

Antioksidacijski učinak i HPLC analiza listova planike – *Arbutus unedo* L.*

ŽELJAN MALEŠ¹, PETRA FABIJANČIĆ¹, APURBA BARMAN²,
IVAN GREGOV³, MIRZA BOJIĆ²

¹Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

²Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku kemiju, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

³Ljekarne Prima Pharme, Capraška 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Antioxidant capacity and HPLC analysis of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves

A b s t r a c t – Some of the major constituents of strawberry tree are flavonoids and phenolic acids that are responsible for some of the pharmacological activities i.e. adstringent, antihypertensive, antidiarrheal and antibacterial. Objective of this work was to determine flavonoid aglycones and phenolic acids in strawberry tree leaves collected during 12 months of 2013 using RP-HPLC-DAD and assess antioxidant activity using ABTS stable free radical. Antioxidant activity of strawberry tree leaves varied between 11 % and 28 %. The content of individual polyphenols was: chlorogenic acid 0.8 to 6.5 mg/g, caffeic acid 0.6–1.0 mg/g, p-coumaric acid 0.2–6.6 mg/g and quercetin 0.5–10.7 mg/g. The highest content of polyphenols was during winter months. Compared to the thin-layer chromatography analysis we have determined presence of additional phenolic acids (caffeic and p-coumaric) and quercetin – aglycone of quercitrin, isoquercitrin and hyperoside.

¹University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Botany, Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia, ²University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Medicinal Chemistry, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia and ³Pharmacies Prima Pharme, Capraška 1, 10000 Zagreb, Croatia)

* Dio rezultata ovog rada predstavljen je u okviru 5. hrvatskog kongresa farmacije s međunarodnim sudjelovanjem, Rovinj, 21.–24. svibnja 2015.

UVOD

Planika, *Arbutus unedo*, L. je vazdazeleni grm iz porodice Ericaceae rasprostranjen u području europskog Sredozemlja, sjevernog dijela Maroka, Alžira i Tunisa te južnoj Irskoj (1). U Hrvatskoj planika je rasprostranjena u cijelom obalnom području.

Listovi su usko jajastog oblika, pilastog ruba, dugi i široki, smješteni na crvenkastoj, dugačkoj peteljci. Plodovi (maginje) su okrugli, narančastocrveni s ovojnicom sličnom ličiju i pitomim jagodama. Za planiku je karakteristično da u listopadu dozrijevaju plodovi uz istodobnu cvatnju. Iz cvjetova se nakon godinu dana razvijaju plodovi (2).

U pučkoj medicini planika se primjenjuje kao antiseptik, diuretik, laksans te u terapiji arterijske hipertenzije. Biološki učinci listova planike uključuju adstringentno djelovanje i antitrombocitni-antiagregacijski učinak koji se pripisuju visokom sadržaju trjeslovina.

Pojedini dijelovi planike sadrže fenolne kiseline, flavonoide, trjeslovine, masne kiseline, vitamine E i C, β -karoten, triterpene, iridoide, eterično ulje, šećere i organske kiseline (3).

U prethodnim radovima dokazani su (4) i određeni (5) flavonoidni heterozidi, te ester kavene kiseline – klorogenska kiselina tankoslojnom kromatografijom. Svrha ovog istraživanja bila je odrediti antioksidacijski učinak metanolnih ekstrakata listova planike, te potvrditi sadržaj estera i heterozida na aglikonskoj razini obrnuto faznom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u uzorcima skupljenim tijekom 12 mjeseci 2013. godine.

EKSPERIMENTALNI DIO

1. Materijal za istraživanje

Materijal za istraživanje sastojao se od osušenih i usitnjenih listova planike skupljenih tijekom 12 mjeseci 2013. na području Božave (Dugi otok).

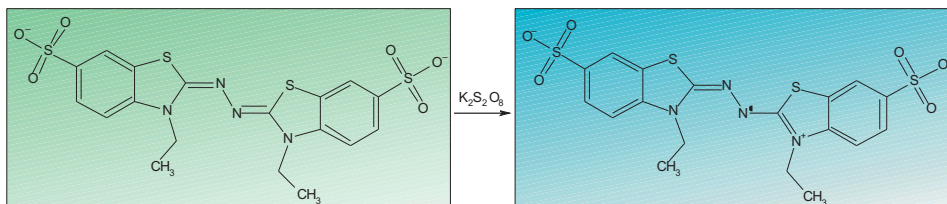
2. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraživane biljne vrste izvršen je u Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih listova (6).

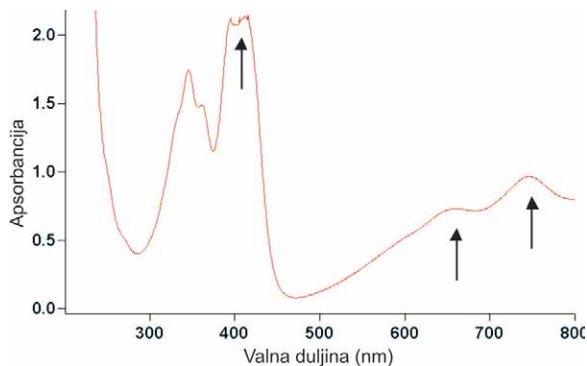
3. Određivanje antioksidacijskog učinka ABTS metodom

Za analizu antioksidacijskog učinka listova planike 1 g osušenog i usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano je s 10 mL metanola, 5 min na vodenoj kupelji pri 60 °C (4). Nakon hlađenja, dobiveni bistri filtrat služio je za ABTS test.

Otopina ABTS radikala priređena je aktivacijom 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) s kalijevim persulfatom (konačna koncentracija radikala 7 mM) (slika 1.). Dekolorizacijski esej proveden je na Cary 50 Bio spektrofotometru (Varian Inc., SAD) na $\lambda = 735$ nm (slika 2.).



Slika 1. Prevođenje ABTS-a u reaktivni oblik slobodnog radikala uz kalijev persulfat praćeno je karakterističnom promjenom boje



Slika 2. Spektar ABTS radikala. Apsorpcijski maksimumi nalaze se na 415, 645 i 735 nm

Rezultat je izražen kao postotak ugašenog slobodnog radikala nakon jedne minute: % ugašenog radikala = $(A_0 - A) / A_0 \times 100$, gdje je A_0 apsorbancija slijepe probe, A apsorbancija nakon dodatka ekstrakta planike (7).

4. HPLC analiza

Za potrebe HPLC analize metanolni ekstrakti su podvrgnuti hidrolizi s klorovodičnom kiselinom ($\text{pH} \approx 1$) tijekom pola sata. Analiza polifenolnih sastavnica provedena je na kromatografu HPLC Agilent 1100 primjenom gradijentne metode za analizu aglikona flavonoida i fenolnih kiselina (8). Odjeljivanje polifenola provedeno je na Zorbax SB-C18 koloni (250 mm \times 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm) uz pretkolonu (12,5 mm \times 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm). Mobilna faza A sadržavala je vodu, metanol i mravlju kiselinu u volumnom omjeru 93:5:2, a mobilna faza B u volumnom omjeru 3:95:2. Elucija je povedena uz protok od 1 mL/min na temperaturi 40 °C prema sljedećem rasporedu gradijenta (t/min , %B): (0, 20), (10, 40),

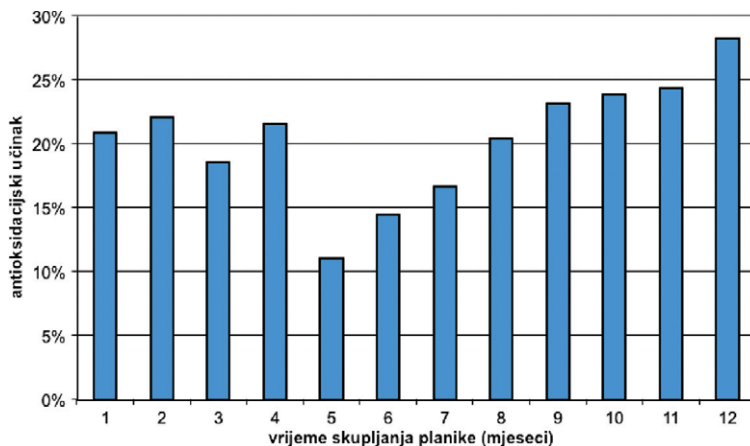
(35, 50), (47, 50), (70, 80), (80, 20). Za praćenje elucije s kolone primijenjen je detektor s nizom dioda (DAD). Dokazivanje je temeljeno na usporedbi sa standardima polifenola – vremenima zadržavanja i UV/Vis spektrima, a određivanje na temelju kalibracijskih krivulja standarda.

5. Analiza podataka

Za statističku analizu i grafičko prikazivanje rezultata primijenjen je program Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, SAD).

REZULTATI I RASPRAVA

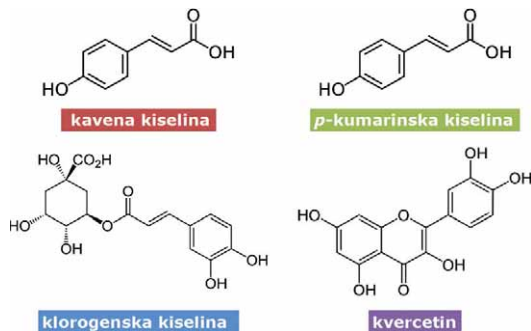
Dobiveni rezultati ABTS testa prikazani su na slici 3. Vrijednosti antioksidacijskog učinka korelirane su s prethodno objavljenim ukupnim sadržajem flavonoida, fenolnih kiselina, ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina (4, 9, 10). Iako su polifenoli farmakološki odgovorne sastavnice za antioksidacijsku aktivnost, ova ovisnost se nije pokazala statistički značajnom. Treba napomenuti da izostanak može biti rezultat i biološke varijabilnosti uzoraka prikupljenih u različitim vremenskim razdobljima.



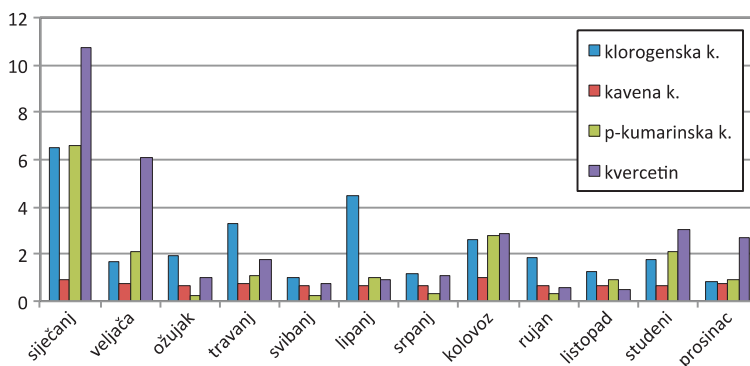
Slika 3. Grafički prikaz kretanja antioksidacijskog učinka metanolnih ekstrakata listova planike tijekom 12 mjeseci 2013. godine

U metanolnim uzorcima listova planike dokazani su klorogenska kiselina i kvercetin. U odnosu na analizu na tankom sloju (5) dokazane su kavena i *p*-kumarinska kiselina (slika 4.).

Sadržaj pojedinih polifenola tijekom 12 mjeseci se kretao između 0,8 i 6,5 mg/g za klorogensku kiselinu, 0,6 i 1,0 mg/g za kavenu kiselinu, 0,2 i 6,6 mg/g za *p*-kumarinsku kiselinu, te 0,5 i 10,7 mg/g za kvercetin. Najveći sadržaj polifenola u listovima planike bio je tijekom zimskih mjeseci (slika 5.).



Slika 4. Strukture dokazanih polifenola



Slika 5. Sadržaj pojedinih polifenola (mg/g) po mjesecima određen obrnuto faznom HPLC-DAD metodom

U usporedbi s rezultatima dobivenim na uzorcima iz 2003. (5), sadržaj pojedinih polifenola je reda veličine dobivenih u ovom radu. Tako je ukupni maksimalni sadržaj kvercitrina, izokvercitrina i hiperozida (2,6 mg/g) reda veličine njihovog aglikona – kvercetina (prosječna vrijednost tijekom 12 mjeseci 2,65 mg/g). Prosječan sadržaj klorogenske kiseline od 2,35 mg/g veći je u odnosu na maksimalni sadržaj određen u uzorcima iz 2003. godine (1,46 mg/g).

Za razliku od jestivog ploda planike koji obiluje derivatima benzojeve kiseline, u listovima se primarno nalaze derivati cimetine kiseline (11). Prisutnost *p*-kumarinske kiseline dokazana je samo u plodovima (12).

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da metanolni ekstrakti listova planike, s područja Božave s Dugog otoka, u svom sastavu sadrže biljne antioksidanse, najviše u zimskim mjesecima. Antioksidacijski učinak metanolnog ekstrakta listova planike tijekom rujna do prosinca kreće se u rasponu od 23,5–28,3 %. HPLC

metodom određen je sadržaj heterozida kvercitrina, izokvercitrina i hiperozida na aglikonskoj razini, te su dodatno određene kavena i *p*-kumarinska kiselina u odnosu na analizu tankoslojnom kromatografijom.

Literatura – References

1. Santiso X, López L, Gilbert KJ, Barreiro R, Whitlock MC, Retuerto R. Patterns of genetic variation within and among populations in *Arbutus unedo* and its relation with selection and evolvability. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 2015; 17:185–192.
2. Šilić Č. Atlas drveća i grmlja. Sarajevo: Svjetlost, 1988.
3. Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules* 2014; 19:15799–15823.
4. Maleš Ž, Plazibat M, Bilušić Vundać V, Žuntar I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm.* 2006; 56:245–250.
5. Maleš Ž, Šarić D, Bojić M. Quantitative Determination of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves of *Arbutus unedo* L. Using Thin Layer Chromatography. *J. Anal. Methods Chem.* 2013; 2013:385473.
6. Domac R. Flora Hrvatske – priručnik za određivanje bilja. II. izdanje. Zagreb: Školska knjiga, 2002.
7. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biol. Med.* 1999; 26:1231–1237.
8. Medić-Šarić M, Rastija V, Bojić M. Recent advances in the application of high performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis. *J. AOAC Int.* 2011; 94:32–42.
9. Maleš Ž, Plazibat M, Gregov I. Određivanje količine fenolnih kiselina u listovima planike – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Farm. Glas.* 2008; 64:1–4.
10. Maleš Ž, Bilušić Vundać V, Plazibat M, Lazić D, Gregov I. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima planike – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Farm. Glas.* 2007; 63:155–161.
11. Ayaz FA, Kucukislamoglu M, Reunanen M. Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits. *J. Food Compos. Anal.* 2000; 13:171–177.
12. Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Carvalho AM, Queiroz MJ, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chem.* 2013; 141:3721–3730.

Primljeno 8. srpnja 2015.