

CCA-134

615.32:542.978:541.138.2

Antioksidacijska aktivnost nekih droga*

F. Mihelić

Zavod za kemiju prehrane Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Primljeno 11. lipnja 1958.

Sistematski je istražena antioksidaciona aktivnost kod više od 100 droga u svinjskoj masti iz različnih botaničkih familija, bez obzira na starost i toksičnost. One su imale prooksidaciona i antioksidaciona svojstva. Iz droge cortex *Paracota* izolirana je supstanca s dušikom, koja je nosilac antioksidacionog djelovanja. Izolirana supstanca bezbojna je i sitno kristaličnog prizmatskog oblika s T. t. 133—134° (Kofler), a bruto formula joj je: $C_{16}H_{17}NO_4$.

Izolirana supstanca s anhidridom octene kiseline, uz dodatak koncentrirane solne kiseline, daje ružičasto obojenje, s koncentriranom sumpornom kiselinom oboji se ružičasto, a s 5%^o-tnom otopinom kalijeve lužine, uz grijanje u vodenoj kupelji, oboji se zelenom bojom. Supstanca nije optički aktivna, a u ultravioletnom svijetlu fluorescira plavkastom bojom. Hidrolizom izolirane tvari lužinom dobiven je amin; koji je identificiran pomoću pikrata sa T. t. 318° (zataljena kapilara i raspadanje).

Pri pokusima s izoliranom supstancom, koji su provedeni sa svrhom da se ustanove antioksidaciona svojstva u svinjskoj masti u 0,01; 0,05 i 0,10%^o-tnoj koncentraciji utvrđeno je, da ona djeluje antioksidaciono već u 0,01%^o-tnoj koncentraciji, a optimalna aktivnost da se postiže kod 0,05%^o-tne koncentracije. Dodatak limunske, vinske i askorbinske kiseline povećava zaštitno svojstvo supstance. Preliminarni pokusi na zamorcima, miševima i štakorima pokazali su, da 0,05%^o-tna koncentracija izolirane supstance u masti nije uzrokovala promjene i simptome, koji bi upozoravali na toksične pojave.

Mogućnost sprečavanja kvarenja masti kemijskim putem zapažena je kod tretiranja ulja alkalijama i zemljama za izbjeljivanje^{1,2}. I vladanje masti upozoruje na činjenicu, da masti, odnosno ulja sadrže od prirode biokatalizatore, koji djeluju antioksidaciono, a nisu toksični i štetni po zdravlje. To je zaključeno i iz opažanja, da se masti i ulja, u svojim prirodnim depovima, za vrijeme latentne periode u biljnim i životinjskim stanicama ne kvare, premda su izvrgnuti utjecaju svijetla. Zbog toga se nastoji protumačiti narav antioksidansa, jer se njima služi priroda u masnom tkivu, a isto tako pronaći sintetske tvari, koje djeluju zaštitno.

Moureu i Dufraise^{3,4} su pokazali, da oksidacija između neke autoksidirajuće supstance i kisika može biti dulje vremena spriječena nazočnošću vrlo malih koncentracija stranih spojeva.

Sistematskim ispitivanjem antioksidacionih, odnosno inhibitorskih tvari bavili su se Olcott i Mattil⁵. Oni su i utvrdili njihovu nazočnost u ulju. Do-

* Dio iz disertacije: Antioksidaciona svojstva droga i drugih tvari biljnoga podrijetla, primljene na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta, Zagreb 1956.

kazali su, da su te supstance identične s tokoferolima, koje su Evans i Burr otkrili kao vitamin E i dali im naziv inhibitoli.

Nazočnost antioksidansa utvrđena je osim toga i u drugim prirodnim tvarima (rajčice, salata i t. d.)^{6,7,8}.

Ova radnja odnosi se na potanje ispitivanje zaštitnih svojstava biljnih droga, toksičnih i netoksičnih, iz različitih botaničkih familija, bez obzira na starost i podrijetlo. Glavna zadaća ovog istraživanja bila je, da se utvrdi i sistematski istraži droga s optimalnim antioksidacionim djelovanjem.

EKSPERIMENTALNI DIO I REZULTATI

Za istraživanje antioksidacionih svojstava droga služe različne metode (Swift, Schaal, Bercroft-Warburg)^{9,10}, koje se baziraju na činjenici, da se uzorak masti s drogom izvrgne povišenoj temperaturi, odnosno djelovanju kisika, te da mjeri vrijeme, u kojemu postane pokvaren. Druge metode sastoje se u tome, da se ispitivani uzorci čuvaju kod sobne temperature, t. j. kod onih uvjeta čuvanja, koji se susreću u industriji i kućanstvu, gdje se normalno odvijaju procesi kvarenja.

Ispitane su ove droge:

rhizoma *Polypodii*, fam. Polypodiaceae;
herba *Equiseti arvensis*, fam. Equisetaceae;
Lycopodium clavatum (spora), fam. Lycopodiaceae;
colophonium, sandaraca, fructus i lignum *Juniperi*, resina *Pini*, fam. Coniferae;
semen *Araceae*, fam. Palmae;
rhizoma *Calami*, fam. Araceae;
semen *Sabadillae*, — *Colchici*, rhizoma *Veratri*, *Aloe*, bulbus *Scillae*, herba *Convallariae majalis*, radix *Sarsaparillae*, fam. Liliaceae;
rhizoma *Iridis*, fam. Iridaceae;
rhizoma *Zedoariae*, — *Zingiberis*, — *Curcumae*, fructus *Cardamomi*, fam. Zingiberaceae;
tuber *Salep*, fam. Orchidaceae;
fructus *Cubebae*, fam. Piperaceae;
galae asiaticae, cortex i semen *Quercus*, fam. Fagaceae;
herba *Cannabis indica*, *Lupulinum*, fam. Moraceae;
rhizoma *Rhei chinensis*, fam. Polygonaceae;
herba *Chenopodii*, fam. Chenopodiaceae;
herba *Herniariae*, fam. Cariophyllaceae;
herba *Adonidis vernalis*, fam. Ranunculaceae;
radix *Colombo*, fam. Menispermaceae;
folium *Camphora*, cortex *Coto verum*, cortex *Paracoto*, fructus *Lauri*, fam. Lauraceae;
opium, fam. Papaveraceae;
semen *Sinapis nigrae* i *albae*, fam. Cruciferae;
folium *Hamamelidis*, fam. Hamamelidaceae;
rhizoma *Tormentillae*, fam. Rosaceae;
gummi arabicum, folium *Sennae*, radix *Ratanhiae*, — *Ononidis*, — *Liquiritiae*, semen *Foenugraeci*, — *Ceratoniae siliquiae*, lignum *Santali rubrum*, chrysarobinum, tragacantha, *Catechu nigrum*, fam. Leguminosae;
semen *Lini*, fam. Linaceae;
lignum i resina *Guajaci*, fam. Zygophyllaceae;
herba *Rutae*, folium *Bucco*, — *Jaborandi*, fam. Rutaceae;
cortex *Simarubae*, lignum *Quassiae*, fam. Simurabaceae;
radix *Senegae*, fam. Polygalaceae;
Euphorbium, *Kamala*, fam. Euphorbiaceae;
folium *Mate*, fam. Aquifoliaceae;
cortex *Frangulae*, fam. Rhamnaceae;
flos i fructus *Tiliae*, fam. Tiliaceae;
folium *Malvae*, — *Althaeae*, radix *Althaeae*, fam. Malvaceae;
semen *Colae*, fam. Sterculiaceae;
gutti, fam. Guttiferae;
dammar, fam. Dipterocarpaceae;

herba *Violae tricoloris*, fam. Violaceae;
 folium *Eucalypti*, fam. Myrtaceae;
 fructus *Coriandri*, — *Foeniculi*, — *Anisi vulg.*, radix *Pimpinellae*, — *Angelicae*,
Galbanum, fam. Umbelliferae;
 folium *Myrtilli*, — *Uvae ursi*, fam. Ericaceae;
 radix *Primulae*, fam. Primulaceae;
 benzoe, fam. Styraceae;
 manna, fam. Oleaceae;
 semen *Strychni*, fam. Loganiaceae;
 herba *Centaurii*, folium *Trifolii fibrini*, radix *Gentianae*, fam. Centianaceae;
 semen *Strophanthi*, cortex *Quebracho*, fam. Apocynaceae;
 folium *Rosmarini*, — *Salviae*, — *Menthae piperitae*, herba *Galeopsidis*, — *Melissae*, — *Serpylli*, — *Thymi*, flos *Lavandulae*, fam. Labiatae;
 folium *Hyoscyami*, — *Nicotianae*, — *Stramonii*, semen *Hyoscyami*, — *Stramonii*,
 fam. Solanaceae;
 folium *Digitalis*, flos *Verbasci*, fam. Scrophulariaceae;
 cortex *Chinae*, — *Yohimbe*, radix *Ipecacuanhae*, fam. Rubiaceae;
 flos *Sambuci*, fam. Carrifoliaceae,
 radix *Valerianae*, fam. Valerianaceae;
 herba *Lobeliae*, fam. Campanulaceae;
 flos *Chamomillae vulgaris*, — *Chamomillae romanae*, — *Pyrethri*, — *Cinae*, herba
Millefolii, — *Absinthii*, radix *Enulae*, — *Bardanae*, fam. Compositae.

Kao supstrat služila je potpuno svježa svinjska mast, a inhibitorska aktivnost utvrđena je određivanjem primarnih autoksidacionih produkata i izražena kao ml 0,002 n Na₂S₂O₃ (Lea-broj, peroksidni broj)¹¹.

Od dobro promiješane i u sitan prašak smrvljene zračno suhe droge uzeto je 0,1 g na 10 g masti. Pokusi su vršeni u Petrijevim zdjelicama promjera 9 cm i visine 1,5 cm.

Uzorci su miješani do potpunog ukrućenja masti, zatvoreni drugom polovicom Petrijeve zdjelice i nakon toga izvrnuti utjecaju difuznog svijetla kod sobne temperature, pa djelovanju ultravioletnoga svijetla (Hanau Analysenquarzlampe) i utjecaju tame u različitom vremenskom odsječku. Usporedno je izveden slijepi pokus s čistom masti (kontrolni), koji je služio kao test za prosuđivanje antioksidacione moći pojedinih droga, koje su dodane u mast.

Specijalna ispitivanja vršena su u termostatu, kod povišenih temperatura 50° i 98°, kako bi se dobio uvid u stupanj stabilnosti masti s antioksidansima.

Paralelni eksperimenti izvedeni su i s nekim drogama, za koje je već poznato antioksidaciono djelovanje (kamala, lignum *Guajaci*).^{12,13,14}

Budući da je droga cortex *Paracoto* pokazala povećana zaštitna svojstva, uzeta je za potanje istraživanje, s ciljem, da se izolira i identificira nosilac te aktivnosti, te da se s izoliranom supstancom provedu pokusi na životinjama i utvrdi mogućnost njene primjene u praktične svrhe.

Eksperimentalnim je rezultatima utvrđeno, da su droge u masti različito djelovale. One su pokazale antioksidaciona i prooksidaciona svojstva s različitim stupnjem aktivnosti.

Povećanu antioksidacionu aktivnost pokazale su ove droge: cortex *Paracoto*, cortex *Coto verum*, kamala, lignum *Guajaci*, lignum *Santali rubrum*, resina *Pini*, benzoe, gallae asiaticae, flos *Chamomillae romanae*, opium, lupulinum, flos *Sambuci*, colophonium, galbanum.

Od preostalih istraženih droga mnoge su pokazale zaštitno svojstvo u smanjenom stupnju. Neke su u početnom stadiju eksperimenata djelovale antioksidaciono, a kasnije prooksidaciono; druge su opet imale prooksidaciona svojstva.

Opširna istraživanja zaštitnoga svojstva droge cortex *Paracoto-Ocotea pseudo-coto Rusby*^{15,16,17,18} — (vidi tablicu I) — vršena su:

a) utjecajem difuznog svijetla i tame, kod sobne temperature od 23—25°, u periodu od sedam mjeseci. Iz rezultata dobivenih za primarne razgradne produkte (peroksidi) utvrđeno je antioksidaciono djelovanje droge u navedenom razdoblju.

b) utjecajem povišenih temperatura u termostatu kod 50° i 98°.

Dobivene vrijednosti o antioksidacionoj aktivnosti pokazuju, da je uzorak masti s drogom kod 50° s obzirom na kontrolni uzorak vrlo stabilan.

U pokusu izvođenom kod 98° (pokus je trajao 24 sata) utvrđeno je, da je čista mast bila potpuno pokvarena, s izrazito užeženim mirisom i okusom; mast s drogom imala je osobine svježje masti s neznatno aromatičnim mirisom i okusom.

TABLICA I — TABLE I

Pokusi s korom Paracoto — Experiments with Cortex Paracoto

Mast bez (—) droge ili s (+) drogom Lard without (—) or with (+) drug	na početku at the beginning	Peroksidni broj — nakon mjeseci Peroxide number — After months					
		III	V	VI	VII		
	svijetlo — light						
—	0,8	5,5	53,0	67,5	67,5		
+		1,5	2,0	2,0	2,0		
	tama — darkness						
—	0,8	2,0	6,0	11,5	43,5		
+		1,0	1,0	1,3	1,3		
	u termostatu kod 50° — in thermostate at 50° nakon dana — after days						
		3	7	12	26	32	55
—	0,8	1,8	4,6	34,5	88,0	118,0	142,5
+		1,0	1,0	1,5	1,8	1,8	3,5
	u termostatu kod 98° — in thermostate at 98° nakon 24 sata — after 24 hours						
—	0,8				36,8		
+					1,0		

Ovi eksperimenti izvedeni izlaganjem masti normalnim uvjetima čuvanja, kao i namjernim ubrzavanjem procesa kvarenja, dokazuju, da droga sadrži jednu ili kompleks tvari, koje su nosioci zaštitnoga djelovanja.

Kod istraživanja je nadalje izveden niz eksperimenata iscrpljivanjem usitnjene droge u mučkalici s destiliranom vodom i s parafinskim uljem (sp. t. 0,880), te ekstrakcijom s organskim otapalima (p.a.). U aparatu po Soxhletu izvršeno je iscrpljivanje piridinom, ugljičnim disulfidom, ugljičnim tetrakloridom, triklor-etilenom, toluenom i etanolom (96°/o).

Količina ekstrakta s različnim organskim otapalima prikazana je u tablici II.

TABLICA II — TABLE II

sredstvo za ekstrakciju organic solvents	CS ₂	CCl ₄	CCl ₂ =CHCl	C ₆ H ₅ N	C ₆ H ₅ —CH ₃	C ₂ H ₅ OH
% ekstrakta % of extract	14,9	19,7	19,1	41,0	17,8	27,6

S dobivenim ekstraktima načinjen je test stabilnosti u masti kod 98°. Upoređivanjem stupnja zaštitne aktivnosti dobivenih ekstrakata u masti utvrđeno je najjače antioksidaciono djelovanje ekstrakta tetraklorugljika.

Ekstrakcija droge tetraklorugljikom u aparatu po Soxhletu

Sitno razribana droga najprije je macerirana 24 sata tetraklorugljikom; nakon toga izvršena je ekstrakcija u aparatu po Soxhletu. Iz ekstrakta tetraklorugljika, koji je bio smeđe boje, odvojila se smeđa smolasta masa nalik na ulje. U odijeljenom ekstraktu izlučila se u nastavku hlađenja bijela sitno kristalična masa (4,65% osnovnog produkta), koja je obrađivanjem sa CCl_4 prekrizalizirana do konstantnoga tališta (0,95% čiste supstance).

Izolirana supstanca je bezbojna i mikro-kristalično prizmatskog oblika, s t. t. 133–134° (Kofler). Pri grijanju supstance u epruveti osjeća se miris sličan mirisu fenola. Reakcija na halogene po Beilsteinu, i reakcije na sumpor i fosfor negativne su, a reakcija na dušik po Lassaigne-u pozitivna je. Rezultati elementarne analize:

Anal. 11,758 mg tvari: 28,6 mg CO_2 i 6,3 mg H_2O
 2,780 mg tvari: 0,118 ml N_2 (22°, 768 mm)
 $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ rač.: C 66,88%; H 5,96%; N 4,87%; m. t. 287,3
 najd.: C 66,38%; H 6,00%; N 4,95%; m. t. 275

Molekularna težina određena je mikro-metodom po Rastu: 0,5 mg tvari u 6,6 mg kamfora, $\Delta = 11^\circ$.

Supstanca je topljiva u apsolutnom etanolu i metanolu, izobutanolu, *n*-propanolu, amilnom alkoholu, acetonu, benzenu, kloroformu, sumporouglijuku i eteru, a ne otapa se u petrol eteru. Netopljiva je u vodi, u 1%-tnoj otopini solne kiseline, a topljiva u 1%-tnoj otopini natrijeva karbonata.

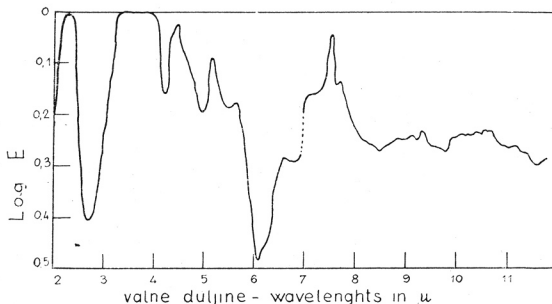
Supstanca otopljena u 2 ml etanola, uz dodatak od nekoliko kapi otopine feri klorida, daje plavu boju, koja u nazočnosti kloroforma prelazi u maslinasto-zelenu. Nekoliko mg supstance otopi se u 2 ml kloroforma i 1 ml etanola, a kad se zatim doda nekoliko kapi otopine feri klorida, nastaje plava boja, koja prelazi u maslinasto-zelenu.

Karakteristične kvalitativne kemijske reakcije s izoliranom supstancom: s nekoliko ml koncentrirane sumporne kiseline oboji se nakon stajanja od pol sata slabo ružičasto; s 15%-tnom otopinom kalijeve lužine, uz grijanje u vodenoj kupelji, daje, nakon nekoliko minuta, zelenu boju; s anhidridom octene kiseline, uz oprezno dodavanje koncentrirane solne kiseline, nakon češćeg miješanja i stajanja od jednog sata, daje neznatno zamućenje s ružičasto-violetnom bojom, koja nakon dva do tri sata postiže najveći intenzitet.

Određivanje apsorpcionoga spektra u infracrvenom području svijetla

Apsorpcioni spektar u infracrvenom području svijetla s krutom supstancom i s 1 mg%-tnom otopinom supstance u tetraklorugljiku, u valnom području od 2–12 μ , načinjen je u spektrofotometru marke Hilger¹⁹. Rezultati mjerenja prikazani su na sl. 1 i 2.

Apsorpcione vrijednosti s krutom supstancom bile su za NH_2 grupu kod 6,10 μ ; OH grupu kod 2,75 μ i 7,63 μ ; benzen prsten kod 5,55 μ 6,73 μ i 7,63 μ , a s otopinom krute supstance u tetraklorugljiku za NH_2 grupu kod 6.4 μ .

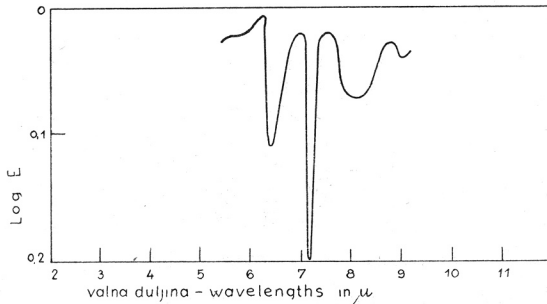


Sl. 1. — Fig. 1.

Apsorpcioni spektar izolirane supstance (krute) u infracrvenom području svijetla.
 Absorption spectrum of isolated substance (crystalline) in infra red.

Reakcija s pikrinskom kiselinom

50 mg supstance otopljeno je u 5 ml apsolutnog etanola; dodano je oko 2 ml zasićene otopine pikrinske kiseline u apsolutnom etanolu. Nakon češćega mućkanja i stajanja (24 sata) nije nastao nikakav reakcioni produkt.

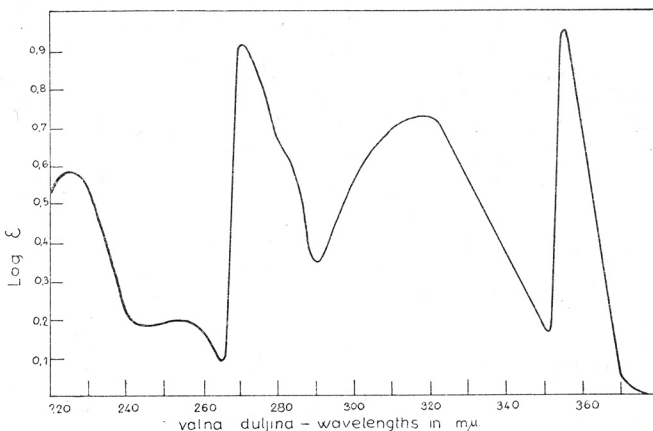


Sl. 2. — Fig. 2.

Apsorpcioni spektar izolirane supstance (1 mg u 100 ml tetraklorugljika) u infracrvenom području svijetla.
Absorption spectrum of isolated substance (1 mg. in 100 ml. CCl_4) in infrared.

Pokus hidrolize supstance

Oko 50 mg supstance otopljeno je u 10 ml 10%-tne kalijeve lužine i kuhano 2 sata u vodenoj kupelji. Ohlađena otopina neutralizirana je koncentriranom solnom kiselinom i ostavljena u hladnjaku. Nakon 24 sata nastao je mutež; izlučio se smeđi talog, koji je odijeljen filtracijom. Talog na filtru obrađivan je tionilkloridom i koncentriranim amonijakom. Nastali produkt nije dalje obrađivan, budući da ga je bilo vrlo malo. Filtratu je dodano oko 2 ml zasićene otopine pikrinske kiseline, kod čega se izlučio žućkasti talog u obliku sitnih iglica. Nakon dvokratne prekrystalizacije u vodi počela je supstanca, zataljena u kapilari, u bloku, doživljavati ove promjene: kod 190° malo je mijenjala boju, kod 220° postajala je tamno-smeđa, kod 260° postala je potpuno tamna, a kod 318° se raspala.



Sl. 3. — Fig. 3.

Apsorpcioni spektar izolirane supstance (0,5 mg u 100 ml apsolutnog etanola) u U. V. području svijetla.
Absorption spectrum of isolated substance (0.5 mg in 100 ml. of ethanol) in ultraviolet.

Dobiveni pikrat ($C_{18}H_{14}N_4O_{10}$) sadržavao je ovu količinu dušika:

Anal. 18,335 mg tvari: 1,953 ml N_2 (15°, 760 mm)

$C_{18}H_{14}N_4O_{10}$ (446,32): rač. 12,55% N
nadj. 12,63% N

Fizikalna svojstva

Izolirana supstanca nije optički aktivna, a u ultravioletnom svijetlu (Analysenlampe Hanau) fluorescira plavkastom bojom. Intenzitet fluorescence mjeren je u fluorometru po K. Weberu²⁰ sa standardnim filtrom oznake Schott G. G. 3.

Rezultati mjerenja izraženi su kao relativni intenzitet fluorescence, koji s obzirom na standardni G. G. 3 Schottov filter iznosi 100, a za izoliranu supstancu u aps. metanolu 21,4, u kloroformu 25,4, u eteru 28,6.

Apsorpcioni spektar u ultravioletnom području svijetla određen je u spektrofotometru po Beckmannu. Mjerenje apsorpcije s 0,5 mg supstance u 100 ml apsolutnog etanola izvršeno je u području valnih dužina od 220 do 375 m μ , pri čemu su utvrđena tri maksimuma: kod 270, 320 i 355 m μ (sl. 3).

Pokusi sa životinjama

Iz literature²¹ je poznato, da kora *Paracoto* djeluje kod crijevnih oboljenja (katara i proljeva) i da su je liječnici svojedobno mnogo propisivali u praksi, i to u formi iscrpina ili u kombinaciji s drugim lijekovima. Stoga je pretpostavljeno, da supstanca u navedenim količinama, koje djeluju antioksidirajuće, ne će na životinjama izazivati promjene, koje bi upozoravale na toksičnost.

Kod preliminarnih pokusa izvršenih sa zamorcima, miševima i štakorima, nisu u 0,05%-tnoj koncentraciji supstance u svježoj svinjskoj masti zapažene nikakve promjene i simptomi, koji bi govorili za toksičnost supstance.

Antioksidaciono djelovanje izolirane supstance

Da se ustanovi stupanj antioksidacionog učinka izolirane supstance u masti, proveden je niz pokusa, kod čega su uzete različite koncentracije, i to s 0,01, 0,05 i 0,10 g%, pri različitim uvjetima čuvanja. Kao test za upoređivanje služio je kontrolni uzorak masti bez supstance i s Tenox II. Tenox II (Tennesh Company, Eastment Comp. Kingsport, Teness.) je antioksidans dopušten u USA, koji sadrži 70% glikola, 20% butilen hidroksianisola, 4% limunske bezvodne kiseline i 6% propil galata. Rezultati tih istraživanja prikazani su tablici III.

Antioksidaciono djelovanje izolirane supstance u masti kod sobne temperature bilo je, u usporedbi s kontrolnim uzorkom, povećano, a u usporedbi s Tenox II — smanjeno. Stupanj aktivnosti ne raste proporcionalno s povećanom koncentracijom supstance.

Pokusima izvedenim kod 50°, u termostatu, utvrđeno je da izolirana supstanca posjeduje, s obzirom na kontrolni uzorak, jako zaštitno svojstvo, a pri uspoređivanju s Tenox II, ustanovljeno je, da je njeno antioksidaciono djelovanje u prvom stadiju pokusa, t. j. prvih šest dana, gotovo isto dok u drugoj polovici to je djelovanje nešto smanjeno.

Supstanca u masti pokazala je antioksidacionu aktivnost i prema utjecaju ultravioletnoga svijetla. Iz dobivenih rezultata razabiremo, da supstanca, u usporedbi s kontrolnim uzorkom, posjeduje jako zaštitno djelovanje, a u usporedbi s čistim Tenox II da je to djelovanje nešto smanjeno.

Antioksidaciona aktivnost supstance u kombinaciji sa sinergistima

S izoliranom supstancom provedeni su pokusi u kombinaciji s limunskom, vinskom i askorbinskom kiselinom²².

Ekperimenti su izvedeni s 0,01 i 0,05% izolirane supstance, kojoj je dodana ista količina svake pojedine kiseline. Uzorci su ostavljeni u termostatu kod 50° i nekoliko je dana kontroliran proces kvarenja.

Iz rezultata u tablici IV razabiremo, da u slabijoj koncentraciji limunska, vinska i askorbinska kiselina pojačava antioksidaciono djelovanje izolirane supstance. U

povećanoj koncentraciji limunska i vinska kiselina ne daju sinergistički efekt, a askorbinska kiselina pojačava antioksidaciono svojstvo izolirane supstance.

Najtoplije se zahvaljujem gospodinu profesoru dr. B. Vajiću, predstojniku Zavoda za kemiju prehrane, za predloženu temu, te za upute i pomoći kod rada. Zahvaljujem se i svima ostalima, koji su mi pomogli i omogućili rad u svojim institutima.

TABLICA III — TABLE III

Promjene u čistoj masti i u masti s izoliranom supstancom pod utjecajem različitih faktora

The influence of different factors on variation in pure lard and in the lard with the isolated substance

Količina supstance u % Isolated substance in %	Mast Lard	Peroksidni broj nakon mjeseci — Peroxide number after months							
		Na početku At the beginning	I	II	III				
kod sobne temperature 23–25° — at room temperature of 23–25° na svijetlu — by day light									
	čista — pure	0,5	3,5	14,0	66,0				
0,01	+ supst. — subst.		2,5	6,5	20,0				
0,01	+ Tenox II		1,0	2,5	3,0				
0,05	+ supst. — subst.		2,5	4,0	7,5				
0,05	+ Tenox II		1,0	2,5	3,0				
0,10	+ supst. — subst.		2,0	4,0					
na tami — in darkness									
	čista — pure	1,0	1,5	2,5	5,5				
0,01	+ supst. — subst.		1,3	1,5	4,0				
0,01	+ Tenox II		1,3	1,5	2,0				
0,05	+ supst. — subst.		1,3	1,5	2,5				
0,05	+ Tenox II		1,0	1,5	2,0				
u termostatu kod 50° — in thermostate at 50° nakon dana — after days									
	čista — pure	1,0	1	2	3	6	10	13	
0,01	+ supst. — subst.		1,5	1,8	2,0	5,0	11,0	40,0	52,0
0,01	+ Tenox II		1,0	1,3	1,3	1,5	2,0	3,0	5,0
0,05	+ supst. — subst.		1,3	1,3	1,3	1,5	1,7	2,0	2,5
0,05	+ Tenox II		1,0	1,0	1,3	1,5	1,8	2,0	3,0
0,10	+ supst. — subst.		1,3	1,3	1,3	1,4	1,5	1,5	1,8
0,10	+ Tenox II		1,0	1,0	1,0	1,3	1,4	1,5	2,0
0,10			1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,5
utjecaj ultravioletnoga svijetla — influence of U. V. light nakon sati — after hours									
	čista — pure	1,0	½	1	2	2½			
0,01	+ supst. — subst.		1,5	10,5	20,5	27,0			
0,01	+ Tenox II		1,3	2,0	3,5	4,5			
0,05	+ supst. — subst.		1,3	2,0	2,5	2,5			
0,05	+ Tenox II		1,3	1,7	2,8	4,0			
0,05			1,3	1,8	2,5	2,5			

TABLICA IV — TABLE IV

Aktivnost izolirane supstance u kombinaciji sa sinergistima u termostatu kod 50°
 The activity of isolated substance with synergists in thermostate at 50°

Količina supstance u % Isolated substance in %	Mast Lard	na početku in the beginning	Peroksidni broj nakon dana — Peroxide number after days			
			2	6	10	14
0,01	čista — pure	1,3	1,5	10,0	49,5	62,5
	+supst. — subst.		1,5	3,0	8,0	18,5
0,01	+supst. + 0,01% lim. kis.					
	+subst. + 0,01% citric acid		1,5	1,5	2,0	3,5
0,01	+supst. + 0,01% vinske kis.					
	+subst. + 0,01% tart. acid.		1,5	2,3	4,5	9,5
0,01	+supst. + 0,1% askorb. kis.					
	+subst. + 0,01% ascorb. acid		1,5	1,5	2,0	3,5
0,05	+supst. — substance		1,0	1,0	1,5	2,0
	+supst. + 0,05% lim. kis.					
0,05	+subst. + 0,05% citric acid		1,5	2,0	2,0	2,0
	+supst. + 0,05% vinske kis.					
0,05	+subst. + 0,05% tart. acid		1,5	1,5	2,0	2,0
	+supst. + 0,05% askorb. kis.					
0,05	+subst. + 0,05% ascorb. acid		0,5	1,0	1,0	1,0

LITERATURA

1. H. P. Kaufmann i H. Fiedler, *Fette u. Seifen* **46** (1939) 275.
2. R. D. Johnson, *Sci. Sect. Circ.* **629** (1941) 423; ref. *Fette u. Seifen* **51** (1944) 74.
3. Ch. Moureu i Ch. Dufraisse, *Compt. rend.* **174** (1922) 258; cit. po K. Weber, *Inhibitorwirkung*, Stuttgart 1928., str. 114.
4. E. C. Bate-Smith i T. M. Morris, *Food science*, Cambridge 1952., str. 199—221.
5. H. S. Ollcott i H. A. Mattill, *J. Am. Chem. Soc.* **58** (1936) 1627.
6. H. W. Loesecke, *Outlines of Food Technology*, New York 1942. str. 275.
7. T. P. Hilditch i S. Paul, *J. Soc. Chem. Ind. (London)* **58** (1939) 21; ref. u *Fette u. Seifen* **46** (1939) 230.
8. P. Dubouloz, *Oléagineux* **7** (1952) 465.
9. W. O. Lundberg, *Hormel Inst. Univ. Minnesota Publ. No. 20*, Minneapolis 1947. str. 11, 31, 12, 10.
10. V. C. Mehlenbacher, *Oil & Soap* **19** (1942) 137.
11. C. H. Lea, *Proc. Roy. Soc. (London)* **108B** (1931) 175.
12. D. C. Dhar i J. S. Aggarwal, *J. Sci. Ind. Research (India)* **8B** (1949) No. 1, 1; cit. C. A. **43** (1949) 5127.
13. S. V. Govindarajan i B. N. Banerjee, *Current Sci. (India)* **8** (1933) 559; cit. C. A. **34** (1940) 3523.
14. D. P. Grettie, *Oil & Soap* **10** (1933) 126—127; cit. C. A. **27** (1933) 4432.
15. F. Gstirner, *Heil- u. Gewürz-Pflanzen* **15** (1932) 41, 48, 49.
16. Rusby, *Bull. Torrey Botan. Club* **49** (1922) 259; cit. po F. Gstirner, *Heil- u. Gewürz-Pflanzen* **15** (1932) 41, 49.

17. F. Berger, *Handbuch der Drogenkunde*, I, Wien 1949. str. 133.
18. H. Thoms, *Handbuch der praktischen u. Wissenschaftlichen Pharmazie*, B, erste Hälfte, Berlin—Wien 1929. str. 906.
19. H. M. Randall, R. G. Fowler, N. Fuson i J. R. D angl, *Infrared Determination of Organic Structures*, New York 1949. str. 229.
20. M. Majer, *Vojnosanit. Pregled* 7 (1950) 156.
21. F. G stirner, *Heil u. Gewürz-Pflanzen* 15 (1932) 41.
22. H. Raetthel, *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* 95 (1952) 248.

SUMMARY*

Antioxidising Properties of Some Drugs

F. Mihelić

Systematic examination of inhibitory activity of over one hundred drugs from various botanical families, regardless of the age and toxicity, has revealed different degree of such activity. The drugs have shown pro and antioxidantising properties. The following drugs have shown obvious inhibitory activity: cortex *Paracoto*, cortex *Coto verum*, lignum *Guajaci*^{12,13,14}, lignum *Santali rubrum*, resina *Pini*, benzoe, galle asiaticae, flos *Chamomillae romanae*, opium *Lupulinum*, flos *Sambuci*, colophonium i galbanum.

The antioxidantising activity in lard, which served as substrate was proved by Lea's method by which the primary degradation products (peroxides), formed in the course of the reaction, have been determined. The experiments have been carried out in Petry's dishes at room temperature of 23—25° at daylight and in the dark, at increased temperatures of 50 and 98° in the thermostat, and under the influence of ultra-violet light.

The drug cortex *Paracoto* was used for closer examination, as it was proved that it has optimal antioxidantising activity. The substance containing nitrogen, which was the carrier of inhibitory activity, was isolated from it. The isolated substance is colourless and of fine crystalline prismatic shape with m. p. 133—134° (Kofler), with brutto formula C₁₆H₁₇NO₄. The isolated substance with the anhydride of acetic acid and in the presence of concentrated hydrochloric acid gives pink colour, with concentrated sulphuric acid also pink colour, and when heated on water bath with 15% solution of potassium hydroxide green colour. The substance is not optically active, and in the ultraviolet light it fluoresces with bluish colour.

By hydrolysis of the isolated substance with the base we have obtained amine, which is identified by means of pycrate with the m. p. 318° (decompos.; fused capillary).

The isolated substance has been tested for antioxidantising properties in lard in concentration of 0.01, 0.05, and 0.10%. The experiments have been carried out at room temperatures of 23—24°, at daylight and in the dark, at increased temperature of 50° and 98° in the thermostat, and under the influence of ultraviolet light. It has been proved that the substance shows inhibitory properties already in concentration of 0.01%, and the optimal activity has been obtained in concentration of 0.05%. The inhibitory quality of the substance is greatly increased by addition of citric, tartaric and ascorbic acids, while in 0.05% concentration synergistic effect has been obtained only with ascorbic acid.

The preliminary experiments with guinea pigs, mice and rats have shown that the isolated substance added to the lard in concentration of 0.05% has not caused changes and symptoms that would point to toxicity.

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

Received June 11, 1958

* Abstract from thesis: »Antioxidizing properties of the drugs and other substances of plant origin«, Faculty of Pharmacy, University of Zagreb, 1956.