Sadržaj flavonoida i antioksidativni učinak in vitro vrsta roda Globularia

Lukežić, Mateja

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:163:156099

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Mateja Lukežić

Sadržaj flavonoida i antioksidativni učinak *in vitro* vrsta roda *Globularia*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutska botanika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Kroate Hazler Pilepić.

Hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Kroati Hazler Pilepić i asistentici Maji Crkvenčić mag. pharm., na stručnoj pomoći i velikom trudu uloženom tijekom izrade diplomskog rada. Hvala prijateljicama Maji i Mirni na nezaboravnim uspomenama i dečku Željku na svim divnim trenucima. Zahvaljujem se svojoj obitelji, posebice mami Višnji i tati Luki na podršci koju mi pružaju cijeli život i njima posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1. 1. ROD *GLOBULARIA* L. 2

1.2. VRSTE RODA *GLOBULARIA* ZASTUPLJENE U HRVATSKOJ FLORI.....2

1.2.1. *Globularia alypum* L. 2

1.2.2. *Globularia cordifolia* L. 4

1.2.3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz.....5

1.2.4. *Globularia punctata* Lapeyr. 6

1.3. FLAVONOIDI.....7

1.3.1. Struktura i klasifikacija flavonoida.....7

1.3.2. Antioksidativna svojstva flavonoida.....9

1.3.3. Ekstrakcija flavonoida.....12

1.3.4. Određivanje flavonoida.....13

1.4. DPPH TEST.....14

2. OBRAZLOŽENJE TEME.....15

3. MATERIJALI I METODE.....17

3.1. MATERIJALI.....18

3.1.1. Biljni materijal.....18

3.1.2. Kemikalije.....18

3.1.3. Uređaji.....18

3.2. METODE ISPITIVANJA.....19

3.2.1. Priprema ekstrakata.....19

3.2.2. Određivanje flavonoida.....20

3.2.3. Određivanje antioksidativnog učinka *in vitro* (DPPH test).....22

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....24

4. REZULTATI I RASPRAVA.....25

4.1. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA.....26

4.1.1. Baždarni pravac kvercetina.....26

4.1.2. Sadržaj flavonoida.....28

4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA *IN VITRO*.....33

4.2.1. Baždarni pravac Troloxa.....33

4.2.2. Baždarni pravac galne kiseline.....34

4.2.3. DPPH test.....35

5. ZAKLJUČCI.....41

6. LITERATURA.....43

7. SAŽETAK/SUMMARY.....47

7.1. SAŽETAK.....48

7.2. SUMMARY.....49

1. UVOD

1. 1. ROD *GLOBULARIA* L.

Rod *Globularia* pripada porodici Plantaginaceae. Sadrži tridesetak vrsta koje rastu na suhim mjestima kao što su stijene, pašnjaci i kamenjari. Vrste ovog roda uglavnom su rasprostranjene u mediteranskom području, od kuda se šire prema sjevernoj Europi i sjeveroistočnoj Africi (Kadereit, 2004). Ovaj biljni rod poznat je u području Hrvatske po nekoliko vrlo raširenih planinskih vrsta, pod imenom mačje capice koje rastu na stijenama, kamenom tlu vapnenog ili dolomitnog sastava, na planinskim pašnjacima ili pak na vapnenom tlu nižeg brdskog područja, po suhim i sunčanim livadama i travnjacima (Kušan, 1943).

Vrste roda *Globularia* su grmaste/polugrmaste ili trajne zeljaste biljke. Listovi su kožasti i izmjenično smješteni na stabljici, dok su na dnu stabljike smješteni u ružici. Cvjetovi su zigomorfni (jednosimetrični) i dvospolni, u sabijenim glavicama. Čaška je trajna i peteročlana. Vjenčić je cjevast, dvousnat, sulatičan i plave je boje. Vrste imaju četiri dvomoćna prašnika, a plodnica je nadrasla i nastala je od dva plodnička lista. Plod je jednosjemeni oraščić (Kadereit, 2004; Kušan, 1943).

1.2. VRSTE RODA *GLOBULARIA* ZASTUPLJENE U HRVATSKOJ FLORI

1.2.1. *Globularia alypum* L.

Hrvatski naziv: grmasta glavulja (http://hirc.botanic.hr/)

Raste u pukotinama stijena i kamenjarima na Mediteranu. U Hrvatskoj je manje raširena, poznata samo s jednog lokaliteta južno od Ćilipa, na području Konavoskih stijena (Šugar, 1994).

Razvijena je u obliku polugrma ili grma, koji može narasti i do 60 cm. Stabljika ovog grma je obično uspravna, ali može biti i prilegnuta. Donji dijelovi drvenaste stabljike vrlo su nepravilni, kvrgavi i ispucani. Kora je razvijena, svijetlo smeđe je boje, jako je trošna i ispucana. Maleni, zimzeleni i kožasti listovi nisu smješteni u ružici, već se nalaze na svim mlađim dijelovima stabljike, na okrajnim i šibljasto produženim ograncima. Duguljastog su i usko ovalnog oblika, poprimaju izgled lopate. Mirisni i plavičasti cvjetovi razvijaju se u cvatnim glavicama, a pojavljuju se u vrijeme zime i u rano proljeće, na vrhu ogranaka ili postrance na kratkim grančicama. Glavice su obavijene kožastim, manje ili više okruglastim

ili jajastim braktejama, koje su trepavičasto dlakave na rubu. Glavičast cvat čine brojni i razmjerno sitni jednosimetrični cvjetovi. Čaška je zelena, peteročlana i s režnjevima, koji su više od polovice čaškine dužine razdvojeni. Vjenčić je dvousnat, a cijev vjenčića je duga i uska. Prašničke niti, koje su pričvršćene na cijev vjenčića, izviruju daleko iz cvijeta. Njuška tučka je rascijepljena (Kušan, 1943).



Slika 1. *Globularia alypum* L. (luirig.altervista.org)

1.2.2. *Globularia cordifolia* L.

Hrvatski naziv: srcolika glavulja (http://hirc.botanic.hr/)

Raste na stijenama, na kamenom tlu vapnenog ili dolomitnog sastava. Često su velike površine prisojnih obronaka brdskih krajeva prekrivene tom vrstom (Kušan, 1943). Raširena je po planinama središnje i južne Europe, od Karpata do sjeveroistočne Španjolske (Tutin i sur., 1972).

Razvija se kao prilegnuti i jako razgranati polugrm, koji tjera uspravne i do 8 cm duge bezlisne izdanke s cvatnim glavicama. Listovi su lopatasti i smješteni u ružicama na postranim izdancima. Obrnuto su jajasti i na vrhu manje više duboko zarezani, a vrlo često i nazubljeni, s tri zuba (Kušan, 1943).



Slika 2. *Globularia cordifolia* L. (luirig.altervista.org)

1.2.3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz

Hrvatski naziv: modra glavulja (http://hirc.botanic.hr/)

Raširena je na jugoistočnim Alpama, planinama Balkanskog poluotoka te u središnjim i južnim Apeninima (Tutin i sur., 1972).

Nekada se smatrala podvrstom vrste *G. cordifolia* pod nazivom *Globularia cordifolia* L. subsp. *bellidifolia*. *Globularia meridionalis* krupnija je od *G. cordifolia* (Tutin i sur., 1972), listovi su joj više zaokruženi i lopatasti, na vrhu čitava ruba ili samo neznatno nazubljeni (Kušan, 1943).



Slika 3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz (luirig.altervista.org)

1.2.4. *Globularia punctata* Lapeyr.

Hrvatski naziv: točkasta glavulja (http://hirc.botanic.hr/)

Raste na vapnenom tlu nižeg brdskog područja, po suhim i sunčanim livadama i travnjacima (Kušan, 1943). Raširena je od sjeverne Francuske, Češke, Slovačke, do sjeverne Španjolske, južne Italije i sjeveroistočne Grčke (Tutin i sur., 1972).

Globularia punctata je do 30 cm visoka biljka s uspravnom stabljikom, koja završava s jednom cvatnom glavicom, a nosi na sebi obilje jajastih ili lancetastih listova. Ostali listovi smješteni su u ružici na dnu stabljike i lopatastog su oblika (Kušan, 1943).



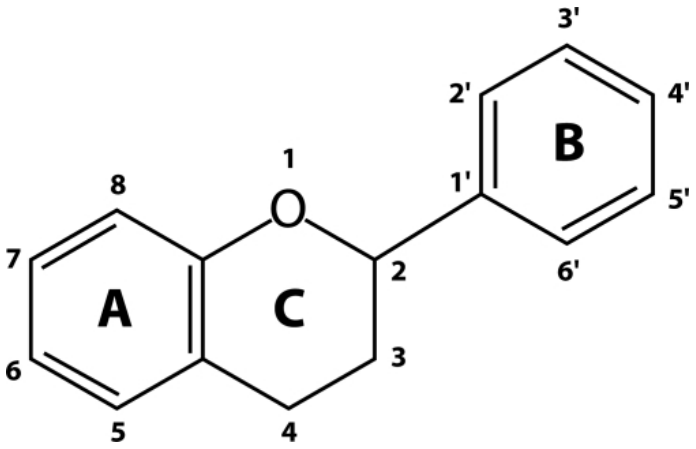
Slika 4. *Globularia punctata* Lapeyr. (http://hirc.botanic.hr/)

1.3. FLAVONOIDI

Vrste roda *Globularia* bogat su izvor polifenolnih spojeva kojima pripadaju i flavonoidi (Khlifi i sur., 2011). U biljkama flavonoidi su najviše prisutni u listovima, sjemenu, kori i cvjetovima. Oni omogućuju biljci zaštitu od ultraljubičastog zračenja, patogena i biljojeda. Antocijanini kao pigmenti u cvjetovima privlače brojne kukce za oprašivanje. U ljudskoj prehrani najviše flavonoida sadrži voće, povrće, crno vino, zeleni i crni čaj te kakao. Flavonoidi su dobri "hvatači" slobodnih radikala, a time imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao lijekovi i antioksidansi. Osim antioksidativnog djelovanja, pokazalo se da flavonoidi imaju antibakterijsko, sedativno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i druga djelovanja (Heim i sur., 2002).

1.3.1. Struktura i klasifikacija flavonoida

Osnovna struktura flavonoida je flavan, tj. difenilpropan koji se sastoji od 15 atoma ugljika raspoređenih u tri prstena (C_6-C_3-C_6), koji su označeni kao A, B i C prsten (Slika 5).

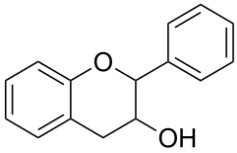
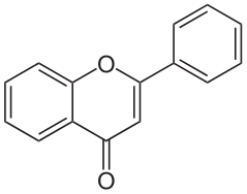
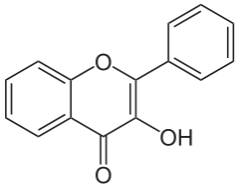
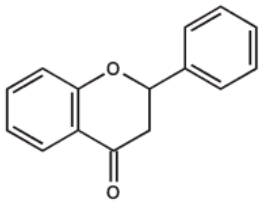


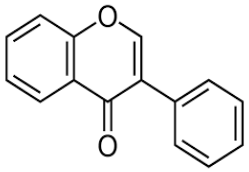
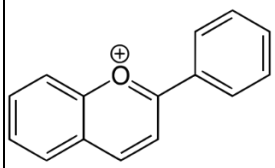
Slika 5. Osnovna struktura flavonoida (Pietta, 2000)

Osnovna struktura flavonoida može biti hidroksilirana, alkilirana i glikozilirana s monosaharidima ili oligosaharidima. Različite skupine flavonoida razlikuju se po broju i rasporedu hidroksilnih grupa te opsegu njihove alkilacije i glikozilacije. Kod flavonoida

postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (tanini) (Rice-Evans i sur., 1996). Flavonoide dijelimo u nekoliko skupina, a to su: flavan-3-oli, flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni i antocijanidini (Tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija flavonoida (Heim i sur., 2002)

Skupina	Struktura	Flavonoid	Mjesto i vrsta supstitucije
Flavan-3-ol		(+)-katehin (-)-epikatehin Epigalokatehin galat	3,5,7,3`,4`-OH 3,5,7,3`,4`-OH 3,5,7,3`,4`5`-OH
Flavon		Krizin Apigenin Rutin Luteolin Luteolin glukozid	5,7-OH 5,7,4`-OH 5,7,3`,4`-OH,3-rutinoza 5,7,3`,4`-OH 5,7,3`-OH,4`-glukoza 5,4`-OH,4`,7-glukoza
Flavonol		Kempferol Kvercetin Miricetin Tamariksetin	3,5,7,4`-OH 3,5,7,3`,4`-OH 3,5,7,3`,4`,5`-OH 3,5,7,3`-OH,4`-OMe
Flavanon		Naringin Naringenin Taksifolin Eriodiktiol Hesperidin	5,4`-OH,7-ramnoglukoza 5,7,4`-OH 3,5,7,3`,4`-OH 5,7,3`,4`-OH 5,3`-OH,4'-OMe,7-rutinoza

Izoflavon		Genistin Genistein Daidzin Daidzein	5,4`-OH,7-glukoza 5,7,4`-OH 4`.OH,7-glukoza 7,4`-OH
Antocijanidin		Apigenidin Cijanidin	5,7,4`-OH 3,5,7,3',4`-OH

1.3.2. Antioksidativna svojstva flavonoida

Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina: sparivanjem ("hvatanjem") elektrona slobodnog radikala, kelatnim vezanjem iona prijelaznih kovina (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranjem antioksidacijskih enzima i inhibiranjem oksidaza (Heim i sur., 2002).

Najvažniji način je kada djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala (Slika 6). Slobodni radikali i reaktivni kisikovi spojevi (ROS) su nestabilne molekule kojima nedostaje jedan elektron. Reaktivni kisikovi spojevi uključuju: peroksidni radikal-anion ($O_2^{-\bullet}$), hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$), hidroperoksidni radikal ($HO_2^{\bullet}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i lipidne peroksidne radikale. Slobodni radikali su veoma reaktivni i štetni jer izazivaju oksidaciju lipida u staničnoj membrani, kao i proteina u tkivima, enzima i DNA, što uzrokuje oštećenje stanične membrane, promjenu u strukturi proteina, enzima i oštećenje DNA. Ta oksidativna oštećenja uzrok su starenja i nekih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, katarakta, kognitivne bolesti i rak (Pietta, 2000).

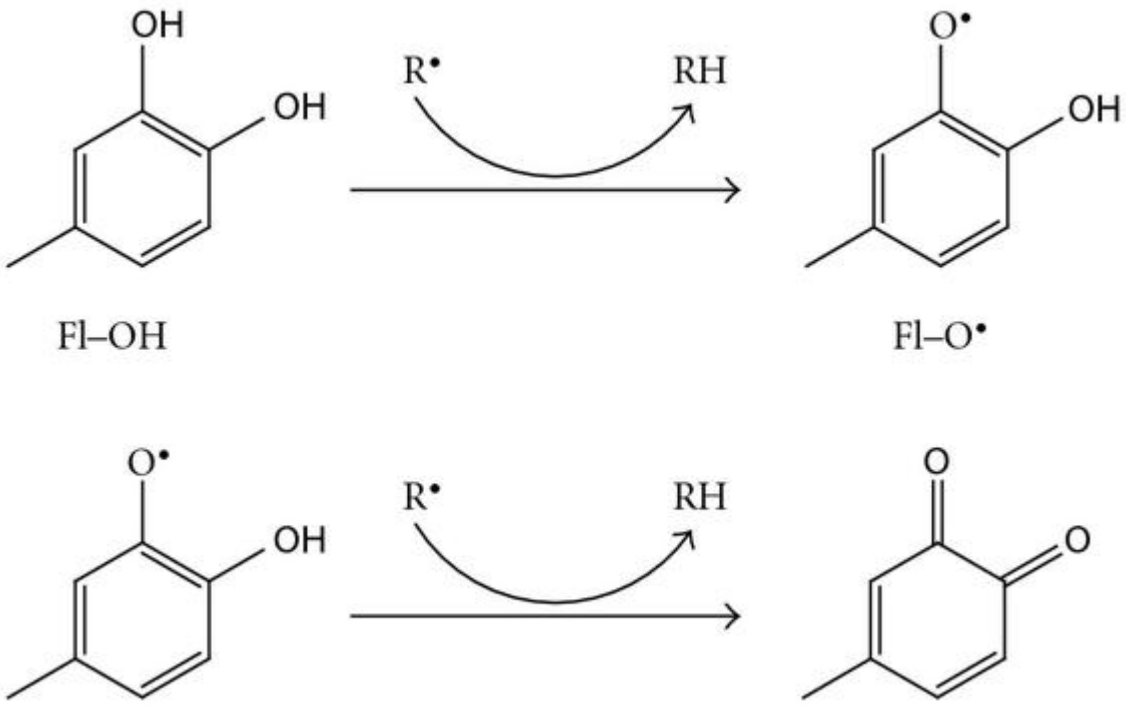
Flavonoid kao antioksidans mora zadovoljiti dva uvjeta:

- kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, mora bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije,
- iz njega nastali radikal mora biti stabilan da ne bi poticao lančanu reakciju.

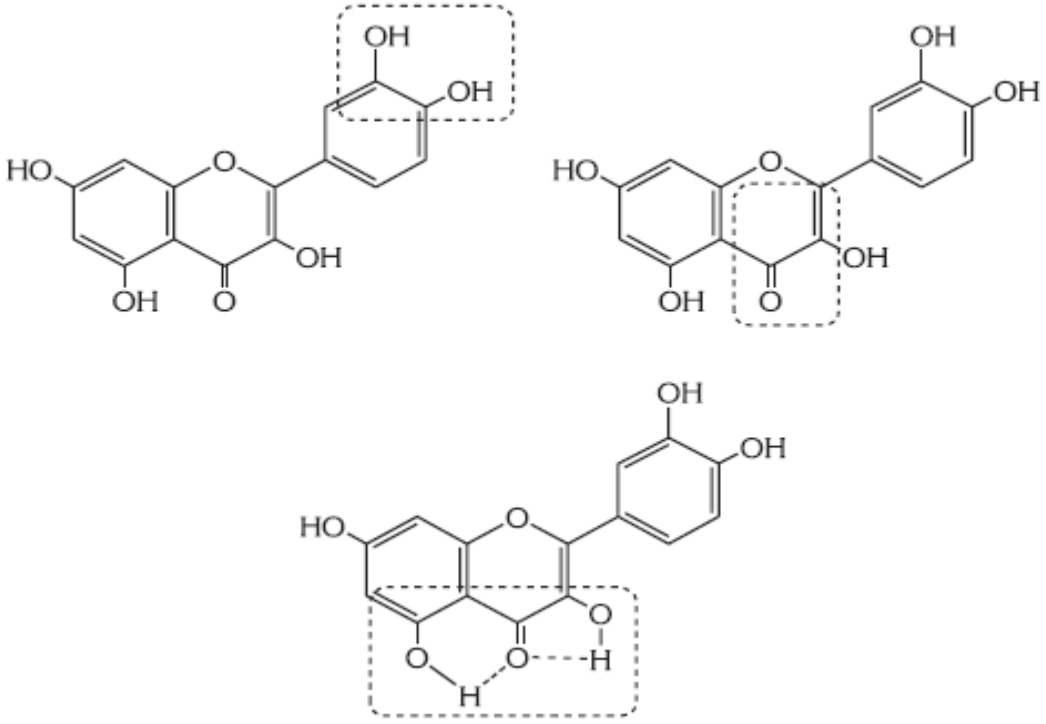
Flavonoidi kao hvatači slobodnih radikala djeluju tako što imaju sposobnost doniranja vodikovog atoma zato što je njihov redoks potencijal manji od redoks potencijala slobodnih radikala.

Na sposobnost hvatanja slobodnih radikala bitno utječe struktura flavonoida (Slika 7). Tri najvažnije karakteristike za učinkovito hvatanje slobodnih radikala su:

- *o*-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona,
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena,
- hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (Rice-Evans i sur., 1996).



Slika 6. Mehanizam hvatanja slobodnih radikala (Pietta, 2000)



Slika 7. Strukturne skupine flavonoida važne za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

1.3.3. Ekstrakcija flavonoida

Ekstrakcija je tehnika koja se koristi za odvajanje željenih aktivnih sastavnica od neželjenog, netopljivog materijala pomoću odgovarajućeg otapala. Ekstrakcija je prvi korak u procesu nekog istraživanja te je potrebno prilagoditi određenu metodu ekstrakcije da bi se postigla bolja kvaliteta i učinkovitost ekstrakcije. Na kvalitetu ekstrakcije utječe nekoliko faktora kao što su: dijelovi biljke koji se koriste kao početni materijal, otapalo za ekstrakciju, postupak ekstrakcije, obrada biljnog materijala (Kothari i sur., 2012).

Biljni uzorci se prije ekstrakcije obično melju, mrve i homogeniziraju. Otapala koja omogućuju najveći prinos flavonoida su polarna organska otapala kao što su npr. metanol ili etanol (Khlifi i sur., 2011).

- **Maceracija**

Usitnjeni biljni materijal se ekstrahira određenim otapalom na sobnoj temperaturi od nekoliko sati do nekoliko dana. Vrijeme maceracije ovisi o vrsti biljke, dijelu biljke i tvari koja se ekstrahira. Prednost ove metode je upotreba hladnog otapala, čime se smanjuje razgradnja aktivnih tvari. Nedostatak metode je taj što postupak može trajati duže vrijeme.

- **Dekokcija**

Usitnjeni biljni materijal se kuha u otapalu 15-20 min, ovisno o biljci, dijelovima biljke i tvari koja se ekstrahira. Vrijeme dekokcije za listove, cvjetove, korjenje je kraće i traje oko 15 min, dok za grančice i ostale tvrđe dijelove biljke može trajati više od 1 h. Za vrijeme dekokcije ispareno otapalo mora biti nadomješteno da se dobije željeni volumen dekokta. Prednost ove metode je kraće vrijeme trajanja ekstrakcije. Nedostatak metode je taj što se njome mogu ekstahirati samo termostabilne tvari (http://www.medicinalplants-pharmacognosy.com/).

- **Ultrazvučna ekstrakcija**

Ultrazvučna ekstrakcija je metoda ekstrakcije olakšana korištenjem ultrazvuka. Otopine uzoraka biljnog materijala smještene su u ultrazvučnoj kupelji u kojima ultrazvuk inducira mehanički stres proizvodnjom kavitacije u uzorku. Zbog veće propustljivosti stanične stijenke, otapanje određenih tvari u otapalu je veće što poboljšava prinos ekstrakcije. Preferira se kao metoda ekstrakcije za malu količinu materijala. Predstavlja brzu, ekonomičnu i učinkovitu ekstrakciju (Yingngam i sur., 2014).

1.3.4. Određivanje flavonoida

Ne postoji jedinstvena metoda za određivanje sadržaja svih flavonoida, pa se preporučuje nekoliko metoda.

Prvu metodu opisali su Woisky i Salatino. Prema njihovoj metodi u otopinu uzorka flavonoida dodaje se aluminijev klorid ($AlCl_3$) koji daje žuto obojeni kompleks s flavonoidima. Kao standard koristi se otopina kvercetina. Apsorbancija se mjeri na 420 nm.

Chang, Yang, Wen i Chern modificirali su prvu metodu Woiskyja i Salatina tako što se nakon dodatka $AlCl_3$ u otopinu uzorka flavonoida dodaje kalijev acetat i apsorbancija se mjeri na 415 nm. Kao i u prvoj metodi, kvercetin se koristi kao standard (Denni i Mammen, 2012).

Obje metode su kolorimetrijske metode s $AlCl_3$. Metode se temelje na tome da $AlCl_3$ formira stabilne kisele komplekse s C-4 keto skupinom i C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona i flavonola, a nestabilne komplekse s ortodihidroksilnim skupinama u A ili B prstenu flavonoida. Nedostatak ovih metoda može biti taj što u biljkama flavoni i flavonoli mogu postojati u obliku glikozida, a prisutnost šećerne skupine ugrožava ispravnu kelataciju s $AlCl_3$. Bilo koja blokada hidroksilnih skupina glikozilacijom, čak i metoksilacijom na pozicijama 3, 5, 3` ili 4` sprječava kelataciju s $AlCl_3$ (Chang i sur., 2002).

Ove metode smatraju se brzim i jeftinim metodama, koje umanjuju potrebu za individualnim standardima za određivanje flavonoida. Stoga su široko prihvaćene i koriste se u određivanju flavonoida u voću, povrću, žitaricama, začinima, ljekovitom bilju itd (Denni i Mammen, 2012).

1.4. DPPH TEST

DPPH test koristi se za ispitivanje antioksidativnog učinka određene tvari tj. za ispitivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala.

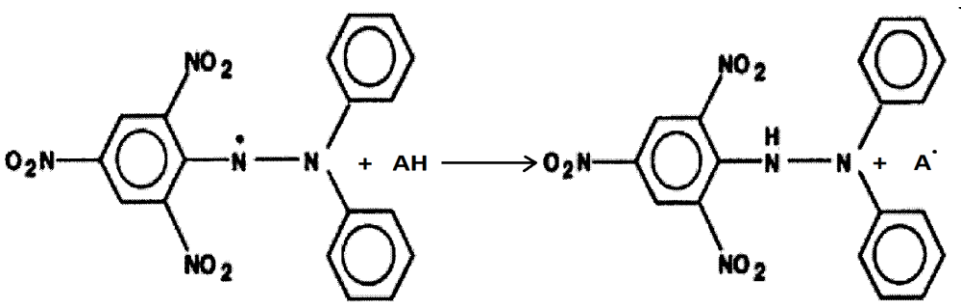
DPPH test temelji se na mjerenju sposobnosti hvatanja stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH•). Slobodni radikal DPPH• se reducira u odgovarajući hidrazin kada reagira s antioksidansom koji mu donira vodik (Slika 8).

Ova sposobnost antioksidansa može se određivati mjerenjem intenziteta signala slobodnog DPPH• radikala dobivenog elektronskom paramagnetnom rezonancijskom (*Electron Spin Resonance*, ESR) spektroskopijom. Intenzitet signala je obrnuto proporcionalan koncentraciji antioksidansa i vremenu trajanja reakcije.

Češće korištena tehnika jest ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija. Primjenjuje se tzv. test obezbojenja kojim se antioksidativni učinak određuje mjerenjem smanjenja apsorbancije na 515-528 nm, a koje je uzrokovano dodatkom antioksidansa u etanolnu ili metanolnu otopinu DPPH• (Sanchez-Moreno, 2002). Slobodni stabilni radikal DPPH• daje tamno ljubičastu boju, a njegovom redukcijom ta tamno ljubičasta boja se gubi (Molyneux, 2003).

Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) se može koristiti kao standard te se tada rezultati izražavaju kao ekvivalenti Troloxa. Trolox i DPPH• radikal reagiraju u omjeru 1:2, što znači da 1 mol Troloxa reducira 2 mola DPPH• radikala.

DPPH test je vrlo pouzdana i točna metoda za određivanje antioksidativnog učinka flavonoida (Sanchez-Moreno, 2002).



Slika 8. Reakcija DPPH• radikala s antioksidansom (AH) (Molyneux, 2003)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vrste roda *Globularia* bogat su izvor polifenolnih spojeva kojima pripadaju i flavonoidi. Poznato je da oni imaju antioksidativni učinak koji je odgovoran za prevenciju različitih bolesti poput tumora i kardiovaskularnih bolesti. *Globularia alypum* koristi se u narodnoj medicini za liječenje šećerne bolesti, kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti, za jačanje imuniteta, kao laksativ i purgativ te za liječenje probavnih tegoba (Khlifi i sur., 2011). Zbog ovih činjenica, pojavilo se veliko zanimanje za istraživanjem *G. alypum* i ostalih vrsta ovoga roda.

Ovim radom željelo se postići nekoliko ciljeva. Prvi cilj bio je usporediti sadržaj flavonoida u različitim vrstama roda *Globularia*: *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis i G. punctata.* Pri tome su korištene četiri različite metode ekstrakcije: dekokcija, ultrazvučna ekstrakcija, maceracija i kisela maceracija.

Sljedeći cilj ovog rada bio je odrediti antioksidativni učinak *in vitro* različitih ekstrakata vrsta roda *Globularia*. Za utvrđivanje atioksidativnog učinka korišten je DPPH test.

Budući da se antioksidativna aktivnost često povezuje s prisutnošću flavonoida, ovim radom željelo se utvrditi i može li se antioksidativna aktivnost vrsta roda *Globularia* povezati s njihovim sadržajem flavonoida.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu istražene su sljedeće biljne vrste: *Globularia alypum* L., *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz, *G. punctata* Lapeyr.

Tablica 2. Mjesto i vrijeme sabiranja biljnih vrsta

Biljna vrsta	**Mjesto sabiranja**	**Vrijeme sabiranja**
G. alypum L.	Konavoske stijene	ožujak 2013. god.
G. cordifolia L.	Sjeverni Velebit	svibanj 2013. god.
G. meridionalis (Podp.) O. Schwarz	Grobničko polje	svibanj 2013. god.
G. punctata Lapeyr.	Grobničko polje	svibanj 2013. god.

Biljni materijal činili su nadzemni dijelovi (zelen), osušeni na sobnoj temperaturi, očišćeni i usitnjeni mljevenjem do praškaste konzistencije.

3.1.2. Kemikalije

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije: metanol (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska), 35% klorovodična kiselina (Lach-Ner, Neratovice, Češka), aluminijev klorid, kvercetin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka), 2,2–difenil-1-pikrilhidrazil ili DPPH (Fluka, Buchs, Švicarska), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina ili Trolox (Acros Organics, New Jersey, USA), galna kiselina (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Njemačka).

3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: precizna i analitička vaga (PB 303 DeltaRange, Mettler Toledo, SAD; HP 1AR, Mettler Toledo, SAD), magnetska mješalica s grijanjem (Witeg, Njemačka), ultrazvučna kupelj (Bandelin SONOREX SUPER, Bandelin Electronic GmbH & Co., Njemačka), UV-Vis spektrofotometar (PG Instruments T70, UK), električna tresilica za epruvete (Heidolph Reax Top, Heidolph Instruments, Njemačka).

3.2. METODE ISPITIVANJA

3.2.1. Priprema ekstrakata

- **Dekokcija**

0,5 g uzorka svake biljke stavljeno je u okrugle tikvice s ravnim dnom, dodano je 10 ml metanola te je na tikvice pričvršćeno vodeno hladilo. Sadržaj tikvica je kuhan 45 min uz povratno hlađenje. Nakon kuhanja, ekstrakti su filtrirani kroz naborani filter papir i tanki sloj vate u čiste epruvete. Zatim su iz epruveta prebačeni u odmjerne tikvice od 10 ml koje su potom nadopunjene metanolom do oznake. Na kraju su ekstrakti prebačeni u prethodno označene plastične epruvete od 15 ml koje su zatim zatvorene parafilmom i spremljene u hladnjak.

- **Ultrazvučna ekstrakcija**

0,5 g uzorka svake biljke stavljeno je u Erlenmeyerove tikvice te je dodano 10 ml metanola. Tikvice su zatim zatvorene parafilmom. Ekstrakcija je trajala 30 minuta na UZV kupelji na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani kroz naborani filter papir i tanki sloj vate u čiste epruvete. Zatim je provedena druga ekstrakcija prije koje je promijenjena voda u UZV kupelji jer se tijekom prve ekstrakcije zagrijala. Vata i droga zaostala na filter papiru vraćene su u tikvice, ponovno je u svaku dodano 5 ml metanola i zatvorene su parafilmom. Druga ekstrakcija na UZV kupelji isto je trajala 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz isti filter papir i tanki sloj vate koji su korišteni nakon prve ekstrakcije. Zatim su prebačeni u odmjerne tikvice od 10 ml koje su potom nadopunjene metanolom do oznake. Na kraju su ekstrakti prebačeni u prethodno označene plastične epruvete od 15 ml koje su zatim zatvorene parafilmom i spremljene u hladnjak.

- **Maceracija**

0,5 g uzorka svake biljke stavljeno je u epruvete te je dodano 10 ml metanola. Epruvete su zatim zatvorene parafilmom. Maceracija je trajala 24 h na sobnoj temperaturi. Drugi dan, ekstrakti su filtrirani kroz naborani filter papir i tanki sloj vate u čiste epruvete. Zatim su iz epruveta prebačeni u odmjerne tikvice od 10 ml koje su potom nadopunjene metanolom do

oznake. Na kraju su ekstrakti prebačeni u prethodno označene plastične epruvete od 15 ml koje su zatim zatvorene parafilmom i spremljene u hladnjak.

- **Kisela maceracija**

0,5 g uzorka svake biljke stavljeno je u epruvete, dodano je 10 ml metanola te 4 ml 35% HCl. Epruvete su zatim zatvorene parafilmom. Ekstrakcija je trajala 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani kroz naborani filter papir i tanki sloj vate u čiste epruvete. Zatim su iz epruveta prebačeni u odmjerne tikvice od 10 ml koje su potom nadopunjene metanolom do oznake. Na kraju su ekstrakti prebačeni u prethodno označene plastične epruvete od 15 ml koje su zatim zatvorene parafilmom i spremljene u hladnjak.

3.2.2. Određivanje flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida korištena je modificirana kolorimetrijska metoda s $AlCl_3$ (Khlifi i sur., 2011).

Pripremljena je otopina reagensa $AlCl_3$ koncentracije 2g/100 ml. 2 g $AlCl_3$ otopljeno je u metanolu uz lagano zagrijavanje. Nakon što je otopina ohlađena, prebačena je u odmjernu tikvicu od 100 ml koja je potom nadopunjena metanolom do oznake.

Pripremljena je metanolna otopina standarda kvercetina koncentracije 0,1 mg/ml.. Najprije je po 0,01 g kvercetina otopljeno u metanolu i nadopunjeno do oznake u odmjernoj tikvici od 10 ml čime je dobivena otopina koncentracije 1 mg/ml. Zatim je 1 ml pripremljene otopine kvercetina razrijeđen s metanolom u odmjernoj tikvici od 10 ml. Za izradu baždarnog pravca pripremljeno je 8 razrjeđenja ovako dobivene otopine kvercetina sljedećih koncentracija:

5 μg/ml (50 μl standardne otopine kvercetina + 950 μl metanola)

10 μg/ml (100 μl standardne otopine kvercetina + 900 μl metanola)

15 μg/ml (150 μl standardne otopine kvercetina + 850 μl metanola)

20 μg/ml (200 μl standardne otopine kvercetina + 800 μl metanola)

25 μg/ml (250 μl standardne otopine kvercetina + 750 μl metanola)

30 μg/ml (300 μl standardne otopine kvercetina + 700 μl metanola)

35 μg/ml (350 μl standardne otopine kvercetina + 650 μl metanola)

40 µg/ml (400 µl standardne otopine kvercetina + 600 µl metanola)

Ranije pripremljeni ekstrakti ispitivanih biljaka razrijeđeni su metanolom u omjeru 1:20, odnosno 500 µl uzorka pomiješano je s 9500 µl metanola da bi dobili željeno razrijeđenje. Svi uzorci pripremljeni su u triplikatu.

U 1 ml razrijeđenog uzorka/standarda dodavano je po 1 ml otopine $AlCl_3$ u razmaku od 30 s između istih uzoraka i 1 min između različitih uzoraka. Potrebna je 15 minutna inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom koje su epruvete bile prekrivene Alu-folijom kako ne bi došlo do isparavanja otapala. 15 min nakon dodatka reagensa u prvi uzorak mjerena je apsorbancija uzoraka na 415 nm istim redosljedom kojim su prirađivani u razmaku od 30 s. Boja nakon inkubacije mora biti žuta, a optimalna vrijednost apsorbancije između 0,2 i 0,8.

Slijepe probe sadržavale su: 1 ml razrijeđenog uzorka/standarda kvercetina i 1 ml metanola.

Apsorbancija slijepe probe mjerena je prije svakog novog triplikata tj. za svako razrijeđenje kvercetina.



Slika 9. Pripremljena razrijeđenja otopine kvercetina u reakciji s $AlCl_3$

3.2.3. Određivanje antioksidativnog učinka *in vitro* (DPPH test)

Antioksidativni učinak određen je pomoću modificiranog DPPH testa (Molyneux, 2003).

Najprije je pripremljena metanolna otopina 2,2–difenil-1-pikrilhidrazila ili DPPH. 0,01 g DPPH je postepeno otapano u metanolu uz vorteksiranje.

Pripremljeno je 10 ml metanolne otopine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline ili Troloxa u koncentraciji od 2 mg/ml. Nakon toga pripremljeno je 8 metanolnih razrijeđenja ove otopine sljedećih koncentracija:

100 μg/ml (50 μl otopine Troloxa + 950 μl metanola)

300 μg/ml (150 μl otopine Troloxa + 850 μl metanola)

500 μg/ml (250 μl otopine Troloxa + 750 μl metanola)

700 μg/ml (350 μl otopine Troloxa + 650 μl metanola)

900 μg/ml (450 μl otopine Troloxa + 550 μl metanola)

1100 μg/ml (550 μl otopine Troloxa + 450 μl metanola)

1300 μg/ml (650 μl otopine Troloxa + 350 μl metanola)

1500 μg/ml (750 μl otopine Troloxa + 250 μl metanola)

Pripremljena je metanolna otopina standarda galne kiseline koncentracije 1 mg/ml u odmjernoj tikvici od 10 ml. Iz te otopine pripremljeno je 8 razrijeđenja galne kiseline. Koncentracije razrijeđenih otopina iznosile su:

40 μg/ml (40 μl otopine standarda + 960 μl metanola)

80 μg/ml (80 μl otopine standarda + 920 μl metanola)

120 μg/ml (120 μl otopine standarda + 880 μl metanola)

160 μg/ml (160 μl otopine standarda + 840 μl metanola)

200 μg/ml (200 μl otopine standarda + 800 μl metanola)

240 μg/ml (240 μl otopine standarda + 760 μl metanola)

280 μg/ml (280 μl otopine standarda + 720 μl metanola)

320 μg/ml (320 μl otopine standarda + 680 μl metanola)

Ranije pripremljeni ekstrakti ispitivanih biljaka razrijeđeni su metanolom u omjeru 1:5. Svi uzorci pripremljeni su u triplikatu.

Kao slijepa proba korišten je metanol te je izmjerena njegova apsorbancija na 517 nm.

DPPH reagens je postepeno razrijeđen s metanolom do ljubičaste boje tako da apsorbancija bude 0,70 ± 0,01, za što je upotrebljeno približno 200 ml metanola.

U 2 ml razrijeđenog DPPH reagensa dodano je 10 µl uzorka/standarda galne kiseline/ standarda Trolox-a u razmaku od 30 s. Inkubirano je 30 min na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetlosti i isparavanja otapala Alu-folijom. Nakon 30 min od dodatka prvog uzorka mjerena je apsorbancija na 517 nm.



Slika 10. Pripremljena razrijeđenja otopine Troloxa u reakciji s DPPH reagensom

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sva mjerenja su rađena u triplikatu, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Povezanost parametara ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije p, uz razinu značajnosti $\alpha < 0,05$. Obrada podataka provedena je pomoću programa GraphPad Prism 5.03 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA

4.1.1. Baždarni pravac kvercetina

Kao standard za određivanje flavonoida korišten je kvercetin. Da bi se dobio baždarni pravac (Slika 11), izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija kvercetina (Tablica 3). Prema Beer-Lambertovom zakonu apsorbancija je proporcionalna koncentraciji:

$$A = \varepsilon c l$$

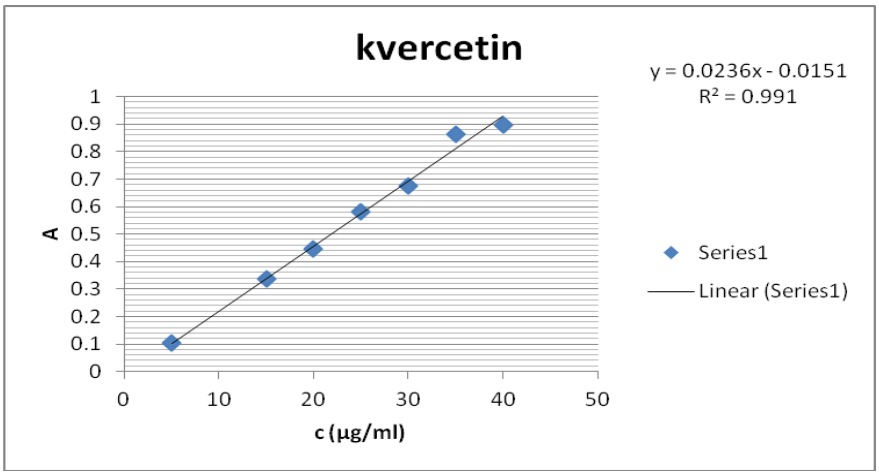
ε – ekstinkcijski faktor

c – koncentracija tvari u uzorku

l – duljina kivete kojom prolazi svjetlost

Tablica 3. Koncentracije i izmjerene apsorbancije kvercetina

Koncentracija kvercetina (µg/ml)	**Apsorbancija**
5	0,1028
15	0,3381
20	0,4475
25	0,5824
30	0,6738
35	0,8639
40	0,8956



Slika 11. Baždarni pravac kvercetina

4.1.2. Sadržaj flavonoida

U ovom radu sva mjerenja rađena su u triplikatu. Uzorcima je mjerena apsorbancija (Tablica 4) te se iz baždarnog pravca kvercetina očitavala odgovarajuća koncentracija (Tablica 5).

Tablica 4. Apsorbancije ispitivanih uzoraka dobivenih različitim metodama ekstrakcije u reakciji s $AlCl_3$

Metoda ekstrakcije	Aps.	***G. alypum***	***G. cordifolia***	***G. meridionalis***	***G. punctata***
DEKOKCIJA	A_1	0,3556	0,3570	0,4505	0,6790
	A_2	0,3344	0,3697	0,4430	0,6722
	A_3	0,3264	0,3655	0,4384	0,6718
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	A_1	0,1597	0,1988	0,3388	0,3880
	A_2	0,1593	0,2002	0,3308	0,3926
	A_3	0,1594	0,2031	0,3396	0,3639
MACERACIJA	A_1	0,2326	0,1637	0,1019	0,3546
	A_2	0,2444	0,1746	0,1091	0,3651
	A_3	0,2162	0,1673	0,0988	0,3536
KISELA MACERACIJA	A_1	0,1029	0,1401	0,1130	0,1139
	A_2	0,0894	0,1336	0,0886	0,1166
	A_3	0,0862	0,1324	0,0894	0,1154

Tablica 5. Koncentracije ispitivanih uzoraka dobivene ekstrapolacijom iz baždarnog pravca kvercetina

Metoda ekstrakcije	Konc. (μg/ml)	*G. alypum*	*G. cordifolia*	*G. meridionalis*	*G. punctata*
DEKOKCIJA	c_1	15,71	15,77	19,73	29,41
	c_2	14,81	16,31	19,41	29,12
	c_3	14,47	16,13	19,22	29,11
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	c_1	7,41	9,06	15,00	17,08
	c_2	7,39	9,12	14,66	17,28
	c_3	7,39	9,25	15,03	16,06
MACERACIJA	c_1	10,50	7,58	4,96	15,67
	c_2	11,00	8,04	5,26	16,11
	c_3	9,80	7,73	4,83	15,62
KISELA MACERACIJA	c_1	5,00	6,58	5,43	5,47
	c_2	4,43	6,30	4,39	5,58
	c_3	4,29	6,25	4,43	5,53

Ispitivani uzorci bili su razrijeđeni metanolom u omjeru 1:20, pa se vrijednosti koncentracija iz Tablice 5. moraju pomnožiti s 20.

$$c' = c*20$$

Miligram ekvivalenti standarda kvercetina po gramu suhog biljnog materijala dobiveni su preko sljedeće formule:

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

c' – koncentracija ispitivanog uzorka prije razrijeđenja (μg/ml)

V – volumen otopine u kojoj je pripremljen uzorak (10 ml)

0,001 – faktor pretvorbe μg u mg

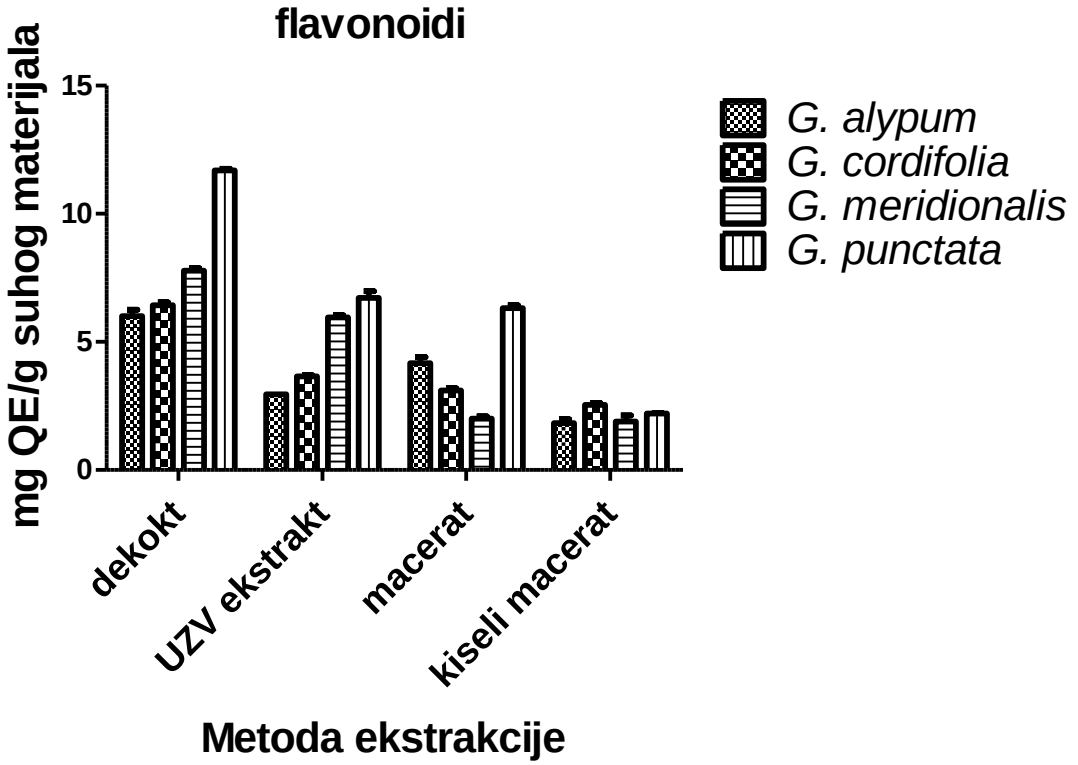
m – masa ispitivanog biljnog materijala (0,5 g)

Ova formula primjenjuje se za sva 3 mjerenja te se potom izračuna aritmetička vrijednost za svaki uzorak:

$$w = (w_1 + w_2 + w_3)/3$$

Tablica 6. Miligram ekvivalenti kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

Metoda ekstrakcije	***G. alypum***	***G. cordifolia***	***G. meridionalis***	***G. punctata***
DEKOKCIJA	6,00 ± 0,26	6,43 ± 0,11	7,78 ± 0,10	11,69 ± 0,07
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	2,96 ± 0,00	3,66 ± 0,04	5,96 ± 0,08	6,72 ± 0,26
MACERACIJA	4,17 ± 0,24	3,11 ± 0,09	2,01 ± 0,09	6,32 ± 0,11
KISELA MACERACIJA	1,83 ± 0,15	2,55 ± 0,07	1,90 ± 0,23	2,21 ± 0,02



Slika 12. Usporedba sadržaja flavonoida u različitim vrstama roda *Globularia* ovisno o metodi ekstrakcije

Dobiveni rezultati pokazuju da je najveća količina flavonoida prisutna u uzorcima koji su pripremljeni dekokcijom. Ona je kod vrste *G. punctata* bila najveća i iznosila je 11,69 ± 0,07 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala. Od ekstrakata dobivenih dekokcijom, najmanju količinu flavonoida imala je vrsta *G. alypum* (6,00 ± 0,26 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala).

Najmanja količina flavonoida prisutna je u uzorcima koji su ekstrahirani kiselom maceracijom. Najmanji sadržaj flavonoida imala je vrsta *G. alypum* (1,83 ± 0,15 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala).

Uspoređujući rezultate svih metoda ekstrakcije, pokazalo se da je *G. punctata* najbogatija flavonoidima.

Dekokcijom su dobiveni najbolji rezultati, što je moguće povezati s povišenom temperaturom pri kojoj se ekstrakcija provodi. Porast temperature može povećati topljivost analita te smanjiti viskoznost i površinsku napetost otapala, što olakšava njegovo prodiranje u uzorak te tako pospješuje ekstrakciju (Dai i Mumper, 2010). Također, povišenje temperature može

dovesti do hidrolize glikoziliranih flavonoida (Rohn i sur., 2007), pa veća količina može reagirati s $AlCl_3$ (Denni i Mammen, 2012). Kiselom maceracijom dobiveni su najlošiji rezultati jer postoji mogućnost da u jako kiselom pH dolazi do razgradnje nekih flavonoida.

Od istraživanih vrsta roda *Globularia, G. alypum* najbolje je istražena. U ovom radu za *G. alypum* najveća količina flavonoida ekstrahirana je dekokcijom i iznosi 6,00 ± 0,26 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala. U istraživanju Khlifija i suradnika, ekstrahirana količina flavonoida (48-satna Soxhlet ekstrakcija na 65 °C) iznosila je 18,20 ± 0,25 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta (Khlifi i sur., 2011). Rezultat Djeridanea i suradnika dobiven analizom 70%-tnog etanolnog ekstrakta vrste *G. alypum* pripremljenog 24-satnom maceracijom iznosio je 4,54 mg ekvivalenta rutina/g suhog biljnog materijala (Djeridane i sur., 2006), dok je u istraživanju Chogranija i suradnika sadržaj flavonoida iznosio 3,63 ± 4,72 mg ekvivalenta rutina/g suhog materijala u 80%-tnim metanolnim ekstraktima pripremljenim maceracijom (Chograni i sur., 2012). Količina flavonoida u ekstraktu *G. alypum* dobivenom maceracijom u ovom je istraživanju iznosila 4,17 ± 0,24 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala.

Za određivanje ukupnih flavonoida korištena je modificirana kolorimetrijska metoda s $AlCl_3$. Prednosti ove metode su te što se smatra brzom i jeftinom metodom, koja umanjuju potrebu za individualnim standardima za određivanje flavonoida te je stoga široko prihvaćena (Denni i Mammen, 2012). Nedostatak ove metode može biti taj što u biljkama flavoni i flavonoli mogu postojati u obliku glikozida, a prisutnost šećerne skupine ugrožava ispravnu kelataciju s $AlCl_3$. Bilo koja blokada hidroksilnih skupina glikozilacijom, čak i metoksilacijom na pozicijama 3, 5, 3` ili 4` sprječava kelataciju s $AlCl_3$. (Chang i sur., 2002).

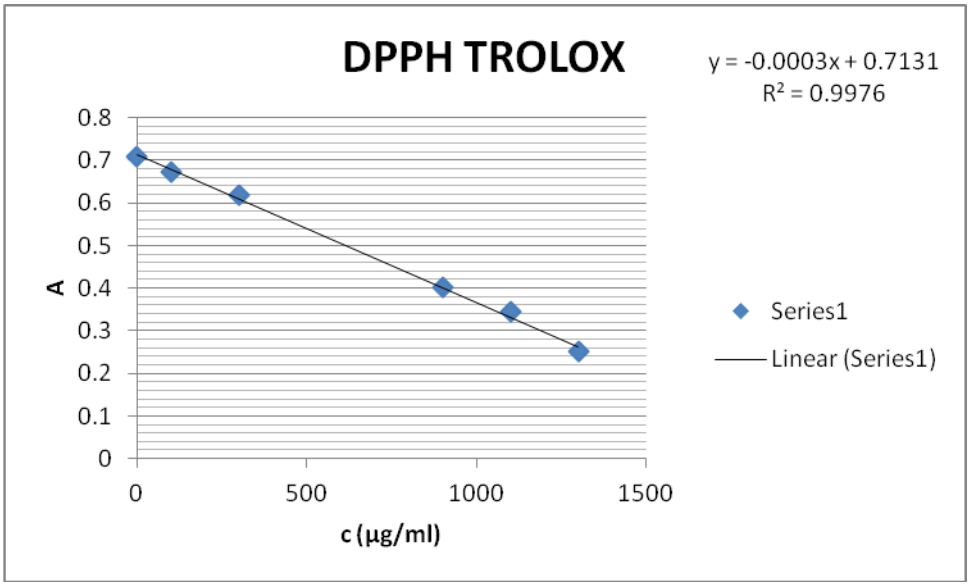
4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA *IN VITRO*

Vrijednosti antioksidativnog učinka određene su pomoću baždarnog pravca Troloxa (Slika 13) i baždarnog pravca galne kiseline (Slika 14).

4.2.1. Baždarni pravac Troloxa

Tablica 7. Koncentracije i izmjerene apsorbancije Troloxa u reakciji s DPPH reagensom

Koncentracija (µg/ml)	**Apsorbancija**
0	0,7081
100	0.,6731
300	0,6195
900	0,4019
1100	0,3434
1300	0,2504
1500	0,2434

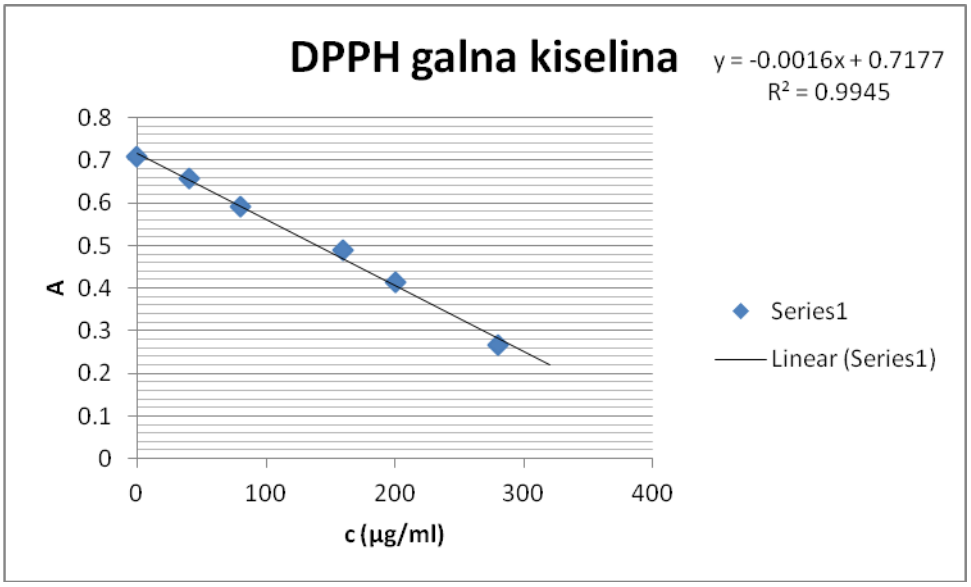


Slika 13. Baždarni pravac Troloxa

4.2.2. Baždarni pravac galne kiseline

Tablica 8. Koncentracije i izmjerene apsorbancije galne kiseline u reakciji s DPPH reagensom

Koncentracija (µg/ml)	**Apsorbancija**
0	0,7081
40	0,6573
80	0,5906
160	0,4879
200	0,4138
280	0,2671



Slika 14. Baždarni pravac galne kiseline

4.2.3. DPPH test

Sva mjerenja rađena su u triplikatu. Uzorcima je mjerena apsorbancija te se iz baždarnog pravca Troloxa i galne kiseline očitavala odgovarajuća koncentracija.

Tablica 9. Apsorbancije ispitivanih uzoraka dobivenih različitim metodama ekstrakcije u reakciji s DPPH reagensom

Metoda ekstrakcije	Aps.	***G. alypum***	***G. cordifolia***	***G. meridionalis***	***G. punctata***
DEKOKCIJA	A_1	0,6220	0,6154	0,5327	0,5772
	A_2	0,5943	0,5926	0,5812	0,5853
	A_3	0,5882	0,6061	0,5576	0,5827
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	A_1	0,6373	0,6429	0,6157	0,6241
	A_2	0,6173	0,6454	0,6160	0,6364
	A_3	0,6356	0,6357	0,6180	0,6338
MACERACIJA	A_1	0,6136	0,6526	0,6592	0,6472
	A_2	0,6108	0,6475	0,6674	0,6482
	A_3	0,6234	0,6568	0,6678	0,6405

Tablica 10. Koncentracije ispitivanih uzoraka dobivene ekstrapolacijom iz baždarnog pravca Troloxa

Način ekstrakcije	Konc. (μg/ml)	*G. alypum*	*G. cordifolia*	*G. meridionalis*	*G. punctata*
DEKOKCIJA	c_1	303,67	325,67	601,33	453,00
	c_2	396,00	401,67	439,67	426,00
	c_3	416,33	356,67	518,33	434,67
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	c_1	252,67	234,00	324,67	296,67
	c_2	319,33	225,67	323,67	255,67
	c_3	258,33	258,00	317,00	264,33
MACERACIJA	c_1	331,67	201,67	179,67	219,67
	c_2	341,00	218,67	152,33	216,33
	c_3	299,00	189,00	151,00	242,00

Tablica 11. Koncentracije ispitivanih uzoraka dobivene ekstrapolacijom iz baždarnog pravca galne kiseline

Način ekstrakcije	Konc. (μg/ml)	*G. alypum*	*G. cordifolia*	*G. meridionalis*	*G. punctata*
DEKOKCIJA	c_1	59,81	63,94	115,63	87,81
	c_2	77,13	78,19	85,31	82,75
	c_3	80,94	69,75	100,06	84,38
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	c_1	50,25	46,75	63,75	58,50
	c_2	62,75	45,19	63,56	50,81
	c_3	51,31	51,25	62,31	52,44
MACERACIJA	c_1	65,06	40,69	36,56	44,06
	c_2	66,81	43,88	31,44	43,44
	c_3	58,94	38,31	31,19	48,25

Ispitivani uzorci bili su razrijeđeni metanolom u omjeru 1:5, pa se dobivene vrijednosti koncentracija iz tablica 10 i 11 moraju pomnožiti s 5.

$$c' = c*5$$

Potrebno je izračunati miligrame ekvivalenta Troloxa/galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala:

$$w = c'*V*0.001/m$$

c' – koncentracija ispitivanog uzorka prije razrijeđenja (μg/ml)

V – volumen otopine u kojoj je pripremljen uzorak (10 ml)

0,001 – faktor pretvorbe μg u mg

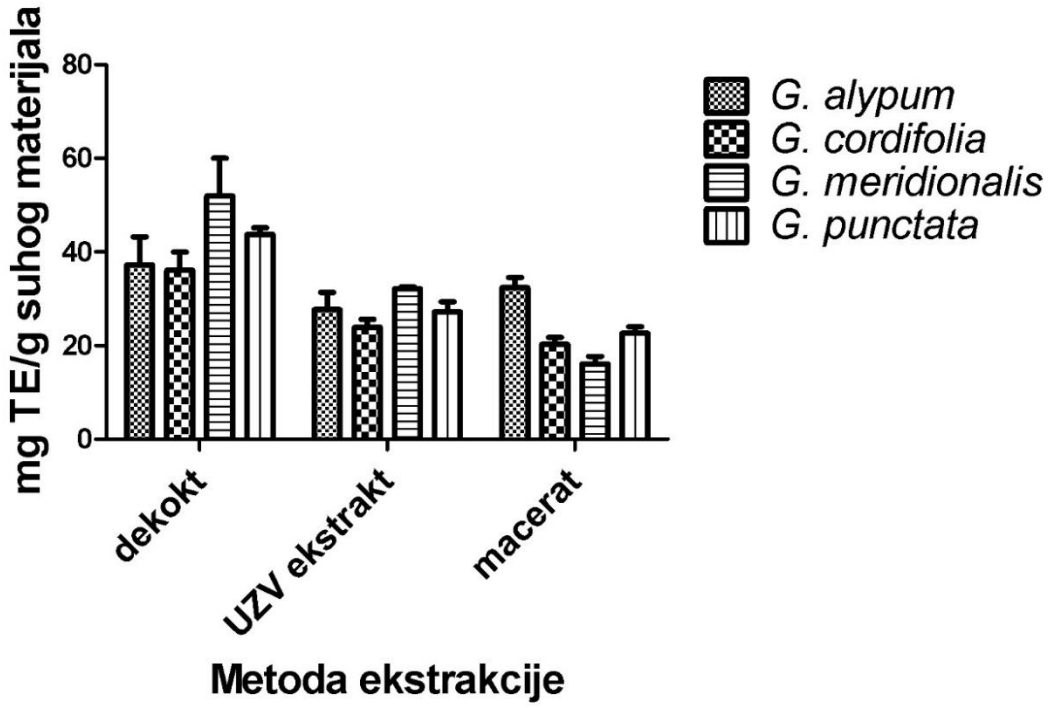
m – masa ispitivanog biljnog materijala (0,5 g)

Ova formula primjenjuje se za sva 3 mjerenja te se potom izračuna aritmetička vrijednost za svaki uzorak:

$$w = (w_1 + w_2 + w_3)/3$$

Tablica 12. Miligram ekvivalenti Troloxa po gramu suhog biljnog materijala (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

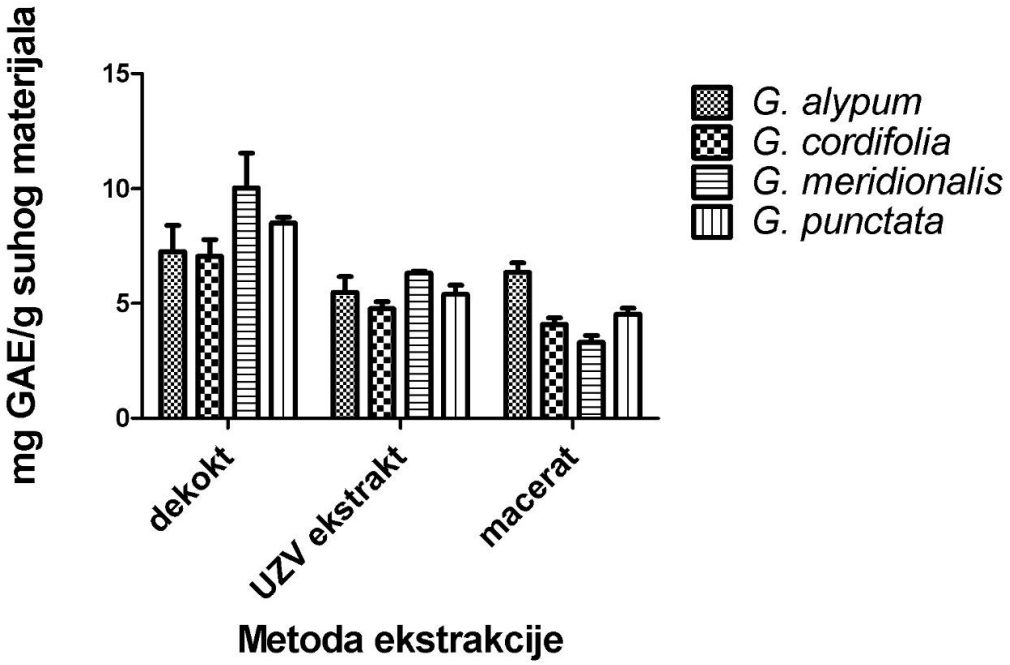
Način ekstrakcije	***G. alypum***	***G. cordifolia***	***G. meridionalis***	***G. punctata***
DEKOKCIJA	37,20 ± 6,00	36,13 ± 3,82	51,98 ± 8,08	43,79 ± 1,38
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	27,68 ± 3,70	23,92 ± 1,68	32,18 ± 0,42	27,22 ± 2,16
MACERACIJA	32,39 ± 2,21	20,31 ± 1,49	16,10 ± 1,62	22,60 ± 1,40



Slika 15. Usporedba antioksidativnog učinka izraženog kao mg ekvivalenta Troloxa/g suhog materijala različitih vrsta roda *Globularia* ovisno o metodi ekstrakcije

Tablica 13. Miligram ekvivalenti galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

Način ekstrakcije	***G. alypum***	***G. cordifolia***	***G. meridionalis***	***G. punctata***
DEKOKCIJA	7,26 ± 1,13	7,06 ± 0,72	10,03 ± 1,52	8,50 ± 0,26
ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	5,48 ± 0,69	4,77 ± 0,31	6,32 ± 0,08	5,39 ± 0,41
MACERACIJA	6,36 ± 0,41	4,10 ± 0,28	3,31 ± 0,30	4,53 ± 0,26



Slika 16. Usporedba antioksidativnog učinka izraženog kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog materijala različitih vrsta roda *Globularia* ovisno o metodi ekstrakcije

Rezultati pokazuju da najveći antioksidativni učinak imaju ekstrakti dobiveni dekokcijom. Najveći antioksidativni učinak imao je dekokt vrste *G. meridionalis* (51,98 ± 8,08 mg ekvivalenta Troloxa/g suhog biljnog materijala; 10,03 ± 1,52 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala), a najmanji dekokt vrste *G. cordifolia* (36,13 ± 3,82 mg ekvivalenta Troloxa/g suhog biljnog materijala; 7,06 ± 0,72 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala). Najmanji antioksidativni učinak ekstrakta *G. alypum* primijećen je kod uzorka

pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom (27,68 ± 3,70 mg ekvivalenta Troloxa/g suhog biljnog materijala; 5,48 ± 0,69 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala), dok je kod ekstrakata *G. cordifolia*, *G. meridionalis i G. punctata* najmanji antioksidativni učinak primijećen kod uzoraka dobivenih maceracijom (20,31 ± 1,49, 16,10 ± 1,62, 22,60 ± 1,40 mg ekvivalenta Troloxa/g suhog biljnog materijala, tj. 4,10 ± 0,28, 3,31 ± 0,30, 4,53 ± 0,26 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala). Ekstrakti vrste *G. meridionalis* pokazali su najveću antioksidativnu aktivnost u metodi dekokcije i ultrazvučne ekstrakcije, dok u metodi maceracije pokazuju najmanju antioksidativnu aktivnost. Najveću antioksidativnu aktivnost kod uzoraka pripremljenih maceracijom imali su ekstrakti vrste *G. alypum*.

Uspoređujući antioksidativni učinak standarda galne kiseline i Troloxa, galna kiselina ima bolji antioksidativni učinak jer je za isti antioksidativni učinak potrebna manja masa galne kiseline.

Između sadržaja flavonoida i rezultata DPPH testa uočena je dobra pozitivna povezanost ($r = 0,74$), koja je bila statistički značajna ($p < 0,05$). U račun nisu uključene vrijednosti dobivene za kiselu maceraciju jer su ekstrakti pripremljeni ovom metodom s DPPH reagensom davali neočekivano niske vrijednosti apsorbancije. Naknadno je utvrđeno da je DPPH reagens osjetljiv na kiselinu i u kiselom pH se raspada (Shalaby i Shanab, 2013). Khlifi i suradnici dobili su nešto višu povezanost između sadržaja flavonoida i antioksidativnog učinka, a iznosila je 0,91 (Khlifi i sur., 2011).

G. meridionalis pokazala je najveću antioksidativnu aktivnost, iako je *G. punctata* najbogatija flavonoidima. Razlog tome može biti razlika u strukturi flavonoida koje pojedine vrste sadrže jer je poznato da ona utječe na njihovu antioksidativnu aktivnost (Rice-Evans i sur., 1996).

Antioksidativni učinak *in vivo* može se određivati mjerenjem antioksidativnog učinka u plazmi nakon uzimanja hrane bogate flavonoidima. Za razliku od *in vitro* određivanja, *in vivo* određivanje antioksidativnog učinka flavonoida se puno manje koristi u istraživanjima zbog ograničenog znanja o farmakokinetici flavonoida (Pietta, 2000).

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da bi se dekokt vrste *G. meridionalis* mogao koristiti kao dobar izvor spojeva koji djeluju antioksidativno. Potrebno je dalje istražiti njena ljekovita svojstva i mogućnost primjene u medicinske svrhe.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitivan je sadržaj flavonoida i antioksidativni učinak *in vitro* metanolnih ekstrakata vrsta *Globularia alypum, G. cordifolia, G. meridionalis i G. punctata.* Korištene su četiri metode ekstrakcije: dekokcija, ultrazvučna ekstrakcija, maceracija i kisela maceracija.

Uzorci pripremljeni dekokcijom sadržavali su najveću količinu flavonoida. Uspoređujući rezultate svih metoda ekstrakcija, pokazalo se da je vrsta *G. punctata* najbogatija flavonoidima.

Najveći antioksidativni učinak također su pokazali ekstrakti dobiveni dekokcijom, a od ekstrakata pripremljenih na taj način najveći antioksidativni učinak imao je dekokt vrste *G. meridionalis.*

6. LITERATURA

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 2002, 10, 178-182.

Chograni H, Riahi L, Zaouali Y, Boussaid M. Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Afr J Ecol*, 2012, 51, 343-347.

Dai J, Mumper R. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, 15, 7313-7352.

Denni M, Mammen D. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem,* 2012, 135, 1365-1368.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 2006, 97, 654–660.

Globularia alypum, *Globularia cordifolia*, *Globularia meridionalis*, luirig.altervista.org, pristupljeno 25.09.2015.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 2002, 13, 572-584.

Kadereit JW. The families and genera of vascular plants. Springer, 2004, str. 159-161.

Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol,* 2004, 55, 279-290.

Khlifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard JP, Coudere F, Bouajila J. Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves. *Molecules*, 2011, 16, 10592-10603.

Kothari V, Gupta A, Naraniwal M. Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *J Nat Rem*, 2012, 12, 162-173.

Kušan F. Folia Alypi i vrste roda *Globularia* u Hrvatskoj. *Vjestnik ljekarnika*, 1943, 29-32.

Maceracija i dekokcija, http://www.medicinalplants-pharmacognosy.com/, pristupljeno 01.10.2015.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 2004, 26, 211-219.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 2000, 63, 1035-1042.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic BiolMed*, 1996, 20, 933-956.

Rohn S, Buchner N, Driemel G, Rauser M, Kroh LW. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 1568-1573.

Sanchez-Moreno C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int*, 2002, 8, 121-137.

Shalabi EA, Shanab SMM. Comparation of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extract of *Spirulina platensis. Indian J Geo-Mar Sci*, 2013, 42, 556-564.

Šugar I. Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske. Zagreb, Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša, 1994, str. 231-232.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentina DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europaea Vol. 3. Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 282-283.

Vrste roda *Globularia*, hirc.botanic.hr, pristupljeno 25.09.2015.

Yingngam B, Monschein M, Brantner A. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* leaves using central composite desing and evaluation of its protective ability against H_2O_2-induced cell death. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7, 497-505.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Vrste roda *Globularia* bogat su izvor polifenolnih spojeva kojima pripadaju i flavonoidi. Poznato je da oni imaju antioksidativni učinak koji je odgovoran za prevenciju različitih bolesti poput tumora i kardiovaskularnih bolesti. U okviru ovog rada uspoređen je sadržaj flavonoida te antioksidativni učinak *in vitro* u različitim vrstama roda *Globularia*: *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis i G. punctata.* Pri tome su za pripremu uzoraka korištene četiri različite metode ekstrakcije: dekokcija, ultrazvučna ekstrakcija, maceracija i kisela maceracija. Sadržaj flavonoida određen je kolorimetrijskom metodom s $AlCl_3$, gdje je kvercetin korišten kao standard. Antioksidativni učinak određen je DPPH testom, gdje su kao standardi korišteni Trolox i galna kiselina.

Dobiveni rezultati pokazuju da je najveća količina flavonoida prisutna u uzorcima koji su pripremljeni dekokcijom. Ona je bila najveća u uzorcima vrste *G. punctata* (11,69 ± 0,07 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala). Uspoređujući rezultate svih metoda ekstrakcija, pokazalo se da je uzorak vrste *G. punctata* najbogatiji flavonoidima.

Rezultati DPPH testa pokazuju da najveći antioksidativni učinak imaju ekstrakti dobiveni dekokcijom. Najveći antioksidativni učinak imao je dekokt vrste *G. meridionalis* (51,98 ± 8,08 mg ekvivalenta Troloxa/g suhog biljnog materijala; 10,03 ± 1,52 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala). Ekstrakti vrste *G. meridionalis* pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom također su pokazali najveću antioksidativnu aktivnost u usporedbi s ekstraktima ostalih vrsta pripremljenima istom metodom, dok su u metodi maceracije pokazali najmanju antioksidativnu aktivnost. Najveću antioksidativnu aktivnost kod uzoraka pripremljenih maceracijom imao je ekstrakt vrste *G. alypum*.

7.2. SUMMARY

Species of the genus *Globularia* are a rich source of polyphenolic compounds, to which flavonoids also belong. It is known that these compounds have an antioxidative effect responsible for prevention of various diseases such as cancer and cardiovascular diseases. In this thesis, flavonoid content and antioxidative effect *in vitro* of different species from the genus *Globularia*: *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis* and *G. punctata* were compared. Therefore, four different extraction methods were used for the preparation of samples: decoction, ultrasound extraction, maceration and acid maceration. Flavonoid content was determined with aluminium chloride colorimetric method, where quercetin served as the standard substance. Antioxidative effect was determined by using the DPPH test, where the standard substances used were Trolox and gallic acid.

Obtained results show that the highest flavonoid content is present in samples that were prepared by decoction. Flavonoid content was highest in *G. punctata* (11.69 ± 0.07 mg quercetin equivalent/g dry plant material). By comparing the results of all extraction methods, it was noticed that *G. punctata* was richest in flavonoids.

The results of the DPPH test show that extracts obtained by decoction have the highest antioxidative effect. Decoct of *G. meridionalis* had the highest antioxidative effect (51.98 ± 8.08 mg Trolox equivalent/g dry plant material; 10.03 ± 1.52 mg gallic acid equivalent/g dry plant material). Extracts of *G. meridionalis* prepared by ultrasound extraction also showed the highest antioxidant effect in comparison to extracts of other species prepared with the same method, while in the method of maceration they have shown lowest antioxidative effect. The highest antioxidative effect of samples prepared by maceration was observed for *G. alypum* extract.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za Farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Sadržaj flavonoida i antioksidativni učinak *in vitro* vrsta roda *Globularia*

Mateja Lukežić

SAŽETAK

Vrste roda *Globularia* bogat su izvor polifenolnih spojeva kojima pripadaju i flavonoidi. Poznato je da oni imaju antioksidativni učinak koji je odgovoran za prevenciju različitih bolesti poput tumora i kardiovaskularnih bolesti. U okviru ovog rada uspoređen je sadržaj flavonoida te antioksidativni učinak *in vitro* u različitim vrstama roda *Globularia*: *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis i G. punctata.* Pri tome su za pripremu uzoraka korištene četiri različite metode ekstrakcije: dekokcija, ultrazvučna ekstrakcija, maceracija i kisela maceracija. Sadržaj flavonoida određen je kolorimetrijskom metodom s $AlCl_3$, gdje je kvercetin korišten kao standard. Antioksidativni učinak određen je DPPH testom, gdje su kao standardi korišteni Trolox i galna kiselina.
Dobiveni rezultati pokazuju da je najveća količina flavonoida prisutna u uzorcima koji su pripremljeni dekokcijom. Ona je bila najveća kod vrste *G. punctata* (11,69 ± 0,07 mg ekvivalenta kvercetina/g suhog biljnog materijala). Uspoređujući rezultate svih metoda ekstrakcija, pokazalo se da je *G. punctata* bila najbogatija flavonoidima.
Rezultati DPPH testa pokazuju da najveći antioksidativni učinak imaju ekstrakti dobiveni dekokcijom. Najveći antioksidativni učinak imao je dekokt vrste *G. meridionalis* (51,98 ± 8,08 mg ekvivalenta Troloxa/g suhog biljnog materijala; 10,03 ± 1,52 mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog biljnog materijala). Ekstrakti vrste *G. meridionalis* pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom također su pokazali najveću antioksidativnu aktivnost u usporedbi s ekstraktima ostalih vrsta pripremljenima istom metodom, dok su u metodi maceracije pokazali najmanju antioksidativnu aktivnost. Najveću antioksidativnu aktivnost kod uzoraka pripremljenih maceracijom imao je ekstrakt vrste *G. alypum*.

Rad sadrži: 49 stranica, 16 slika, 13 tablica i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Globularia*, sadržaj flavonoida, antioksidativni učinak, DPPH

Mentor: **Dr. sc. Kroata Hazler Pilepić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Kroata Hazler Pilepić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Željan Maleš, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: listopad 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Flavonoid content and antioxidative effect *in vitro* of species from the *Globularia* genus

Mateja Lukežić

SUMMARY

Species of the genus *Globularia* are a rich source of polyphenolic compounds, to which flavonoids also belong. It is known that these compounds have an antioxidative effect responsible for prevention of various diseases such as cancer and cardiovascular diseases. In this thesis, flavonoid content and antioxidative effect *in vitro* of different species from the genus *Globularia*: *G. alypum, G. cordifolia, G. meridionalis* and *G. punctata* were compared. Therefore, four different extraction methods were used for the preparation of samples: decoction, ultrasound extraction, maceration and acid maceration. Flavonoid content was determined with aluminium chloride colorimetric method, where quercetin served as the standard substance. Antioxidative effect was determined by using the DPPH test, where the standard substances used were Trolox and gallic acid.
Obtained results show that the highest flavonoid content is present in samples that were prepared by decoction. Flavonoid content was highest in *G. punctata* (11.69 ± 0.07 mg quercetin equivalent/g dry plant material). By comparing the results of all extraction methods, it was noticed that *G. punctata* was richest in flavonoids.
The results of the DPPH test show that extracts obtained by decoction have the highest antioxidative effect. Decoct of *G. meridionalis* had the highest antioxidative effect (51.98 ± 8.08 mg Trolox equivalent/g dry plant material; 10.03 ± 1.52 mg gallic acid equivalent/g dry plant material). Extracts of *G. meridionalis* prepared by ultrasound extraction also showed the highest antioxidant effect in comparison to extracts of other species prepared with the same method, while in the method of maceration they have shown lowest antioxidative effect. The highest antioxidative effect of samples prepared by maceration was observed for *G. alypum* extract.

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

Thesis includes: 49 pages, 16 figures, 13 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Globularia*, flavonoid content, antioxidative effect, DPPH

Mentor: **Kroata Hazler Pilepić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Kroata Hazler Pilepić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željan Maleš, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Renata Jurišić Grubešić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October 2015.