

CCA-157

541.128.363:562.757:542.61.04

## O inhibitorskom djelovanju metanolnog ekstrakta iz lišća prosinca — *Folium mercurialis annua L.*

F. Mihelić

Zavod za kemiju prehrane Farmaceutskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Primljeno 18. listopada 1959.

Istraživano je inhibitorsko djelovanje metanolnog ekstrakta iz lišća prosinca, *Folium Mercurialis annua L. F. Euphorbiaceae*.

Antioksidaciona aktivnost ispitana je u svinjskoj masti, i to uspoređivanjem s Jonolom, koji je upotrebljen kao standard. Utvrđeno je optimalno inhibitorsko djelovanje u koncentraciji od 0,10 g ekstrakta na 10 g masti. U smanjenoj koncentraciji smanjilo se antioksidaciono djelovanje.

Dodavanjem askorbinske kiseline u mast s metanolnim ekstraktom povećava se inhibicija.

Pri ispitivanju kromatografijom na stupcu (na  $Al_2O_3$  anhidr. Brockmann) i na papiru (Whatman papir broj 1), te pri spektrofotometrijskim mjerenjima (Unicam) utvrđeno je, da pročišćeni metanolni ekstrakt nije homogenog sastava, već se sastoji od više komponenata.

U lišću je dokazana nazočnost tvari, koja fluorescira plavom bojom u ultraljubičastom području svijetla. Izolirana sirova kristalinična supstanca podvrgnuta je spektrofotometričkom istraživanju u ultraljubičastom i infracrvenom svijetlu.

Stabilizacija živežnih namirnica (masti i ulja posebice) već se niz godina intenzivno proučava i sa znanstvenog i sa praktičnog aspekta. To je posve razumljivo, jer su masti i ulja ne samo visoko energetske namirnice, već i nosioci biološki aktivnih tvari. Zbog karakterističnog sastava one su, zbog utjecaja kisika i drugih faktora, izvrgnute vrlo brzim promjenama, pa postaju, djelomično ili sasvim, neupotrebljive za prehranu.

Da se uspori stvaranje autooksidacionih procesa, odnosno da se spriječi kvarenje i propadanje masnoća, danas se, uz primjenu klasičnih postupaka stabilizacije, upotrebljava niz inhibitora sintetskog i vegetabilnog podrijetla. Od sintetskih tvari djeluju kao inhibitori fenol, kinon, naftokinon, ortodifenol, paradifenol i mnogi drugi organski spojevi, a od prirodnih tvari pokazuju to djelovanje ulja iz sjemenaka pamučike, sezama, palme i t. d., te ulja iz klica žitarica.

Iz pojedinih prirodnih sirovina izolirane su čiste supstance, ili su pripremljeni različiti ekstrakti s organskim otapalima, koji posjeduju jače ili slabije inhibitorsko djelovanje. Danas je već u mnogim državama zakonom regulirano dodavanje pojedinih sintetskih i prirodnih inhibitora u mast i u druge prehrambene proizvode<sup>1,2,3,4,5,6</sup>.

Eksperimentalni rad na ispitivanju inhibitorskog svojstva lišća prosinca (jedna vrst korova) *Folium Mercurialis annua* nastavak je ispitivanja već prije utvrđene antioksidacione aktivnosti<sup>7</sup>. Taj je rad imao da utvrdi stupanj inhibi-

torskog djelovanja metanolnog ekstrakta iz lišća u svinjskoj masti, te da potanje utvrdi njegov kemijski sastav.

#### EKSPERIMENTALNI DIO I REZULTATI

Za istraživanje je upotrebljeno suho lišće smrvljeno u sitan prašak. Iscrpljivanje je vršeno u staklenoj cijevi s apsolutnim metanolom, etanolom (96%) i petrol eterom (0,660—0,680) tako dugo, dok nije prokapavalo potpuno bezbojno otapalo. Metanolni ekstrakt uparen je u vakuumu (50° i 16 mm Hg) do guste konzistencije (1/3 početne količine), pročišćavan petrol-eterom, te ponovno uparen.

Od metanolnog ekstrakta pročišćavanog petrol-eterom (MeE) uzeto je 0,005, 0,05 i 0,1 grama na 10 grama svježe masti u Petrijevoj zdjelici, dobro promiješano, te izvrgnuto u termostatu 24 sata utjecaju temperature od 98°.

Paralelno su izvedeni pokusi s uzorkom čiste svinjske masti i s uzorkom masti u koju je dodan Jonol (2,6-di-terc. butil-4-metil-fenol)<sup>9,10</sup> u istim koncentracijama. Ti su uzorci služili kao standard za utvrđivanje stupnja antioksidacione aktivnosti MeE. Inhibitorsko djelovanje utvrđeno je određivanjem količine peroksida po Lea-u<sup>8</sup>.

Pročišćeni metanolni ekstrakt podvrgnut je kromatografskom ispitivanju na aluminijevu oksidu. Metanolni eluatj odijeljeni su na frakcije od po 10 ml, a zatim je određena apsorpcija u UV svijetlu.

S 5%-tnim vodenim ekstraktom lišća, uz dodatak i bez dodatka *N* solne kiseline, te s pročišćenim 5%-tnim metanolnim ekstraktom izvedeni su pokusi pomoću kromatografije na papiru u smjesi butanol—octena kiselina—voda u omjeru 4:1:5. Izvršen je pokušaj da se izolira kristalinična supstanca.

Iscrpljivanje usitnjenog lišća organskim otapalima dalo je ove vrijednosti: 30,6% metanolnog, 18,3% etanolnog i 4,0% petrol-eterskog ekstrakta. Paralelnim istraživanjem dobivenih ekstrakta (0,1 g ekstrakta na 10 g masti) utvrđeno je, da je najjače inhibitorsko djelovanje pokazao metanolni ekstrakt. Zato je on i dalje služio kao predmet istraživanja. Peroksidni broj bio je: kod metanolnog ekstrakta 1,5, kod etanolnog ekstrakta 3,0, a kod petrol-eterskog ekstrakta 3,5.

TABLICA I — TABLE I

*Peroksidni brojevi pročišćena metanolnog ekstrakta, u različitim koncentracijama, u masti kod 98°*

*Peroxides numbers of purified methanol extract in different concentrations in lard at 98°*

	odmah immediately	Peroksidni broj Peroxide number				
		nakon satj after hours				
		10	14	22	32	38
Čista mast Pure lard	1,5	29,0	46,0	71,5	90,5	100,0
+Jonol 0,1:10		1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
+MeE 0,1:10		3,0	3,0	4,5	8,8	12,0
+MeE+as. kis. +as. ac. 0,1:0,1:10		1,0	1,0	1,0	1,5	1,5
+Jonol 0,05:10		1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
+MeE 0,05:10		3,0	3,5	4,8	19,0	40,0
+MeE+as. kis. +as. ac. 0,05:0,05:10		1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
+Jonol 0,005:10		1,5	1,5	1,5		1,5
+MeE 0,005:10		11,5	25,5	62,5		64,5

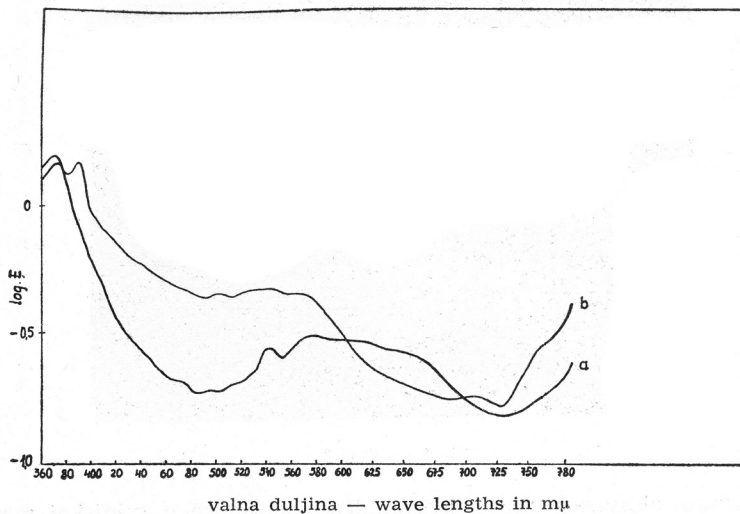
Rezultati pokusa s obzirom na inhibitorско djelovanje pročišćena metanolnog ekstrakta prikazani su u tablici I.

Autooksidacione reakcije u masti s MeE usporene su u različitom stupnju, već prema tome u kojoj je koncentraciji MeE bio dodan.

Inhibitorsko djelovanje MeE najjače je u koncentraciji 0,1:10 grama masti (u usporedbi s čistom masti). U smanjenoj koncentraciji dodanog ekstrakta 0,05 grama na 10 grama masti smanjeno je i inhibitorsko djelovanje, osobito u drugom razdoblju pokusa; ono je ipak još uvijek vidljivo. U još jače smanjenoj koncentraciji od 0,005 na 10 grama masti antioksidaciona je aktivnost smanjena, kad se uspoređi s uzorkom jonola i čiste masti.

Doda li se askorbinske kiseline u istim koncentracijama, inhibitorsko je djelovanje MeE pojačano; po intenzitetu ono je jednako djelovanju jonola.

Podaci dobiveni mjerenjem apsorpcije 22 metanolne frakcije u UV području svijetla od 240 do 350 m $\mu$  pokazuju, da je nazočno više komponenata. To je u skladu s činjenicom, da metanolni ekstrakt nije kemijski definiran (biljka sadrži amina, gorkih i pigmentnih tvari, boje, eterskog ulja)<sup>13,14,15</sup>, već da je to smjesa različitih komponenata.



Sl. 1. — Fig. 1

Apsorpcioni spektar plavo obojene komponente (a) — Absorption spectrum of blue components (a)

Apsorpcioni spektar crveno obojene komponente (b) — Absorption spectrum of red components (b)

Rezultati mjerenja apsorpcije u UV svijetlu uzoraka čiste masti i masti s MeE (0,4 g ekstrakta na 20 g masti, i prije i poslije izvrđavanja utjecaju povišene temperature od 98°), otopljenih u petrol-eteru, pokazuju, da je — usporedno s povećanom peroksidnom vrijednošću — povećana i apsorpcija. To se može — prema rezultatima istraživanja W. O. Lundberga<sup>11,12</sup> — pripisati reakcijama razgradnje i polimerizacije peroksida. Povećanje je vidljivo u uzorku čiste masti; u nazočnosti metanolnog ekstrakta ono je smanjeno.

Preliminarni pokusi s pročišćenim metanolnim, vodenim ekstraktom, zakiseljenim N solnom kiselinom, pa s test-supstancama kao što su dietilamin, dimetil i trimetilamin hidroklorid, te reakcijom s ninhidrinom, dali su pozitivne rezultate s obzirom na dietil i dimetilamin. U kromatogramu razabiremo još nekoliko komponenata, koje su dale pozitivnu reakciju s ninhidrinom.

Reakcija s jodnim parama upućuje na nazočnost spojeva fenolnoga karaktera, odnosno aromatskih kiselina.

Pokusi izvršeni s čistim dietil i dimetilamin hidrokloridom u masti pokazali su, da se sprečava stvaranje peroksida. Količina nastalih peroksida u masti, nakon

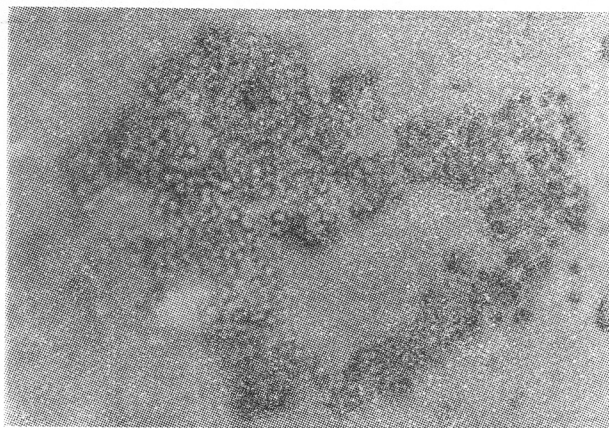
24 sata, kod 98° iznosila je u čistoj masti 116, u masti s 0,5% dietilamina 31, a u masti s 0,5 dimetilamina 9,0 miliekvivalenta u 1 kg masti.

Nazočnost plave fluorescirajuće komponente dokazana je u kromatogramu na papiru, načinjenom s 5%-tnim MeE i s 5%-tnim vodenim ekstraktom lišća s dodatkom i bez dodatka N solne kiseline (vidljiva plava boja prešla u crvenkastu).

Na sl. 1 prikazane su apsorpcione vrijednosti s karakterističnim maksimumom plavo obojene 5%-tne vodene iscrpine lišća i crveno obojenog ekstrakta lišća (nastalog stajanjem na zraku nakon cca 30 sati) u vidljivom dijelu spektra od 360 do 780 m $\mu$ .

Apsorpcija izolirane supstance u UV svijetlu izmjerena je otapanjem kristalinične tvari u metanolu p. a. (1 mg u 100 ml) u području valne dužine od 230 do 380 m $\mu$ ; rezultati mjerenja u infracrvenom području svijetla pokazuju, kod 3350 Å, nazočnost OH skupine.

Metanolna frakcija ekstrakta, koji je podvrgnut kromatografskom odjeljivanju na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, koncentrirana je u struji zraka na cca 10 ml. Pri stajanju u hladioniku na +2° izlučili su se nakon nekoliko mjeseci kristali (cca 5 mg). T. t. sirove kristalinične supstance je 290° (Kofler). Oblik kristala prikazan je na sl. 2.\*



Sl. 2 — Fig. 2

Inhibitorska aktivnost sirove kristalinične supstance u svinjskoj masti bila je neznatna.

#### LITERATURA

1. H. Reiethel, *Fette u. Seifen* **57** (1955) 799.
2. J. R. Chipault, G. R. Mizuno, W. O. Lundberg, *Food Technol.* **10** (1956) 209.
3. J. R. Chipault, G. R. Mizuno, W. O. Lundberg, *Food Research* **20** (1955) 443.
4. M. Rac, B. Oštrić, *Kemija u industriji* **3** (1954) 301.
5. F. D. Tollenaar, H. J. Vos, *Fette u. Seifen* **58** (1956) 112.
6. F. Mihelić, *Farm. Glasnik* **13** (1957) 56.
7. F. Mihelić, *Higijena* **7** (1956) 403.
8. B. Vajić, *Voda i namirnice*, Beograd—Zagreb, 1949, str. 105.
9. *Technical Bulletin*, Shell Chemical Corporation Sc. 52—48 R.
10. Vidi cit. (5)
11. W. O. Lundberg, R. T. Holman, G. O. Burr, *Oil & Soap* **23** (1948) 10.
12. R. T. Holman, W. O. Lundberg, G. O. Burr, *J. Am. Soc.* **67** (1945) 1939, 1669.

\* Povećanje 50×

13. F. Kušan, *Ljekovito i drugo korisno bilje*, Zagreb 1956, str. 181.
14. P. Haas, Th. G. Hill, *Biochem. J.* **19** (1925) 233, 226; **20** (1926) 935.
15. J. Gedeon, M. Mayer, *Arzneimittel-Forsch.* **3** (1953) 539.

### SUMMARY

#### Inhibitory Effect of Methanol Extract from the Leaves of Dog's Mercury

F. Mihelić

Throughout the course of examining inhibitory effects of different extracts of organic solvents from the leaves dog's mercury (*Folium Mercurialis annua L. F. Euphorbiaceae*), it has been found that the optimal activity was shown by methanol extract (MeE) purified by petrol ether.

Antioxidizing activity has been examined in lard by comparing with Jonol. The optimal inhibitory action of methanol extract in lard was obtained in concentration of one per cent, whereas this action was decreased in diminished concentration.

The inhibitory action was increased in the presence of ascorbic acid.

The investigations carried out on aluminium oxide (Brockmann) and with aid of paper chromatography have shown that purified methanol extract is not homogenous, but consists of several components.

The presence of compounds containing nitrogen (amines) has been proved and confirmed, and it is believed that there exist compounds of phenol character and aromatic acids respectively.

By means of paper chromatography we have proved the presence of a matter which fluoresces in UV light with blue colour. It has been isolated one crystalline substance and examined its UV and IR spectrum.

INSTITUTE FOR CHEMISTRY OF NUTRITION  
FACULTY OF PHARMACY  
UNIVERSITY OF ZAGREB  
ZAGREB, CROATIA, YUGOSLAVIA

Received October 18, 1959