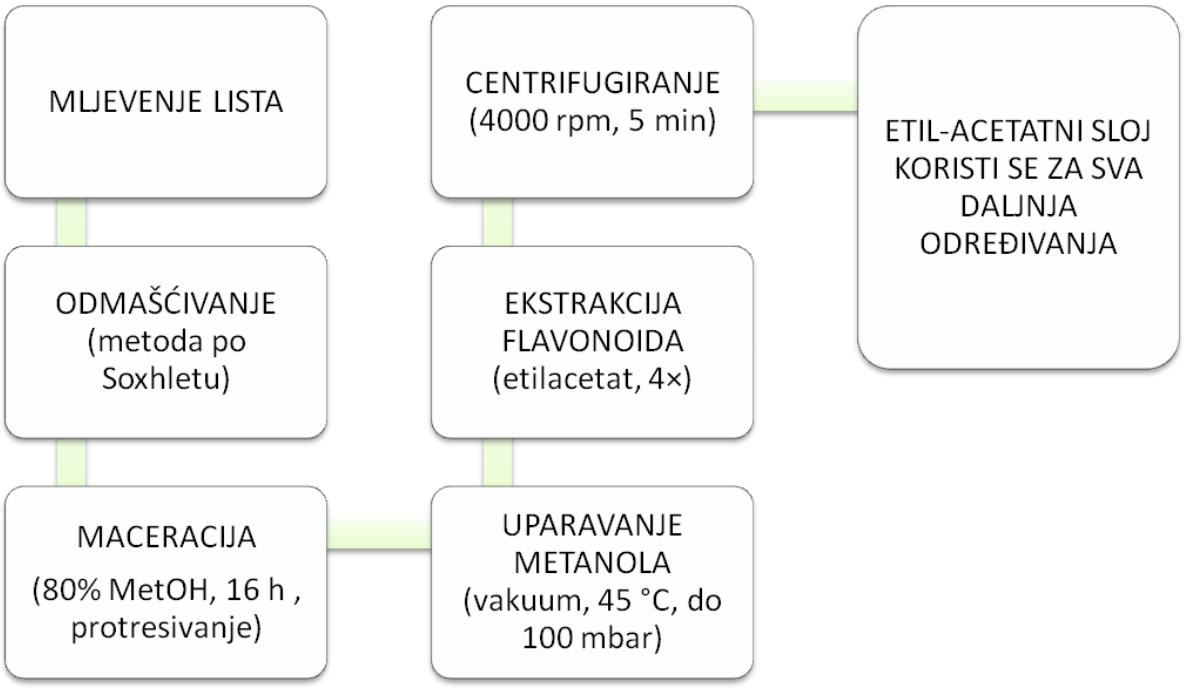
3.1.3. Korišteni instrumenti

- Analitička vaga, AB265-S, Mettler Toledo, Indija
- Soxhlet aparatura, Behr Labortechnik, Düsseldorf, Njemačka
- UV-VIS spektrofotmetar UV 4-100, ATI Unisam, Cambrige, Velika Britanija

3.2. Metode

Prije analize sastava lista rogača, list se mora podvrgnuti nizu koraka kako bi se pripremio pročišćeni ekstrakt bogat flavonoidima. Glavni koraci pripreme uzorka prikazani su na Slici 4. Suhi list se najprije melje, a prašak se odmašćuje metodom po Soxhletu po čijoj se metodi mogu odrediti ukupni lipidi u listu. Nakon odmašćivanja uzorak se macerira protresivanjem u periodu od 16 h uz dodatak otapala 80%-tnog MetOH kako bi se ekstrahirali spojevi flavonoidnog tipa. Po završetku maceracije potrebno je upariti metanol vakuumom pri tlaku

do 100 mbar nakon čega se flavonoidni ekstrakt pročišćava uzastopnim ekstrahiranjem mućkanjem u etilacetatni sloj. Uzorak se nakon ekstrakcije centrifugira 5 min. pri 4000 rpm te bistri supernatant služi za daljnje analize.



Slika 4. Shematski prikaz pripreme uzorka prije daljnje analize

3.2.1. Određivanje lipida metodom po Soxhletu

Prije analize uzorci samljevenog lista rogaša odmašćeni su metodom po Soxhletu koja je temeljena na kontinuiranoj ekstrakciji masne komponente iz uzorka pomoću petroletera čije je vrelište 40-70°C, a izvodi se u posebnoj aparaturi.

5 g (±0.001) lista odvađe se u papirnatu odmašćenu čahuru koja se pokrije slojem odmašćene suhe vate i stavi u ekstraktor – srednji dio Soxhletova aparata spoji se s hladilom i tikvicom, koja je s nekoliko staklenih kuglica prethodno sušena 1 sat na 105°C i vagana. U hladilo se preko lijevka ulijeva otapalo u količini potrebnoj da se ekstraktor napuni te se uz pomoć teglice isprazni u tikvicu. Potom se doda još onoliko otapala potrebno da se napuni polovica ekstraktora dok cjelokupna količina otapala ne smije prijeći ¾ volumena tikvice. Kroz hladilo aparata pušta se jaka struja vode i započinje zagrijavanje. Zbog zapaljivosti

otapala, tikvica se grije na električnoj grijalici. Temperatura zagrijavanje regulira se praćenjem padanja kondenziranih kapljica otapala na način da se jedva mogu brojiti. Ekstrakcija traje 24 h i prekida upravo u onom trenutku kad se otapalo prelije u tikvicu. Aparat se otvori i izvadi čahura s listom te se otapalo predestilira iz tikvice u eksikator i po zaršetku destilacije odlije. Tkvica se suši 1 h na 105°C i nakon hlađenja u eksikatoru važe. Kao kontrola postignute konstantne mase još jednom se suši 15 min. na 105°C i ponovno važe. Kod sušenja tikvica se postavlja koso i nakon polovice vremena sušenja ispuše se jednom pipetom. Postotak petroleterskog ekstrakta odnosno udio masti u uzroku listova dobije se dijeljenjem razlike odvaga tikvice prije (B) i poslije (A) ekstrakcije s odvagom lista (C).

$$\% \text{ petroleterskog ekstrakta (masti)} = \frac{(B-A)\ x\ 100}{C}$$

3.2.2. Određivanje flavonoida spektrofotometrijskom metodom s $AlCl_3$

3.2.2.1. Princip metode

Sadržaj ukupnih flavonoida može se odrediti metodom s $AlCl_3$ (Chang i Sur., 2002.). Metoda se temelji na tome da $AlCl_3$ stvara stabilne komplekse s C-4 keto skupinom i C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavonoida. Uz to, $AlCl_3$ stvara nestabilne komplekse sa ortohidroksilnim grupama na A ili B prstenu favonoida. Budući da kompleksi različitih flavonoida imaju maksimume apsorpcije na različitim valnim duljinama (385 – 440 nm), prije mjerenja potrebno je snimiti spektar jednog uzorka i odlučiti se za jednu valnu duljinu. Reakcijska smjesa koja se sastoji od ispitivanog ekstrakta, $AlCl_3$ i kalijevog acetata se inkubira na sobnoj temperaturi kroz 30 min. i nakon toga se mjeri apsorbancija na 405 nm. Kvercetin (Ordonez i sur., 2006.) se može iskoristiti kao pozitivna kontrola. Sadržaj flavonoida se izražava kao mg ekvivalenta kvercetina/L.

3.2.2.2. Priprema uzorka

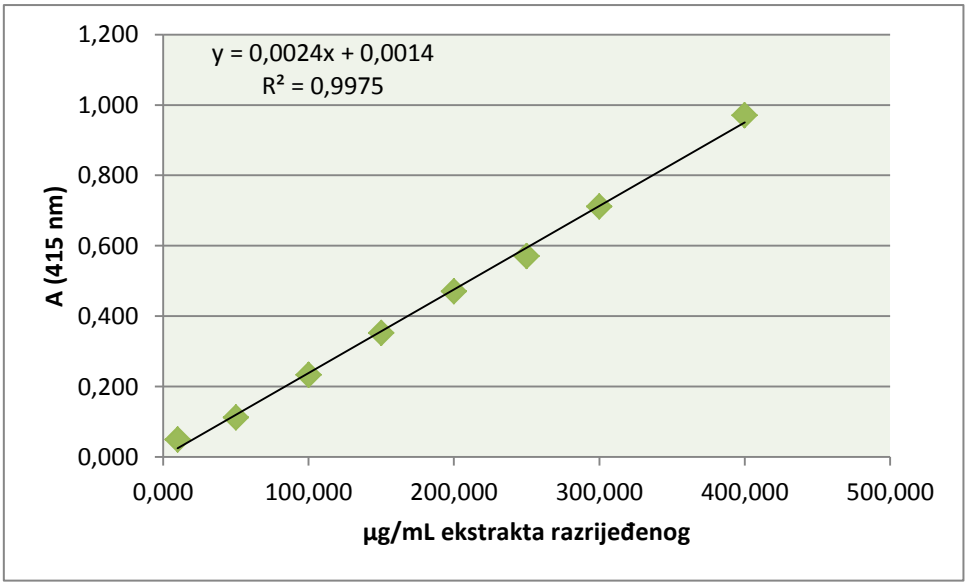
200 μL nerazrijeđenog ispitivanog ekstrakta odpipetira se u Falcon kivetu i pomiješa s 1.8 mL etanola, doda se 100 mL $AlCl_3$ i 100 μL kalijevog acetata. Na kraju se smjesi doda 2.8 mL destilirane vode. Reakcijska smjesa se promućka nakon dodavanja svakog novog reagensa i na kraju nekoliko sekundi vorteksira. Nakon inkubacije od 30 min. (od trenutka kad samo dodali $AlCl_3$) na sobnoj temperaturi pristupa se spektrofotometrijskom mjerenju na 415 nm. Potrebno je napraviti razmak od 30 sekundi između dodavanja $AlCl_3$ flavonoidnom ekstraktu kako bi vrijeme reakcije u svakoj reakcijskoj smjesi bilo jednako (obzirom da reakvcija nastanka boje ni nakon 30 minuta nije u potpunosti završena). Slijepa proba se pripremi na isti način, samo se umjesto $AlCl_3$ dodaje voda.

3.2.2.3. Izrada baždarnog dijagrama

Kao što je prethodno spomenuto, udio flavonoida u uzorku izražen je kao mg kvercetin ekvivalenata po gramu lista (mg QUE/g). U tu svrhu izrađen je baždarni dijagram korištenjem koncentracijskog niza otopine kvercetin dihidrata. Najprije je otapanjem kvercetin dihidrata u etil-acetatu napravljena ishodna otopina koncentracije 10 mg/mL. Razrijeđivanjem ishodne otopine vodom pripremljene su radne otopine raspona koncentracija od 0.4 do 16 μg/mL. Mjerna otopina priprema se miješanjem 200 μL ishodne otopine sa 1.8 mL etanola, doda se 100 mL $AlCl_3$ i 100 μL kalijevog acetata. Na kraju se smjesi doda 2.8 mL destilirane vode. Reakcijska smjesa se promućka nakon dodavanja svakog novog reagensa i na kraju nekoliko sekundi vorteksira. Nakon inkubacije od 30 min. (od trenutka kad samo dodali $AlCl_3$) na sobnoj temperaturi pristupa se spektrofotometrijskom mjerenju na 415 nm. Baždarni dijagam prikazuje linearnu ovisnost izmjerene apsorbancije o koncentraciji radne otopine (Slika 5).

Tablica 2. Apsorbancija koncentracijskog niza kvercetin dihidrata

koncentracija kvercetin dihidrata (µg/mL)	ug/mL	A1	A2	sp	A1 kon	A2kon	ASRED
0,4	10,000	0,052	0,060	0,006	0,046	0,054	0,050
2	50,000	0,145	0,148	0,034	0,111	0,114	0,113
4	100,000	0,288	0,290	0,055	0,233	0,235	0,234
6	150,000	0,440	0,451	0,093	0,347	0,358	0,353
8	200,000	0,582	0,600	0,120	0,462	0,480	0,471
10	250,000	0,718	0,730	0,153	0,565	0,577	0,571
12	300,000	0,886	0,900	0,181	0,705	0,719	0,712
16	400,000	1,198	1,224	0,240	0,958	0,984	0,971



Slika 5. Baždarni pravac i jednadžba pravca za kvercetin dihidrat

3.2.2.4. Statistička analiza

Za statističku obradu i prikaz podataka korišteni su programi Microsoft Office Excell i GraphPad Prism Software. Sve analize provedene su u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Za usporedbu pojedinih skupina podataka (lokaliteta ili spola) korištena je jednosmjerna analiza varijance (razina značajnosti 95%).

4. REZULTATI

4.1. Udio masti u listovima rogača

Rezultati određivanja masti po Soxhletu prikazani su u Tablici 3.

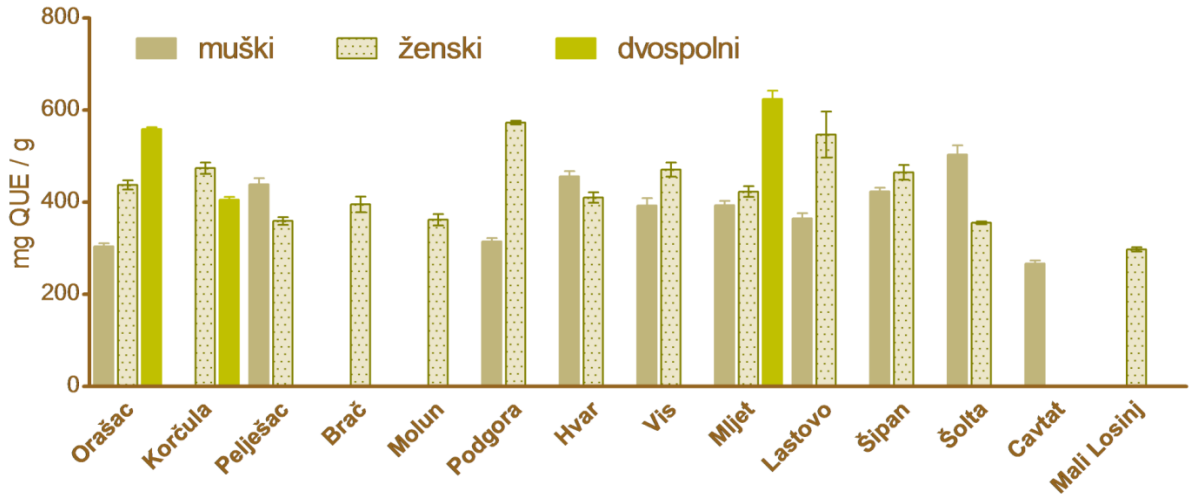
Tablica 3. Udio masti u osušenim uzorcima listova rogača

LOKALITET	SPOL BILJKE		
	muški	ženski	dvospolni
	g/100g (average ± stdev)		
Orašac	3.587 ± 0.058	4.622 ± 0.031	3.849 ± 0.114
Korčula		3.799 ± 0.031	3.713 ± 0.065
Pelješac	3.190 ± 0.000	4.013 ± 0.316	
Brač		3.902 ± 0.005	
Molun		3.493 ± 0.051	
Podgora	4.105 ± 0.125	3.439 ± 0.216	
Hvar	2.355 ± 0.055	3.128 ± 0.043	
Vis	2.842 ± 0.028	3.383 ± 0.074	
Mljet	3.727 ± 0.191	4.030 ± 0.013	4.488 ± 0.260
Lastovo	2.862 ± 0.039	3.564 ± 0.219	
Šipan	3.458 ± 0.165	3.075 ± 0.084	
Šolta	3.715 ± 0.011	3.506 ± 0.000	
Cavtat	3.188 ± 0.044		
Mali lošinj		3.825 ± 0.068	

Udio masti masti kod muških uzoraka kreće se između 2.355±0.055g/100g lista do 4,105±0,125g/100 g lista, kod ženskih uzoraka raspon je između 3,075±0,084g/100g lista do 4,622g/100g lista, a kod dvospolnih uzoraka između 3,713±0,065g/100g lista do 4,488±0,260g/100g lista. Najviši udio masti nalazimo u listova ženskih biljaka sa lokacije Orašac, a najmanji u listova muških biljaka sa lokacije Hvar.

4.2. Udio flavonoida u listu rogača

Udio flavonoida u analiziranim uzorcima prikazan je na Slici 6. Udio flavonoida u ekstraktima izražen je kao mg ekvivalenta kvercetin dihidrata/100 mg lista rogača (mg QE/100g).



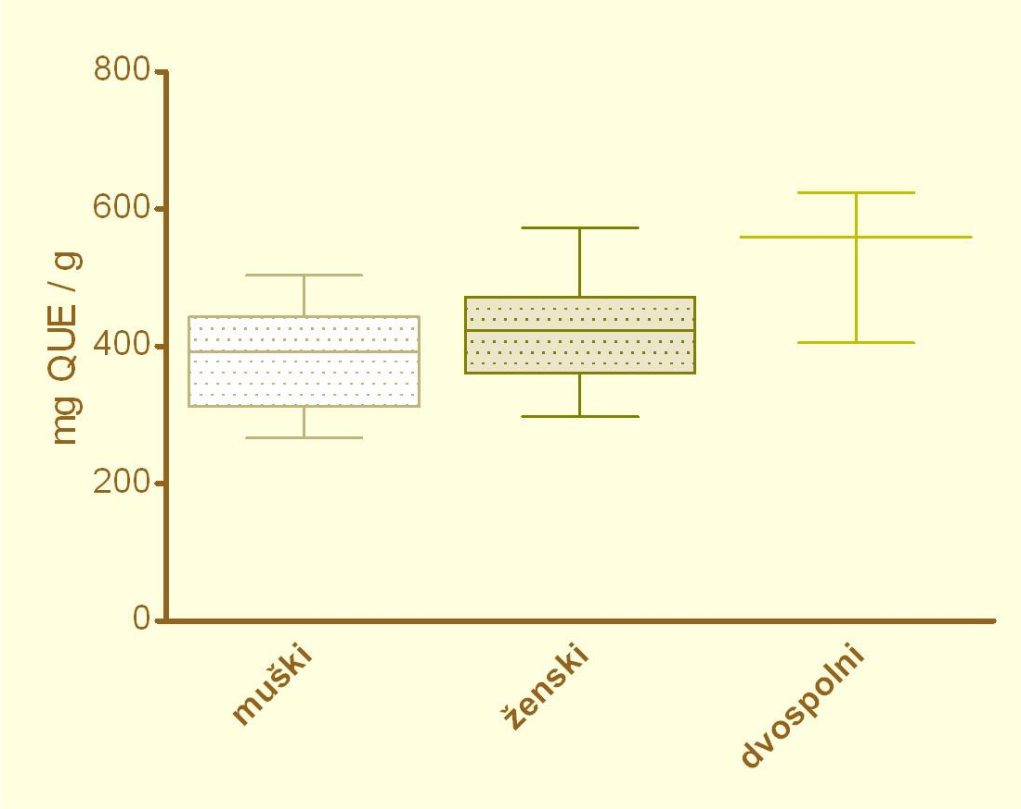
Slika 6. Udio flavonoida u osušenim listovima rogača sa biljaka različitog spola prikupljenim na različitim lokacijama

Statističkom analizom utvrđene su značajne razlike u koncnetracijama flavonoida obzirom na lokalitet i spol biljke. U listovima dvospolnih stabala koncentarcije flavonoida kreću se između 266,7 mg QUE/g do 624,5 mg QUE/g lista, dok su u listovima muških i ženskih stabala pronađene nešto niže koncentracije: od 266.7 do 503.0 mg QUE/g u listovima muških stabala i od 297.6 do 595.4 mg QUE/g u listovima ženskih stabala. Najveću koncentraciju od 624,5 mg QUE/g možemo pronaći kod dvospolog stabla sa lokacije Mljet, a najnižu od 266,7 mg QUE/g kod muškog stabla sa lokacije Cavtat.

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj spola na udio flavonoida u listu

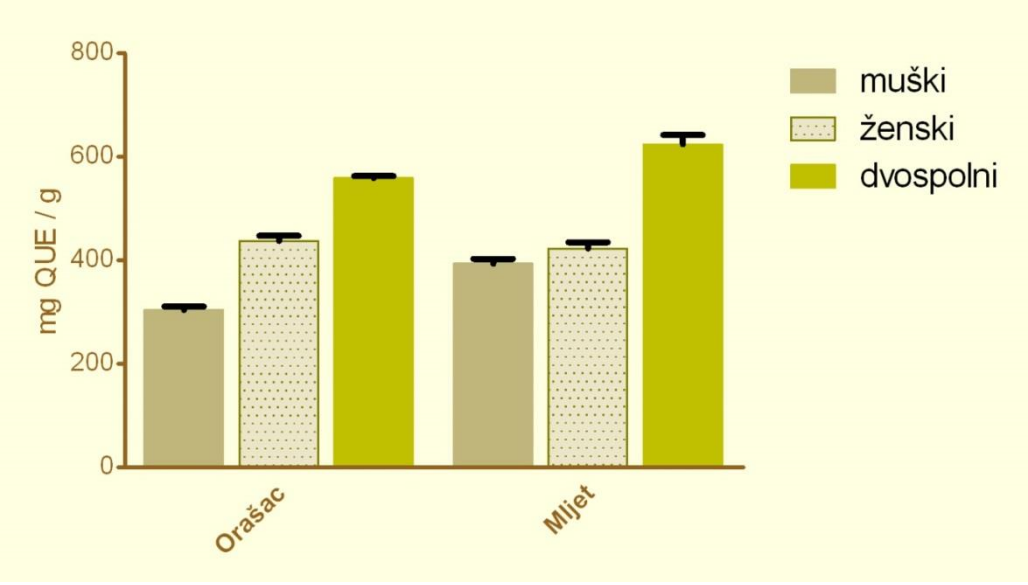
Statističkom analizom utvrđene su značajne razlike u udjelu flavonoida u analiziranim uzorcima – ovisno o laklitetu ali i spolu biljke. Udio flavonoida u listovima rogača prikupljenim sa stabala različitog spola (muški, ženski, dvospolni) na 14 različitih lokaliteta kretao se između 266,7 mg QUE/g lista do 624,5 mg QUE/g lista. Usporedba prosječnog udjela flavonoida u listovima muških, ženskih i dvospolnih biljaka prikazana je na Slici 7. Može se uočiti da spol biljke značajno utječe na udio flavonoida u listu, tako je najniži u listovima muških stabala, nešto viši u listovima ženskih stabala i najviši u listovima dvospolnih stabala.



Slika 7. Prosječni udio flavonoida u listovima muških, ženskih i dvospolnih biljaka

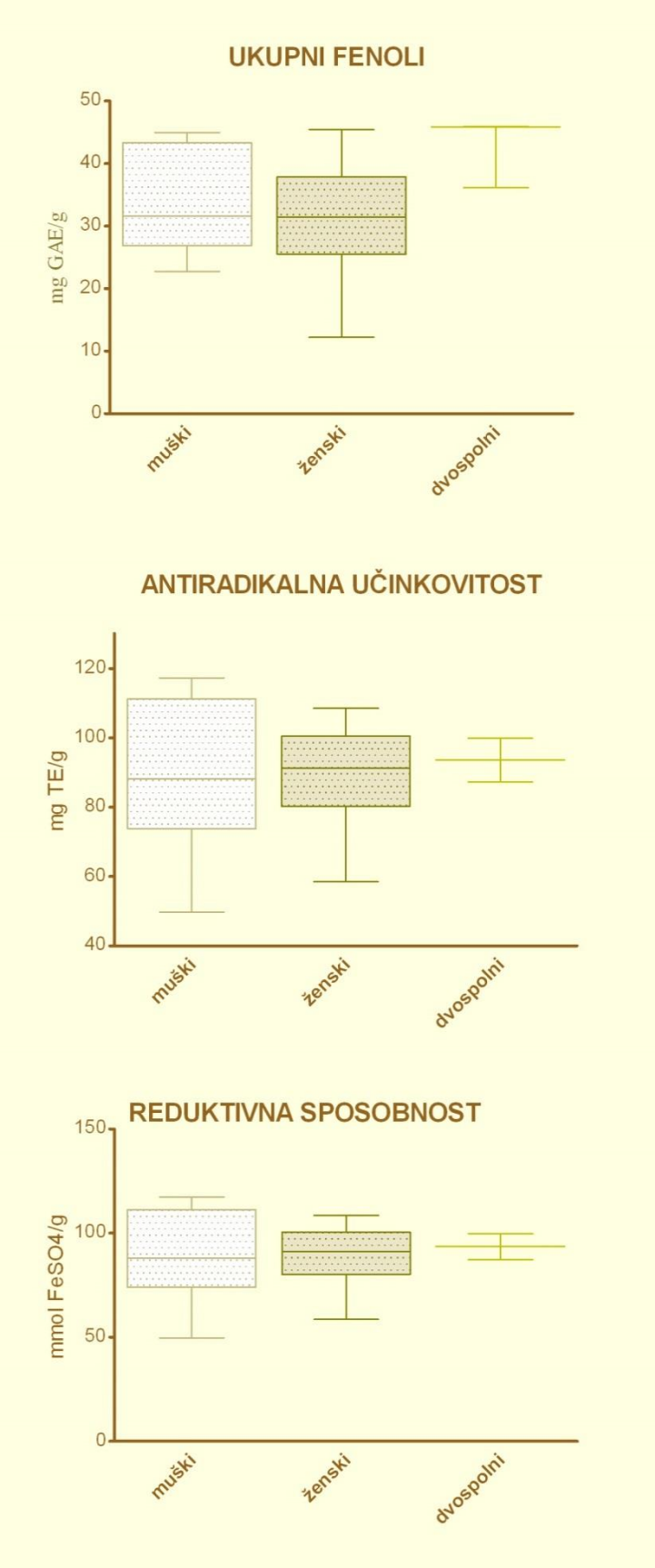
Iz grafa se može iščitati da je najviši prosječni udio flavonoida oko 600 mg QUE/g u listovima dvspolnih biljaka, zatim slijede ženski listovi sa udjelom flavonoida od oko 420 mg QUE/g, a najniži postotak flavonoida u listovima imaju muške biljke sa oko 400 mg QUE mg/g. Ovakve zaključke provjerili smo i usporedbom udjela flavonoida u listovima biljaka

različitog spola pronađenih na istoj lokaciji (lokacije Mljet i Orašac - Slika 8). Na lokaciji Orašac može se uočiti da je list dvospolne biljke sa 559, 2 mg QUE/g najbogatiji flavonoidima, nakon toga slijedi list ženskog spola sa 437,8 mg QUE/g , a najnižu vrijednost nalazimo u listovima muškog spola koji sadrže prosječnu vrijednost od 304,3 mg QUE/ g. Isti zaključak možemo dobiti i na listovima sa lokacije Mljet gdje dvospolne biljke nose prosječnu vrijednost od 624,5 mg QUE/ g, zatim ženske biljke sa 423,3 mg QUE/g te muške biljke sa 393,7 mg QUE/g lista. Kod ovakve usporedbe može se isključiti utjecaj vanjskih čimbenika (klima, tlo). Ponovno je zaključeno da su najniži udjeli flavonoida pronađeni u listovima biljaka muškog spola, a najviši u listovima dvospolnih biljaka. Prikazani rezultati (Slika 8) u skladu su s rezultatima drugih istraživanja. Primjerice, istraživanje El Hajaji-ja i suradnika (2010) koji su ispitivali udio fenolnih komponenti i antioksidacijsku sposobnost lista divljih i pitomih sorti rogača muškog i ženskog spola, pronađene su veće koncentracije polifenolnih spojeva u listovima ženskog spola.



Slika 8. Usporedba udjela flavonoida u biljkama različitog spola s istog lokaliteta

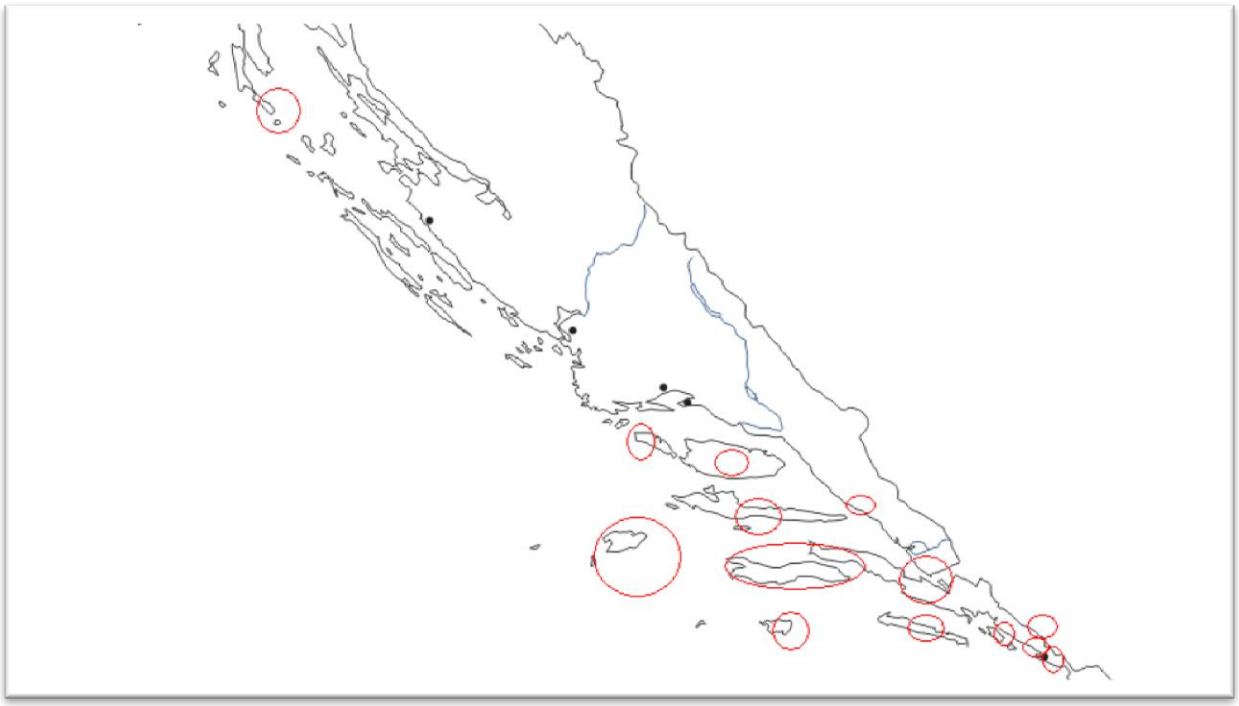
Usporedbom s rezultatima istraživanja na istim uzorcima kojima je uspoređivan utjecaj spola i lokaliteta biljke na udio ukupnih fenola, antiradikalnu učinkovitost te reduktivnu sposobnost (Vidra, 2014; Rehorović, 2014), također se mogu vidjeti slični rezultati koji potvrđuju najviši udio biološki aktivnih spojeva u listovima dvospolnih biljaka, zatim ženskih te na kraju muških biljaka. Usporedbu daje Slika 9.



Slika 9. Utjecaj spola biljke na udio ukupnih fenola, antioksidacijsku učinkovitost i reduktivnu sposobnost ekstrakta lista (korišteni podaci iz A.Vidra, 2014 i Z. Rehorović, 2014)

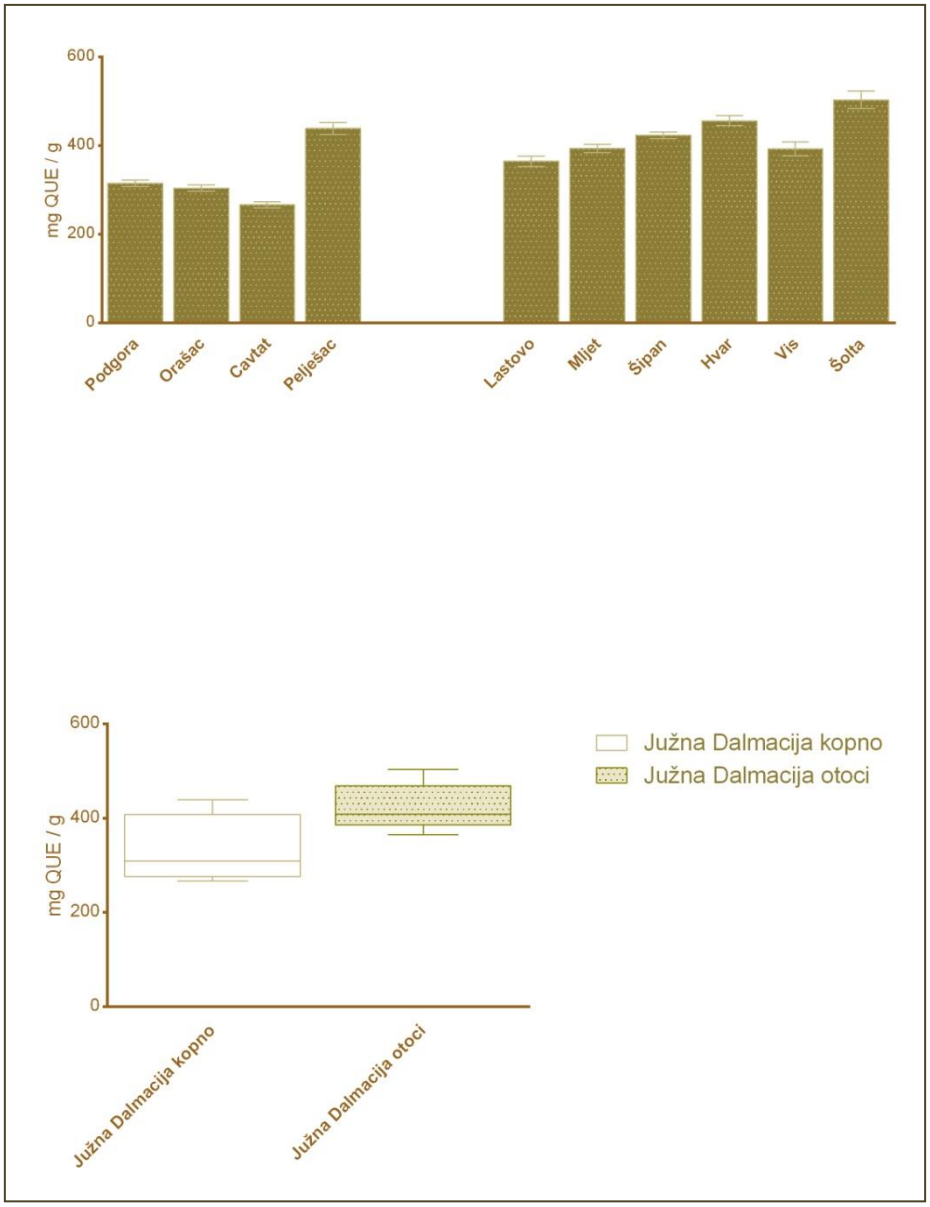
5.2. Utjecaj lokalteta na udio flavonoida u listu rogača

Kao što je prethodno napomenuto, uzorci rogača skupljeni su tijekom 2013. godine na različitim lokalitetima duž dalmatinske obale. Točan raspored lokacija prikazan je na Slici 10.



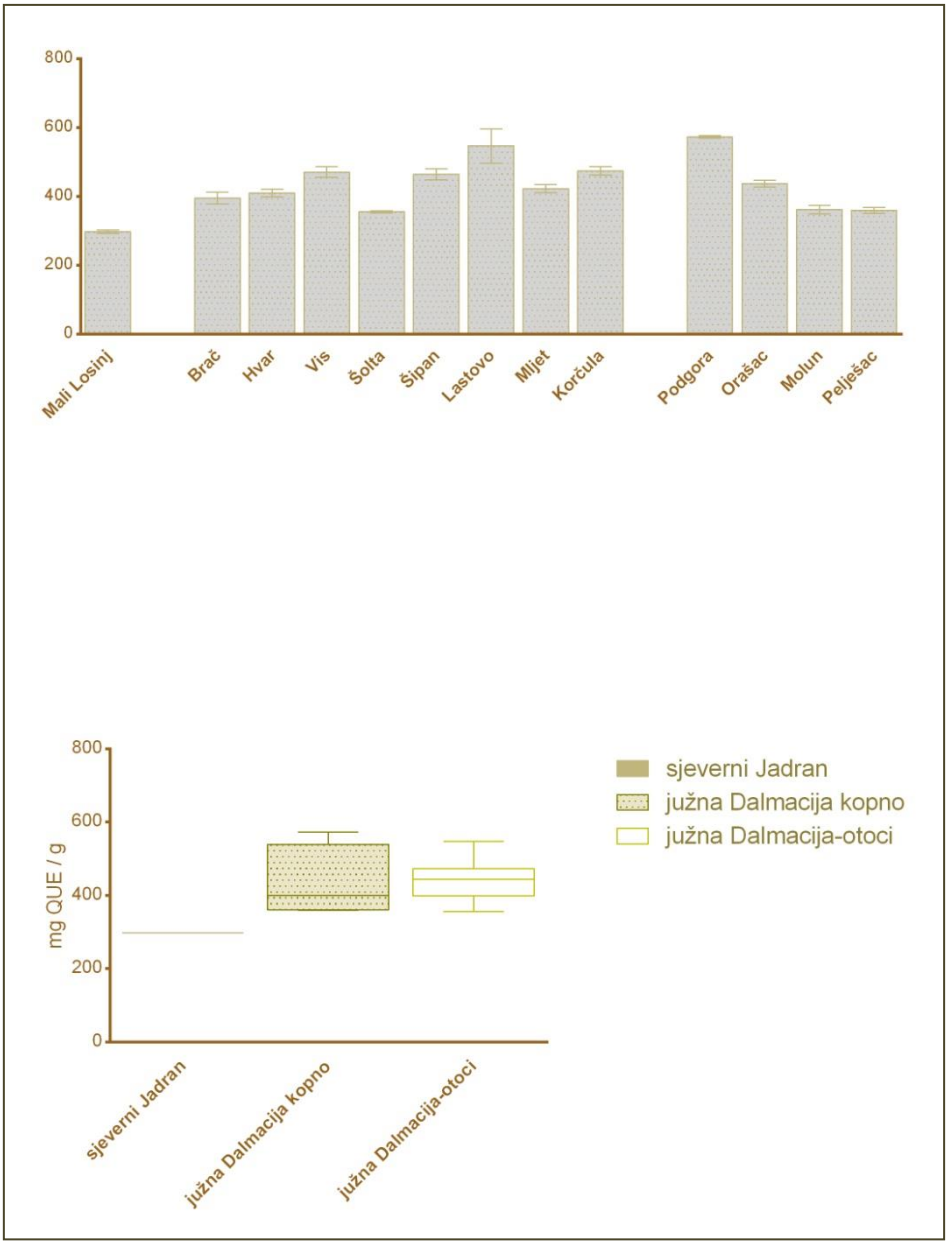
Slika 10. Lokaliteti na kojima su prikupljeni uzorci listova rogača

Kao što se vidi iz Slike 10. većina lokaliteta na kojima su pronađena staništa samoniklih sorti rogača nalaze se na južnodalmatinskoj obali i otocima. Iako je namjera bila prikupiti uzorke iz Primorja i Dalmacije, jedini sjeverni lokalitet na kojem su pronađeni samonikli rogači bio je Mali Lošinj. Ostali lokaliteti nalaze se na jugu Dalmacije te ih karakteriziraju vrlo slični klimatski uvjeti. Upravo je zbog toga bilo teško procijeniti utjecaj klimatskih čimbenika na udio flavonoida u listovima. Kako bi izveli neke zaključke, listove smo podijelili prema spolu (obzirom da su utvrđene statistički značajne razlike između listova muškog i ženskog spola), a lokalitete grupirali na lokalitete sjevernog jadrana (Mali Lošinj), južnodalmatinsku obalu i južnodalmatinske otoke. Usporedbom rezultata dobivenih za listove muškog spola utvrđeno je da biljke pronađene na otocima sadržavaju nešto više biološki aktivnih spojeva (Slika 11).



Slika 11. Srednje vrijednosti udjela flavonoida u listovima muškog spola sa lokaliteta u južnoj Dalmaciji i južnodalmatinskim otocima.

Usporedbom podataka dobivenih iz listova biljaka muškog spola dobiveni su isti rezultati: biljke s otoka bogatije su flavonoidima od biljaka koje rastu na kopnu. Osim toga, listovi rogača prikupljeni na lokalitetu Mali Lošinj, sadržavali su značajno manju koncentraciju flavonoida u usporedbi s južnodalmatinskim lokalitetima (Slika 12.)



Slika 12. Srednje vrijednosti udjela flavonoida u listovima ženskog spola sa lokaliteta u Primorju, južnoj Dalmaciji i južnodalmatinskim otocima.

6. ZAKLJUČCI

- Udio flavonoida u listovima rogača prikupljenim sa stabala različitog spola (muški, ženski, dvospolni) na 14 različitih lokaliteta kretao se od najmanje 266.7 mg QUE/g do najviše 624.5 mg QUE/g.

- Spol biljke bitno utječe na udio flavonoida u listu: udio flavonoida bio je najniži u listovima muških stabala, nešto viši u listovima ženskih stabala i značajno viši u listovima sa dvospolnih biljaka

- Ovisno o lokalitetu mogu se također zamijetiti razlike: biljke s otoka bogatije su flavonoidima od biljaka koje rastu na kopnu. Osim toga, listovi rogača prikupljeni na lokalitetu Mali Lošinj, sadržavali su značajno manju koncentraciju flavonoida u usporedbi s južnodalmatinskim lokalitetima

- Dobivene rezultate potvrđuju rezultati istraživanja antioksidacijske aktivnosti te ukupnih fenola provedeni na istim uzorcima: udio ukupnih fenola, antiradikalna i reduktivna aktivnost listova rogača bila je najviša u listovima dvospolnih biljaka

- Iako su utvrđene statistički značajne razlike u udjelu flavonoida u listovima s različitih lokaliteta nije bilo moguće izdvojiti pojedine lokalitete kao lokalitete koje generalno karakterizira veći udio flavonoida u biljkama.

- Kako bi se izveli konkretniji zaključci o utjecaju genotipa/lokaliteta na udio bioaktivnih sastavnica, potrebno je ponoviti istraživanja za barem još jedan vegetacijski period, raspolagati podacima o mikroklimatskim uvjetima na lokalitetu u promatranom vegetacijskom periodu te u interpretaciju podataka uključiti podatke o genotipu pojedinih biljaka.

7. LITERATURA

Barracosa P, Osório J, Cravador A. Evalution of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua L.)* cultivaris in Algarve region. *Scientis Horticulturae*, 2007, 114, 250-257.

Battle I, Tous J. Promoting the conservation and use of underutilized crops (Carob tree, *Ceratonia siliqua L*.) Rim, International Plant Genetics Resources Institute (IPGI), 1997, 20-29.

Beenu Tanwar, Rajni Modgil. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits, *Spatula DD*, 2012; 2(1):59-68

Biner B, Gubbuk H, Karham M, Aksu M, Pekmeczi M. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia Siliqua L.*) in Turkey. *Food Chem*, 2007, 100(4), 1453-1455.

Chun OK, Kim DO, Lee CY. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(27), 8067-8072.

E-Hu Liu, Lian-Wen Qi, Jun Cao, Ping Li, Chang-yin L and Yong-Bo Peng. Advances of Modern Chromatographic and Electrohoretic Methods an Separation and Analysis of Flavonoides. *Molecules,* 2008, 13, 2521-2544.

Eva de Rijeke, Pieter Out, Wilfried M.A. Niessen, Freek Ariese, Cees Gooijer, Udo A.Th. Brinkman. Analytical separation and detection methods for flavonoides. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1112 (2006), 31–63.

Gruendel S, Galcia AL, Otto B, Muller C. Carob pulp preparation rich insoluble dietary fibre and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *JN*, 2006, 136(6), 1333-1538.

Hanane El Hajaji, Nadya Lachkar Katim Alaoui, Yahya Cherrah, Abdellah Farah, Abdesslam Ennabili, Brahim El Bali, Mohammed Lachkar. Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco. *Rec. Nat. Prod*, 2010, 4:4 (2010), 193-204.

Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro,* 2001,15(1), 3-6.

Ita Samaržija, Nutritivna i ljekovita svojstva rogača, *Farmaceutski glasnik*, 2013, 69, 454 - 461.

Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon Ms, Nakayama T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 2433-2440

Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr*, 2003, 133(10), 3262-3267.

Makris DP, Kefalas P. Carob pods (*Ceratonia siliqua L.*) as a source of polyphenolic antioxidants. *FTB*, 2004, 42(2), 105-108.

Marakis SG. Carob bean in food and feed: status and future potentials – A critical appraisal. *JFST*, 1996, 33(5), 365-383.

Owen RW, Haubner R, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Haber B. Isolation and structure elucidation of major individual polyphenols in carob fiber. *FCT*, 2003, 41, 1727 – 1738.

Rehorović, Zvjezdana, Utjecaj lokaliteta i spola na antioksidacijsku učinkovitost lista rogača (*Ceratonia siliqua, L.)* / završni rad - diplomski/integralni studij.2014.

Shashank Kumar and Abhay K. Pandey. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The ScientificWorld Journal*, 2013, Volume 2013 (2013), Article ID 162750, 16 pages

Vidra, Adela, Antiradikalna i redukcijska učinkovitost lista rogača (Ceratonia siliqua L.) / završni rad - diplomski/integralni studij.2014

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(7), 3838-3849.

Yousif AK, Alghzawi HM. Precessing and characterization of carob powder. *Food chem*, 2000, 69(3), 283-287.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. Sažetak

Rogač (Ceratonia siliqua L) je zimzelena biljka nekoć jako rasprostranjena u Hrvatskoj. Danas je sve manje lokaliteta na kojima rastu samonikle biljke, a organiziranih nasada rogača gotovo da i nema. Autohtoni sortiment rogača je u potpunosti neistražen te se malo zna o kemijskom sastavu ploda i listova domaćih sorti.

Osnovni cilj ovog rada bio je utvrditi udio flavonoida u listovima samoniklih stabala/grmova rogača pronađenih na 14 lokacija na dalmatinskoj obali i otocima. Udio flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom nakon uzastopne ekstrakcije odmašćenog lista rogača različitim organskim otapalima. Dobiveni rezultati, izraženi kao ekvivalenti kvercetina, pokazali su da udio flavonoida u listu bitno varira ovisno o lokalitetu i spolu biljke. Koncentracije flavonoida kretale su se od 266.7 do 503.0 mg QUE/g u listovima muških stabala; od 297.6 do 595.4 mg QUE/g u listovima ženskih stabala i od 405.9 do 624.5 mg QUE/g u listovima dvospolnih stabala. Ovisno o lokalitetu mogu se također zamijetiti razlike: biljke s otoka bogatije su flavonoidima od biljaka koje rastu na kopnu. Osim toga, listovi rogača prikupljeni na lokalitetu Mali Lošinj, sadržavali su značajno manju koncentraciju flavonoida u usporedbi s južnodalmatinskim lokalitetima. Spol biljke bitno utječe na udio flavonoida u listu: neovisno o lokalitetu udio flavonoida bio je najniži u listovima muških stabala, nešto viši u listovima ženskih stabala i značajno viši u listovima sa dvospolnih biljaka.

8.2. Summary

Carob (Ceratonia siliqua L) is an evergeen plant which was once before widespread all around Croatia. Today there are fewer locations where the plant naturally grows, and even fewer organized plantations. Indigenous variety of carob is completely unexplored and little is known aout the chemical composition of the fruit and the leaves of domestic varieties.

The main objective of this work was to determine the levels of flavonoids in leaves of wild trees/shrubs of carob found at 14 locations on the Dalmatian coast and islands. The level of flavonoids was determined by spectrophotometric method after consecutive extraction of the deffated leaf of carob with the organic solvents. The obtained results, expressed as equivalents of quercetin, showed that the levels of flavonoids in the leaf varies significantly depending on the locality and the gender of the plant. The concentrations of flavonoids ranged from 266.7 to 503.0 mg QUE/g in the leaves of male trees; from 297.6 to 595.4 mg QUE/g in leaves of female trees; from 405.9 to 624.5 mg QUE/g in leaves of bisexual trees. Depending on the locality we can also notice a difference: the plants of carob from the islands are richer with flavonoids than the plants which grow on the coast and inland. In addition, carob leaves collected at the site of Mali Lošinj contained significantly lower concentration of flavonoids in comparison to the south Dalmatian locations. Gender of the plant significantly affects the levels of flavonoids in the leaves: regardless of the site the level of flavonoids was the lowest in the male plants, a little higher in the leaves of the female plants and significantly higher in the leaves of the bisexual plants.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko – biokemijski fakultet
Zavod za kemiju prehrane
A.Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UDIO FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA LISTA ROGAČA (CERATONIA SILIQUA L.): UTJECAJ LOKALITETA I SPOLA BILJKE

Maja Lovrić

SAŽETAK

Rogač (Ceratonia siliqua L) je zimzelena biljka nekoć jako rasprostranjena u Hrvatskoj. Danas je sve manje lokaliteta na kojima rastu samonikle biljke, a organiziranih nasada rogača gotovo da i nema. Autohtoni sortiment rogača je u potpunosti neistražen te se malo zna o kemijskom sastavu ploda i listova domaćih sorti.

Osnovni cilj ovog rada bio je utvrditi udio flavonoida u listovima samoniklih stabala/grmova rogača pronađenih na 14 lokacija na dalmatinskoj obali i otocima. Udio flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom nakon uzastopne ekstrakcije odmašćenog lista rogača različitim organskim otapalima. Dobiveni rezultati, izraženi kao ekvivalenti kvercetina, pokazali su da udio flavonoida u listu bitno varira ovisno o lokalitetu i spolu biljke. Koncentracije flavonoida kretale su se od 266.7 do 503.0 mg QUE/g u listovima muških stabala; od 297.6 do 595.4 mg QUE/g u listovima ženskih stabala i od 405.9 do 624.5 mg QUE/g u listovima dvospolnih stabala. Ovisno o lokalitetu mogu se također zamijetiti razlike: biljke s otoka bogatije su flavonoidima od biljaka koje rastu na kopnu. Osim toga, listovi rogača prikupljeni na lokalitetu Mali Lošinj, sadržavali su značajno manju koncentraciju flavonoida u usporedbi s južnodalmatinskim lokalitetima. Spol biljke bitno utječe na udio flavonoida u listu: neovisno o lokalitetu udio flavonoida bio je najniži u listovima muških stabala, nešto viši u listovima ženskih stabala i značajno viši u listovima sa dvospolnih biljaka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranice, 12 grafičkih prikaza, 3 tablice i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječ: rogač, flavonoidi, spol i lokalitet biljke

Mentor: **Dr.sc. Dubravka Vitali Čepo**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr.sc. Dubravka Vitali Čepo**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr.sc. Lovorka Vujić, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr.sc. Marijana Zovko Končić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Food Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

LEVELS OF FLAVONOID IN LEAVES OC CAROB PLANT (CERATONIA SILIQUA L.): INFLUENCE OF LOCALITY AND GENDER OF THE PLANT

Maja Lovrić

SUMMARY

Carob (Ceratonia siliqua L) is an evergeen plant which was once before widespread all around Croatia. Today there are fewer locations where the plant naturally grows, and even fewer organized plantations. Indigenous variety of carob is completely unexplored and little is known aout the chemical composition of the fruit and the leaves of domestic varieties.

The main objective of this work was to determine the levels of flavonoids in leaves of wild trees/shrubs of carob found at 14 locations on the Dalmatian coast and islands. The level of flavonoids was determined by spectrophotometric method after consecutive extraction of the deffated leaf of carob with the organic solvents. The obtained results, expressed as equivalents of quercetin, showed that the levels of flavonoids in the leaf varies significantly depending on the locality and the gender of the plant. The concentrations of flavonoids ranged from 266.7 to 503.0 mg QUE/g in the leaves of male trees; from 297.6 to 595.4 mg QUE/g in leaves of female trees; from 405.9 to 624.5 mg QUE/g in leaves of bisexual trees. Depending on the locality we can also notice a difference: the plants of carob from the islands are richer with flavonoids than the plants which grow on the coast and inland. In addition, carob leaves collected at the site of Mali Lošinj contained significantly lower concentration of flavonoids in comparison to the south Dalmatian locations. Gender of the plant significantly affects the levels of flavonoids in the leaves: regardless of the site the level of flavonoids was the lowest in the male plants, a little higher in the leaves of the female plants and significantly higher in the leaves of the bisexual plants.

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

Thesis includes: 44 pages, 12 figures, 3 tables i 21 references. The original is in Croatian language.

Keywords: carob, flavonoids, gender and locality of the plant

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** / *Assistent Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. /** *Assistent Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. / *Senior Assistent*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Zovko Končić, Ph.D. / *Assistent Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.