

Ksantin-oksidaza i iz prirode izolirani inhibitori ovog enzima

Peran, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:607149>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET SPLIT

KSANTIN-OKSIDAZA I IZ PRIRODE IZOLIRANI INHIBITORI OVOG
ENZIMA

ZAVRŠNI RAD

LUCIJA PERAN

Matični broj: 426

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULET SPLIT
PREDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

KSANTIN-OKSIDAZA I IZ PRIRODE IZOLIRANI INHIBITORI OVOG
ENZIMA

LUCIJA PERAN

Matični broj: 426

Split, rujan 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY IN CHEMISTRY

XANTHINE OXIDASE AND FROM NATURE ISOLATED
INHIBITORS OF THIS ENZYME

BACHELOR THESIS

LUCIJA PERAN

Parent number: 426

Split, september 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско tehnološki fakultet Split
Preddiplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско tehnološkog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Olivera Politeo

KSANTIN-OKSIDAZA I IZ PRIRODE IZOLIRANI INHIBITORI OVOG ENZIMA

Lucija Peran, 426.

SAŽETAK: Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije enzima ksantin-oksidade prirodnim spojevima izoliranim iz biljaka. Ksantin-oksidaža je enzim koji ima važnu ulogu u metabolizmu purinskih baza i samim tim u patogenezi gihta. Obzirom da lijekovi koji se koriste u liječenju ove bolesti sadrže i stanovite nuspojave neprestalno se traže iz prirode izolirani inhibitori ovog enzima s ciljem moguće prevencije i / ili tretmana gihta. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Pregledom literature utvrđen je veliki broj objavljenih radova na temu inhibicije enzima ksantin oksidaze ekstraktima i spojevima koji ulaze u sastav ekstrakata biljaka. Rezultati su pokazali da su flavonoidi izolirani iz biljnih ekstrakata izvrstan izvor spojeva s inhibicijskim potencijalom na enzim ksantin-oksidažu.

Ključne riječi: ksantin oksidaža, prirodni inhibitori, biljni ekstrakti, flavonoidi

Rad sadrži: 54 stranica, 23 slika, 18 tablica, 0 priloga, 35 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul- predsjednik

2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek- član

3. Prof. dr. sc. Olivera Politeo - član-mentor

Datum obrane: 23. rujna 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Study

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XXV.

Mentor: prof. dr. sc. Olivera Politeo

XANTHINE OXIDASE AND FROM NATURE ISOLATED INHIBITORS OF THIS ENZYME

Lucija Peran, 426.

ABSTRACT: The aim of this study was to review available scientific literature on the inhibition of xanthine oxidase enzymes by natural compounds isolated from plants. Xanthine oxidase is an enzyme that plays an important role in the metabolism of purine bases and hence in the pathogenesis of gout. Since medicines used to treat this disease also contain certain side effects, isolated inhibitors of this enzyme are continuously sought from nature with the aim of possible prevention and/or treatment of gout. The relevant scientific databases Web of Science Core collection and Scopus were used as data sources. The literature review revealed that a large number of papers on the inhibition of xanthine oxidase enzymes by extracts and compounds forming part of plant extracts have been published to date. The results showed that flavonoids isolated from plant extracts are an excellent source of compounds with inhibitory potential on xanthine oxidase enzyme.

Keywords: xanthine oxidase, natural inhibitors, plant extracts, flavonoids

Thesis contains: 54 pages, 23 figures, 18 tables, 0 supplements, 35 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- 1. Franko Burčul, PhD, assistant prof. - chair person**
- 2. Mario Nikola Mužek, PhD, assistant prof. - member**
- 3. Olivera Politeo, PhD, Full Professor - member – supervisor**

Defence date: 23th september 2022.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Olivere Politeo, u razdoblju od svibnja do rujna 2022. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Oliveri Politeo na razumijevanju i korisnim savjetima.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima što su bili uz mene. Posebno hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje i bez čije ljubavi i podrške ne bih uspjela ovo ostvariti. I hvala Marku na neizmjernom strpljenju i potpori u najtežim trenucima.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije enzima ksantin-oksidadaze prirodnim spojevima izoliranih iz biljaka. Ksantin-oksidadaza je enzim koji ima važnu ulogu u metabolizmu purinskih baza i samim tim u patogenezi gihta. Obzirom da lijekovi koji se koriste u liječenju ove bolesti sadrže i stanovite nuspojave neprestalno se traže iz prirode izolirani inhibitori ovog enzima s ciljem moguće prevencije i / ili tretmana gihta. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*.

SAŽETAK

Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije enzima ksantin-oksidade prirodnim spojevima izoliranih iz biljaka. Ksantin-oksida je enzim koji ima važnu ulogu u metabolizmu purinskih baza i samim tim u patogenezi gihta. Obzirom da lijekovi koji se koriste u liječenju ove bolesti sadrže i stanovite nuspojave neprestalno se traže iz prirode izolirani inhibitori ovog enzima s ciljem moguće prevencije i / ili tretmana gihta. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Pregledom literature utvrđen je veliki broj objavljenih radova na temu inhibicije enzima ksantin-oksidade ekstraktima i spojevima koji ulaze u sastav ekstrakata biljaka. Rezultati su pokazali da su flavonoidi izolirani iz biljnih ekstrakata izvrstan izvor spojeva s inhibicijskim potencijalom na enzim ksantin-oksidadu.

Ključne riječi: ksantin oksidaza, prirodni inhibitori, biljni ekstrakti, flavonoidi

SUMMARY

The aim of this study was to review available scientific literature on the inhibition of xanthine oxidase enzymes by natural compounds isolated from plants. Xanthine oxidase is an enzyme that plays an important role in the metabolism of purine bases and hence in the pathogenesis of gout. Since medicines used to treat this disease also contain certain side effects, isolated inhibitors of this enzyme are continuously sought from nature with the aim of possible prevention and/or treatment of gout. The relevant scientific databases *Web of Science Core collection* and *Scopus* were used as data sources. The literature review revealed that a large number of papers on the inhibition of xanthine oxidase enzymes by extracts and compounds forming part of plant extracts have been published to date. The results showed that flavonoids isolated from plant extracts are an excellent source of compounds with inhibitory potential on xanthine oxidase enzyme.

Keywords: xanthine oxidase, natural inhibitors, plant extracts, flavonoids

Sadržaj:

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Struktura enzima	5
1.2 Metabolizam purina.....	6
1.3. Klinički značaj.....	9
1.4. Potencijalni iz prirode izolirani inhibitori enzima ksantin- oksidaza	10
1.4.1. Flavonoidi	10
1.4.1.1 Podjela flavonoida.....	11
1.4.2. Alkaloidi.....	14
1.4.2.1. Kemijska podjela alkaloida	14
2. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4. ZAKLJUČAK	51
5. LITERATURA	52

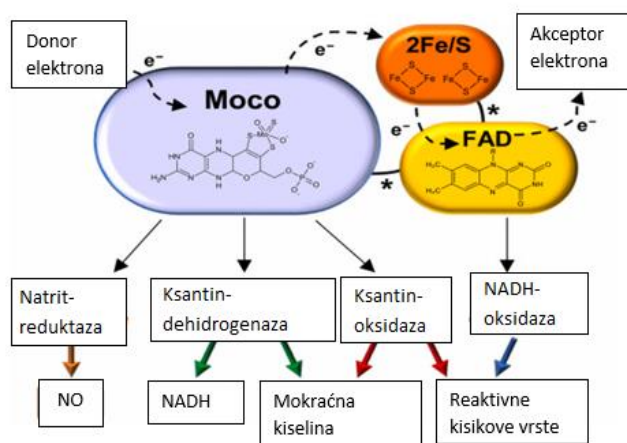
UVOD

Ksantin-oksidadu su neovisno otkrili ukrajinski znanstvenik Gorbačevski i njemački Shardingier. Ovaj enzim katalizira konverziju hipoksantina u ksantin i dalje u mokraćnu kiselinu, kao i oksidaciju brojnih pteridina, aldehida i imidazola. Kod nedostatka kisika, ksantin oksidaza funkcionira kao NAD⁺ ovisna ksantin-dehidrogenaza, a mehanizmi djelovanja ova dva funkcionalna oblika su fundamentalno različiti. U kasnim 1980-im, proučavanje ksantin-oksidade postalo je sve relevantnije zbog otkrića moćnog stvaranja superoksida, kancerogenih i apoptogenih aktivnosti enzima. „Drugi val“ istraživanja uloge ksantin-oksidade u biokemijskim procesima je započeo kada je postalo jasno da je ksantin oksidaza glavni sustav za generiranje reaktivnih vrsta kisika u živim organizmima. Cilj ovog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije ovog enzima prirodnim spojevima izoliranih iz biljaka. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*.

1.OPĆI DIO

Ksantin-oksidaža (XO, EC 1.17.3.2) je oblik ksantin-oksido-reduktaze, vrsta enzima koji generira reaktivne vrste kisika. Ksantin-oksido-reduktaza (XOR) je član visoko očuvane obitelji molibdo-flavo enzima koji su široko rasprostranjeni od prokariotskih do eukariotskih organizama i pretpostavlja se da potječu od zajedničkog pretka. Kod većine živih bića katabolizam hipoksantina i ksantina u mokraćnu kiselinu osigurava aktivnost ksantin-dehidrogenaze (XDH), ali samo sisavci posjeduju ksantin-oksidažu (XO). (1)

XOR protein sisavaca je homodimer od približno 300 kDa u kojem svaka podjedinica ima tri domene čije su karakteristike i funkcije detaljno prikazane na slici 1. Najveća domena sadrži supstratni džep za XDH, XO i aktivnost nitrit-reduktaze XOR, dok se aktivnost NADH-oksidaže odvija u domeni FAD. XOR pokazuje nisku specifičnost supstrata i vrlo svestranu aktivnost, što mu omogućuje oksidaciju i redukciju brojnih endogenih i egzogenih produkata, djelujući tako kao enzim za detoksikaciju i metabolizam lijekova. Na posttranslacijskoj razini, XOR se može proizvesti u obliku koji nema dovoljno molibdena ili sumpora, što rezultira enzimskom neaktivnošću na mjestu Moco. (1)



Slika 1. Ksantin oksido-reduktaza (XOR) sisavaca: struktura i funkcije (1)

XOR ima dvije identične podjedinice, od kojih se svaka sastoji od tri domene povezane nestrukturiranim zglobnim regijama (označenim zvjezdicama): N-terminalna domena od 20 kDa (narančasta) ima dva neidentična klastera željezo-sumpor (2Fe/S), 40 kDa intermedijarna domena (žuta) ima kofaktor flavin-adenin-dinukleotid (FAD), a C-terminalna domena od 85 kDa (ljubičasto) ima kofaktor molibdopterina koji sadrži atom molibdena (Moco). Tok elektrona (e^-) kreće se od mjesta Moco, gdje dolazi do oksidacije, kroz dva redoks centra željezo-sumpor prema mjestu FAD, gdje se reducira akceptor elektrona. Produkti XOR aktivnosti su: mokraćna kiselina (UA) i reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) iz ksantin-dehidrogenaze (XDH), UA, superoksidni ion i vodikov peroksid (ROS, reaktivne vrste kisika) iz ksantin-oksidade (XO), dušikov oksid (NO) iz nitrat i nitrit-reduktaze i ROS iz NADH-oksidade. (1)

XOR kod sisavaca je konstitutivno NAD^+ ovisna dehidrogenaza, koja se može transformirati u oksidazu na reverzibilan način kroz oksidaciju dva cisteinska ostatka ili ireverzibilno kroz djelomičnu proteolizu fragmenta koji sadrži takve cisteinske skupine. Prijelaz iz XDH u XO uključuje intermedijarni XOR oblik s aktivnostima dehidrogenaze i oksidaze, ovisno o oksidaciji samo jedne od dvije ključne sulfhidrilne skupine. Stoga se XO naziva izoformom XDH. Pretvorba iz XDH u XO fiziološki se događa oksidacijom sulfhidrilnih skupina kada se enzim otpušta iz stanice u gastrointestinalni lumen i mokraćni trakt, kao i u biološke tekućine, poput mlijeka i seruma. Uočeno je da se konverzija XDH/XO događa putem oksidacije (reverzibilne) u raznim hipoksičnim i drugim patološkim stanjima. (1)

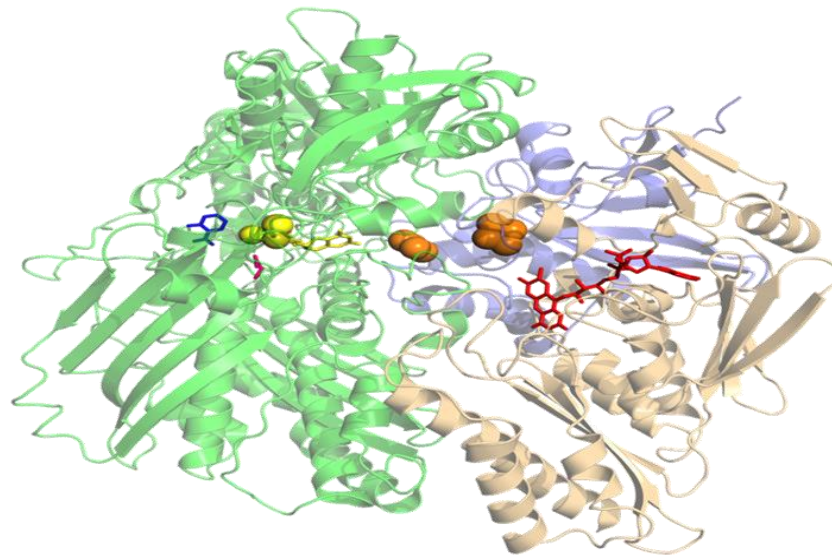
XO oblik može katalizirati prijenos monovalentnog i dvovalentnog elektrona na O_2 , koji generira superoksidni ion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) odnosno vodikov peroksid (H_2O_2), s promjenjivim omjerom između ove dvije reaktivne vrste kisika (ROS). Kiseli pH, niska napetost kisika i koncentracija purina usporavaju brzinu toka elektrona, čime pogoduju dvovalentnom prijenosu koji stvara H_2O_2 . Ovisno o istim parametrima, XDH također može proizvesti ove ROS na FAD mjestu djelujući kao NADH oksidaza. Ova aktivnost se zadržava kada nedostaju atomi molibdena ili sumpora u molibdopterin kofaktoru, kao i kada je XOR inhibiran kompetitivnim ili nekonkurentnim lijekovima, koji blokiraju funkcionalnost Moco mjesta. Osim toga, XOR može djelovati kao nitrat-reduktaza na Moco mjestu redukcijom nitrata u nitrite i kao nitrit-reduktaza redukcijom nitrita u dušikov oksid (NO). NO može dalje reagirati s $\text{O}_2^{\bullet-}$ stvarajući peroksinitrit (ONOO^-). U prisutnosti

prijelaznih metala, $O_2\bullet-$ i H_2O_2 stvaraju hidroksilni radikal ($OH\bullet$) koji zajedno s $ONOO-$, doprinosi citocidnoj aktivnosti upalne reakcije i obrambenom mehanizmu protiv bakterija u urođenom imunitetu. XOR aktivnosti su shematizirane na slici 1. (1)

Normalna subcelularna lokalizacija XO je citosol, ali je također pronađena u peroksisomima. Osim toga, XOR se može naći u izvanstaničnim odjeljcima, kao što su krv i mlijeko. Serumski XOR uglavnom potječe od fiziološke izmjene jetrenih stanica, što potiče otpuštanje jetrenih enzima iz mrtvih stanica u cirkulaciju. Razina serumskog XOR-a snažno raste kao posljedica nekoliko jetrenih patologija koje uzrokuju oštećenje tkiva. Obilna prisutnost XOR-a u mlijeku rezultat je apokrine sekrecije lipidnih globula iz stanica dojke tijekom laktacije. Proizvodnja ljudskog XOR proteina je strogo regulirana i na transkripcijskoj i na posttranslacijskoj razini. Genetske mutacije koje uzrokuju gubitak aktivnosti XOR odgovorne su za ksantinuriju I i II koje mogu biti asimptomatske u primata, iako mogu potaknuti urolitijazu. XOR je prisutan u svim tipovima stanica, djelujući uglavnom kao dehidrogenaza i u većini slučajeva s niskom razinom aktivnosti. Tijekom filogeneze, XOR sisavaca je dobio važnu regulatornu funkciju proizvodnje ROS i NO. ROS utječu na redoks ravnotežu i posreduju u prijenosu signala kao sekundarni glasnici, dok NO ima složene interakcije s aktivnostima endotelne NADPH oksidaze i NO sintaze. Stoga je XOR uključen u mnoge biološke procese, kao što su upala, popravak i starenje, u fiziološke putove, kao što su rast stanica, diferencijacija i mobilnost, a također i u regulaciji endotelne funkcije i vaskularnog tonusa. S druge strane, XOR i njegovi produkti uključeni su u mnoga patološka stanja, a terapija inhibitorima XOR preporučuje se ne samo kod gihta, koji je uzrokovan viškom mokraćne kiseline u serumu, već i kod bubrežnih i kardiovaskularnih bolesti. Međutim, treba uzeti u obzir da inhibicija XOR-a i posljedično smanjenje urata, može uzrokovati mnoge štetne učinke, zbog smanjenja fizioloških funkcija XOR-a. (1)

1.1. Struktura enzima

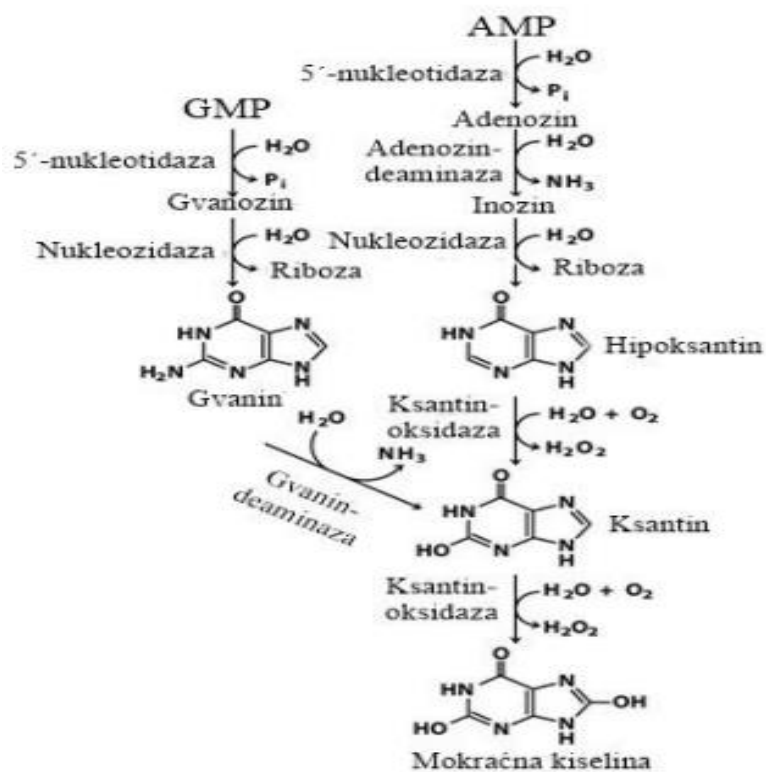
Strukturalna organizacija ksantin-oksidadaze je prilično složena. Enzim ima dimernu strukturu, a kada se razdvoji na monomere, otkriva se da svaki od njih pojedinačno ima katalitičku aktivnost. Molekulska masa enzima, određena PAGE elektroforezom, iznosi 283 kDa. Svaki monomer se sastoji od tri podjedinice povezane disulfidnim vezama. Molekulska masa podjedinica, određena istom metodom, je 135, 120 i 40 kD. Enzim sadrži FAD kovalentno vezan za svoj proteinski dio. Za svaki monomer postoji jedna molekula FAD. Proteinski dio enzima je bogat cisteinom i sadrži 60-62 slobodne -SH grupe. Struktura ksantin-oksidadaze sadrži i željezo-sumporove centre sa tipom klastera 2Fe-2S. Pokazalo se da sastav ksantin oksidaze po svakom monomeru uključuje i jednu persulfidnu grupu (-S-SH), koja moguće služi za vezivanje molibdena. U toku istraživanja ustanovljeno je da pterin i persulfidna grupa nisu direktno uključeni u katalitičko djelovanje. U homogenom stanju, enzim se brzo inaktivira zbog konformacijskih promjena zbog prisustva velikog broja slobodnih SH grupa. Pokazalo se da enzim može postepeno gubiti molibden. Aktivnost ksantin-oksidadaze i ksantin-dehidrogenaze direktno ovisi o sadržaju molibdena u tijelu. (2)



Slika 2. Kristalografska struktura (monomer) XO: označeni su obrubljeni FAD (crveni), FeS-klaster (narančasti), molibdopterin kofaktor s molibdenom (žuti) i salicilatom (plavi). (3)

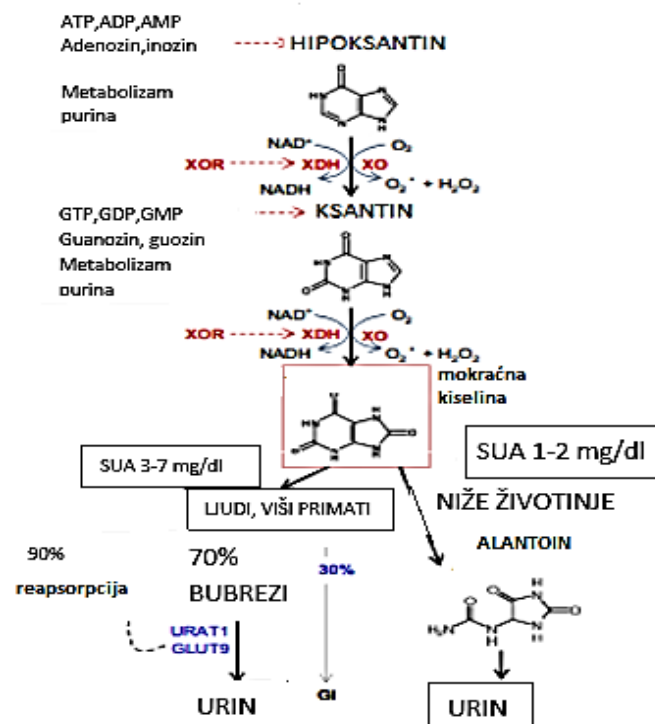
1.2 Metabolizam purinskih baza

Put razgradnje purinskih nukleotida započinje djelovanjem enzima 5'-nukleotidaze koja uklanja fosfatnu skupinu s purina. Monofosfati AMP, GMP i IMP se pretvaraju u svoje nukleozidne oblike odnosno adenzin, gvanozin i inozin. Adenzin deaminacijom pomoću adenzindeaminaze daje inozin koji se hidrolizira na hipoksantin i D-ribozu. Hipoksantin se oksidira u ksantin, a on u mokraćnu kiselinu enzimom ksantin-oksidadza dok je akceptor elektrona u reakciji molekularni kisik. Enzim ksantin-oksidadza generira reaktivne kisikove vrste, a u svojoj prostetičkoj skupini sadrži atom molibdena i četiri željezo-sumpor centra. Kao i AMP, i GMP na kraju razgradnje daje mokraćnu kiselinu. Razgradnja počinje hidrolizom do gvanozina koji daljnjom hidrolizom daje slobodni gvanin. Deaminacijom gvanina odnosno hidrolitičkim uklanjanjem amino skupine dobiva se ksantin koji se oksidira u mokraćnu kiselinu ksantin-oksidadzom. (4)



Slika 3. Razgradnja purinskih nukleotida (4)

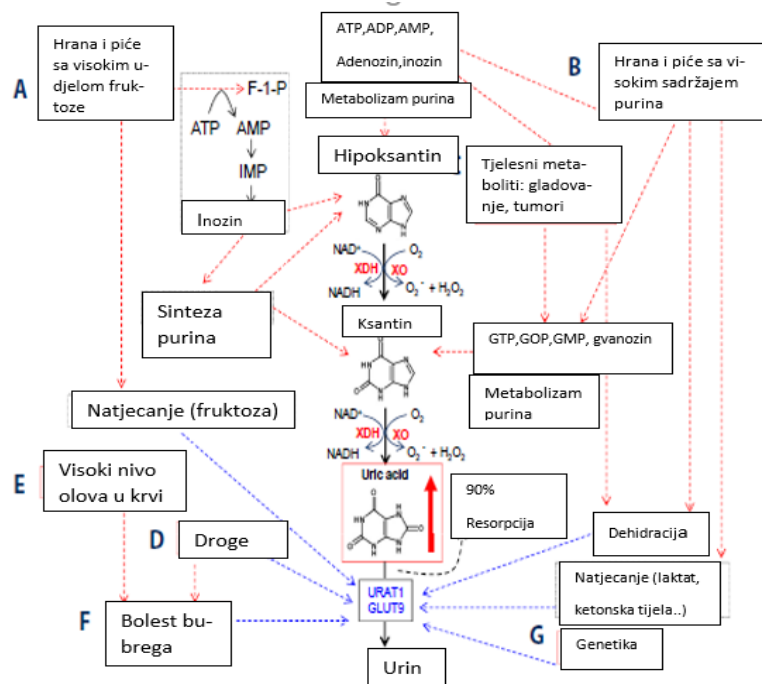
Koncentracija mokraćne kiseline u serumu (SUA) značajan je parametar za ljudsko zdravlje. Promijenjena homeostaza SUA povezana je s nizom bolesti. Na primjer, abnormalno visoka razina SUA, nazvana hiperurikemija, temeljni je uzrok gihta i povezana je s kardiovaskularnom bolešću, hipertenzijom i bolesti bubrega. Mokraćna kiselina (2, 6, 8-trioksupurin) heterociklički je derivat purina molekulske mase 158 Da. Slaba je kiselina čija je topljivost u vodi relativno niska i osjetljiva je na temperaturu. Točka zasićenja mokraćne kiseline je $392 \mu\text{mol/L}$ ($6,6 \text{ mg/dl}$) na 37°C i pH 7.4. Kod ljudi i viših primata, mokraćna kiselina je produkt konačne oksidacije (razgradnje) purina (adenina i gvanina). URAT1 resorbira urate i izlučuje spojeve kao što su laktat, ketonska tijela i ksenobiotik kroz postupak protutransporta. Međutim, u nižih životinja kao što su štakori i miševi, enzim urikaza dalje oksidira mokraćnu kiselinu u alantoin, koji je 100 puta topljiviji u vodi od mokraćne kiseline i ima učinkovitije izlučivanje urinom. Ljudima i višim primatima nedostaje funkcionalni gen urikaze. (5)



Slika 4. Proizvodnja i uklanjanje mokraćne kiseline kod ljudi i miševa (5)

U modernom dobu visoke razine mokraćne kiseline mogu biti poticaj za mnoge bolesti. Ljudi imaju značajno povećanu konzumaciju hrane bogate purinima, alkohola, bezalkoholnih pića zaslađenih fruktozom što za posljedicu ima prekomjernu proizvodnju

mokraćne kiseline. S druge strane hiperurikemija može biti rezultat premalog izlučivanja mokraćne kiseline zbog bubrežne disfunkcije ili utjecaja određenih lijekova. (5)



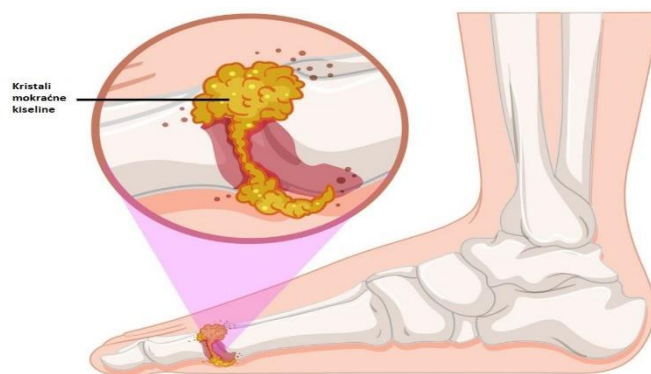
Slika 5. Glavni uzroci hiperurikemije. **(A)** Visoki unos hrane i pića s visokim udjelom fruktoze, koji povećavaju proizvodnju inozina i purina. Fruktoza se natječe s mokraćnom kiselinom za lučenje u bubrežima. **(B)** Visoki unos hrane i pića bogatih purinima. Više purina se metabolizira kako bi se proizvelo više mokraćne kiseline. Visoki unos alkohola (etanola) može povećati mliječnu kiselinu i ketone i uzrokovati dehidraciju, dok smanjuje uklanjanje mokraćne kiseline u bubrežima. **(C)** Promjena tjelesnog metabolizma. Izgladnjivanje može poboljšati tjelesni metabolizam vlastitih (purinima bogatih) tkiva za energiju. Kemoterapija može uzrokovati lizu tumora, povećavajući razgradnju purina i proizvodnju mokraćne kiseline (sindrom lize tumora). **(D)** Lijekovi. Neki lijekovi, poput antiurikozurika i diuretika, mogu smanjiti izlučivanje mokraćne kiseline iz bubrega. Lijekovi također mogu uzrokovati bubrežnu disfunkciju, što smanjuje izlučivanje mokraćne kiseline iz bubrega. **(E)** Povišene razine olova u krvi mogu uzrokovati disfunkciju bubrega i smanjiti izlučivanje mokraćne kiseline. **(F)** Mnoge različite vrste bubrežnih bolesti mogu utjecati na lučenje mokraćne kiseline. **(G)** Genetski čimbenici. Gen SLC2A9 kodira protein koji pomaže u transportu mokraćne kiseline u bubregu. Nekoliko jednonukleotidnih polimorfizama SLC2A9 utječe na lučenje mokraćne kiseline u bubrežima. (5)

1.3. Klinički značaj

Manipulacija ksantin-oksidadom u tijelu ima mnoštvo farmakoloških indikacija, a najznačajnija je ona za liječenje simptoma gihta. Giht je bolan oblik artritisa (upale zglobova) koji se javlja kada visoke razine mokraćne kiseline u krvi uzrokuju stvaranje kristala i njihovo akumuliranje u zglobovima i oko njih. (6)

Mokraćna kiselina nastaje kada tijelo razgrađuje purin. Purin se prirodno pojavljuje u našem tijelu, ali se također nalazi i u određenoj hrani. Mokraćna kiselina se uklanja iz tijela urinom. U slučajevima kada tijelo pojačano proizvodi mokraćnu kiselinu ili bubrezi ne uspijevaju eliminirati dovoljnu količinu ove kiseline, njezine razine u krvi se povećavaju. Stanje povećanih razina mokraćne kiseline u krvi naziva se hiperurikemija, a u slučaju kada se od viška kiseline počnu stvarati kristali to stanje se naziva giht. Najčešći simptomi gihta uključuju napade jake boli, osjetljivost, toplinu, crvenilo i oticanje zglobova. Najčešće se giht javlja na zglobu palca na nozi, no moguć je razvoj gihta i na drugim zglobovima: koljenu, zglobu stopala, zglobu šake, laktu i sl. Kristalne naslage mokraćne kiseline javljaju se kao kvрге pod kožom oko zglobova, a mogu se stvarati i u bubrežima te oblikovati bubrežne kamence. (6)

U slučaju sumnje da je osoba oboljela od gihta, liječnik uzima anamnezu i provodi pregled. Osim toga, radi se testiranje uzorka urina i test na hiperurikemiju. Za konačnu potvrdu gihta potreban je test uzorka zglobne (sinovijalne) tekućine iz pogođenog zgloba. Izlječenje gihta nije moguće, ali je moguća njegova kontrola. (6)

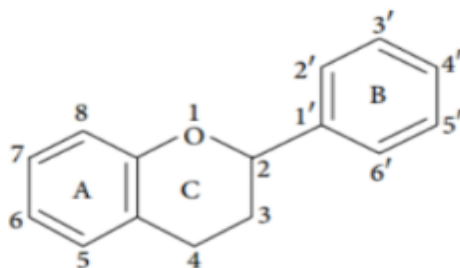


Slika 6. Kristali mokraćne kiseline (7)

1.4. Potencijalni iz prirode izolirani inhibitori enzima ksantin-oksida

1.4.1. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se mogu naći u biljkama, a sastoje se od petnaest ugljikovih atoma tipa C₆-C₃-C₆ odnosno dviju benzenskih jezgara povezanih propanskim lancem. Glavne skupine flavonoida su: flavoni, flavanoni, flavani, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini. Međusobno se razlikuju prema položaju prstena B, broju i položaju hidroksilnih i metoksi skupina, prisutnosti karbonilne skupine na C₄ atomu, oksidacijskom statusu prstena C, te vrsti, broju i položaju šećernih ostataka vezanih na aglikonsku strukturu. Najčešće dolaze u obliku glikozida, osim flavanola (flavonoidi čaja) koji dolaze u obliku aglikona. Na aglikonski dio najčešće su vezani šećeri D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-galakturonska kiselina i disaharid rutinoza (glukoza + ramnoza). (6) Flavonoidi su aktivni sastojci mnogih biljaka te ostvaruju različite farmakološke učinke kao što su: protuupalni, antioksidacijski, antineoplastični, antimikrobni i kardioprotektivni učinak. (8)



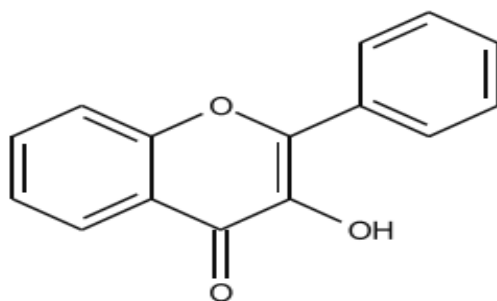
Slika 7. Osnovna struktura flavonoida (8)

U biljkama flavonoidi predstavljaju sekundarne metabolite te obavljaju nekoliko važnih funkcija. Do sada ih je iz biljaka izolirano više od 6000. Imaju sposobnost apsorpcije UV-zračenja, inhibiraju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, a također djeluju i na već stvorene ROS. Količina antioksidacijskog kapaciteta i sposobnost apsorpcije UV-zračenja ovisi o supstituentima na prstenovima flavonoida. Uglavnom su obojene tvari koje daju boju laticama, plodovima i katkad listovima stoga imaju važnu ulogu u

privlačenju oprašivača. Posrednici su u simbiotskom odnosu biljaka, uglavnom mahunarki i mikroorganizama odgovornih za fiksaciju dušika potrebnog za rast i razvoj biljaka. (8)

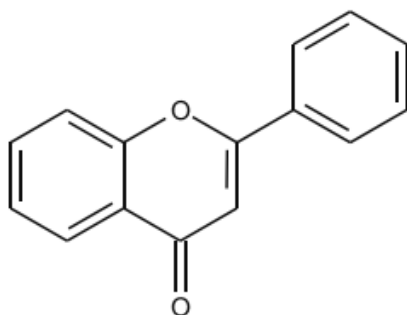
1.4.1.1 Podjela flavonoida

Flavonoli su prisutni u cijelom biljnom carstvu s izuzetkom gljiva i algi. Najčešći flavonoli, kemferol, kvercetin, izorhamnetin i miricetin tipično se nalaze kao glikozidi s konjugacijom koja se javlja na pozicijama 5, 7, 3', 4' i 5'. Iako je broj aglikona ograničen, postoji više od 200 šećernih konjugata kemferola. (9)



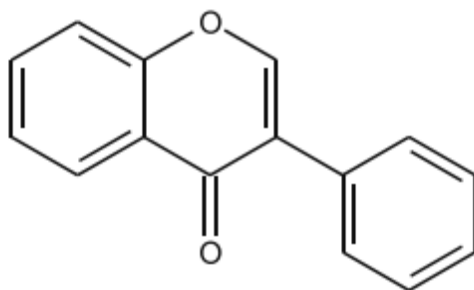
Slika 8. Struktura flavonola (9)

Flavoni, kao što su apigenin, luteolin, wogonin i baicalein, strukturno su slični flavonolima, osim što nemaju oksigenaciju na C-3. S flavonima je moguć širok raspon supstitucija, uključujući hidroksilaciju, metilaciju, O- i C - glikozilaciju i alkilaciju. Općenito, flavoni nisu široko rasprostranjeni, iako su značajne količine otkrivene u celeru, peršinu i nekim biljkama. (7)



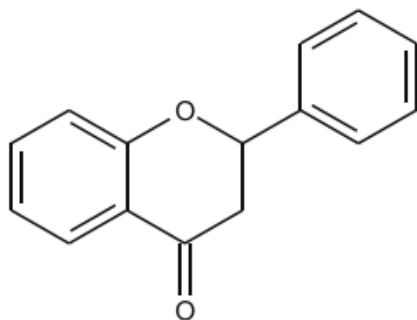
Slika 9. Struktura flavona (9)

Izoflavoni imaju B-prsten vezan na C-3, a ne na C-2 položaj (Sl. 10). Nalaze se gotovo isključivo u mahunarkama sa značajnim količinama daidzeina i genisteina koji se pojavljuju u soji. Fermentirani proizvodi od soje mogu biti bogati aglikonima kao rezultat hidrolize glikozida, dok proizvodi čija proizvodnja uključuje zagrijavanje, poput sojinog mlijeka i tofua, sadrže smanjene količine izoflavona, uglavnom u obliku daidzein i genistein glukozida, koji nastaju kao rezultat razgradnje malonil- i acetilglukozida. Zbog svoje strukturne sličnosti s estrogenom, izoflavoni su klasificirani kao fitoestrogeni, kao i neflavonoidni lignani, koji su raznolika skupina spojeva koji se pojavljuju u visokim koncentracijama uglavnom u žitaricama. (9)



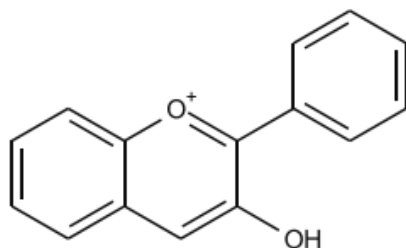
Slika 10. Struktura izoflavona (9)

Flavanoni kao što su naringenin i hesperetin karakterizira nepostojanje dvostruke veze i prisutnost kiralnog centra na C-2. U posebno visokim količinama prisutni su u agrumima, tako je hesperatin odgovoran za okus naranče, a naringenin za gorak okus grejpa. (9)



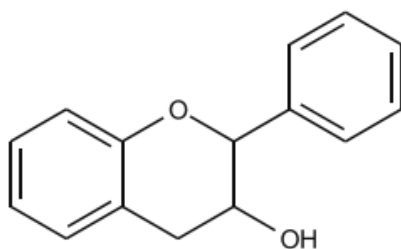
Slika 11. Struktura flavanona (9)

Najčešći antocijanidinski aglikoni su pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin, koji tvore konjugate sa šećerima i organskim kiselinama kako bi proizveli mnoštvo antocijana različitih boja, u rasponu od narančaste i crvene do plave i ljubičaste, i kao posljedica toga, lako su vidljivi u voću i cvijeću. (9)



Slika 12. Struktura antocijanina (9)

Flavan-3-oli, neobično, ne postoje u biljkama pretežno kao glikozidi. Oni su najsloženija potklasa flavonoida, u rasponu od jednostavnih monomera do oligomernih i polimernih proantocijanidina, koji su također poznati kao kondenzirani tanini. Dva kiralna centra na C2 i C3 monomernog flavan-3-ola proizvode četiri izomera za svaku razinu hidroksilacije B-prstena, od kojih su dva, (+)-katehin i (-)-epikatehin, široko rasprostranjena u prirodi, dok drugi kao što je (-)-epiafzelehin imaju ograničeniju distribuciju. (9)



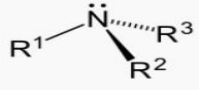
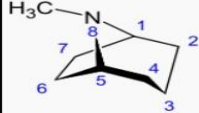
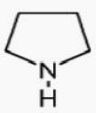
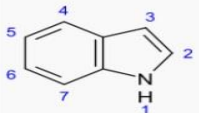
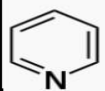
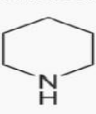
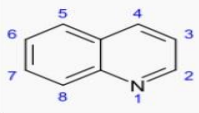
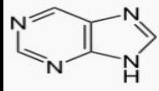
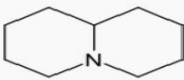
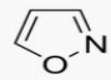
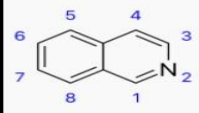
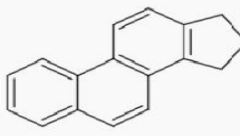
Slika 13. Struktura flavan-3-ola (9)

1.4.2. Alkaloidi

Alkaloidi, prirodni organski spojevi koji sadrže dušik, obično su unutar heterocikličkog prstena. Sekundarni su metaboliti živih organizama i fiziološki su aktivni. Poznato je više od 5000 alkaloida, koji su vrlo raznolike i složene strukture i gotovo svi kemijski reagiraju kao baze, pa s kiselinama daju kristalizirane soli. Nalaze se u biljnom svijetu, u kojem nastaju sintezom iz jednostavnih aminokiselina. Neki alkaloidi izolirani su i iz drugih organizama. Vrlo su rijetki u sisavaca, insekti ih stvaraju kao obrambene tvari, proizvode ih i morski organizmi, a i mnoge gljivice, pa se tako može kontaminirati hrana jer su neki od tih alkaloida neurotoksini. Iz biljnog ili životinjskoga tkiva izoliraju se prevođenjem u kiselu vodenu otopinu, a zatim ekstrakcijom i separacijom (npr. kromatografijom). (10)

Mnogostruko fiziološko i farmakološko djelovanje alkaloida na ljudski organizam oduvijek je pobuđivalo zanimanje i od davnina je poznata primjena biljnih ekstrakata kao lijekova i otrova. Mnogi današnji lijekovi sadrže te spojeve ili sintetičke analoge. (10)

1.4.2.1. Kemijska podjela alkaloida

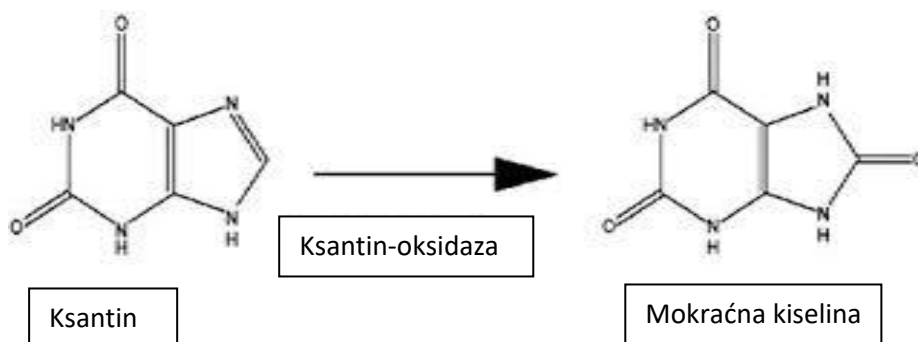
Skupina	Skupina	Skupina
Aminoalkaloidi 	Tropanski alkaloidi 	Pirolidinski alkaloidi 
Indolski alkaloidi 	Piridinski alkaloidi 	Piperidinski alkaloidi 
Kinolinski alkaloidi 	Purinski alkaloidi 	Kinolizidinski alkaloidi 
Izoksazolinski alkaloidi 	Izokinolinski alkaloidi 	Steroidni alkaloidi 

Slika 14. Kemijska podjela alkaloida (11)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

Sposobnost inhibicije enzima ksantin-oksidaza (XO) ekstraktima ili sastavnicima ekstrakata dobivenih iz biljnog materijala testira se spektrofotometrijski. Sve korištene metode temelje se na principu prevođenja ksantina, kao supstrata u mokraćnu kiselinu uz enzim XO. Detekcijom količine nastalog produkta (mokraćne kiseline) prati se i enzimska aktivnost, odnosno inhibicija.

Ovdje je opisana metoda koja se koristila u znanstvenom radu Abdullahi i sur. 2012. godine. (12)



Slika 15. Pretvorba ksantina u mokraćnu kiselinu uz katalitičku aktivnost enzima XO (12)

Otopina za ispitivanje sastoji se od 1 mL uzorka (5-100 $\mu\text{g/ml}$); 2,9 ml fosfatnog pufera (pH 7,5) i 0,1 ml otopine enzima XO koji je pripremljen neposredno prije upotrebe. Otopina se inkubira na 25 $^{\circ}\text{C}$ tijekom 15 minuta. Reakcija započinje dodatkom 2 ml otopine supstrata, nakon čega se opet inkubira na 25 $^{\circ}\text{C}$ 30 minuta. Reakcija se zaustavlja dodatkom 1 ml 1M HCl, a apsorbancija se mjeri na 290 nm pomoću UV spektrofotometra. Različite koncentracije frakcija otopljene su u dimetilsulfoksidu (DMSO) konačne koncentracije 5 %, što nije utjecalo na enzimski test. Provedena je kontrola s DMSO. Kao pozitivna kontrola korišten je alopurinol (5-100 $\mu\text{g/ml}$) poznati inhibitor XO. (12)

Postotak inhibicije mjeri se pomoću formule:

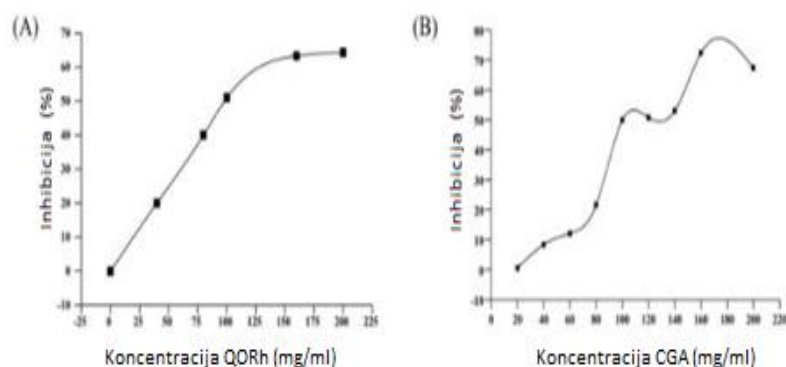
$$\% \text{ Inhibicije} = (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}}) / A_{\text{kontrola}} \times 100$$

Iz dobivenih rezultata se može izračunati IC_{50} vrijednost uzorka koja predstavlja koncentraciju tvari potrebnu da se inhibira 50 % enzima. Usporedbom s IC_{50} vrijednosti pozitivne kontrole može se zaključiti o inhibicijskom potencijalu testirane smjese tvari ili čistog spoja. Vrijednosti manje od one za pozitivnu kontrolu ukazuju da je sposobnost inhibicije uzorka bolja, dok vrijednosti veće od one za pozitivnu kontrolu ukazuju da je sposobnost inhibicije uzorka slabija.

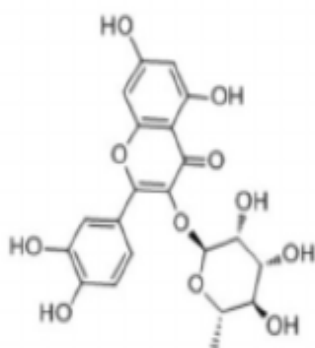
3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije enzima ksantin-oksidade prirodnim spojevima izoliranih iz biljaka. XO je enzim koji ima važnu ulogu u metabolizmu purinskih baza i samim tim u patogenezi gihta. Obzirom da lijekovi koji se koriste u liječenju ove bolesti sadrže i stanovite nuspojave neprestalno se traže iz prirode izolirani inhibitori ovog enzima s ciljem moguće prevencije i / ili tretmana gihta. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Pri pretraživanju stručnih i znanstvenih članaka korištene su sljedeće ključne riječi: *Xanthine oxidase, natural inhibitors, plant extracts, flavonoids*

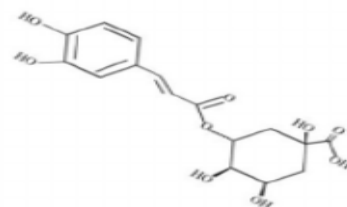
Xin Li i suradnici (13) su 2022. objavili rezultate istraživanja inhibicije enzima ksantin-oksidade spojevima iz etil acetatnog ekstrakata biljke *Smilax china*. Osušeni korijen *Smilax china* L. nabavljen je od Simcere Drugstore (Nanjing, Kina). Ekstrakt je razdijeljen sukcesivno s petroleterom (PE), kloroformom, etil acetatom (EtOAc), *n*-butil alkoholom (*n*-BuOH) i frakcijama rafinata. Među njima je frakcija EtOAc imala najveću inhibicijsku aktivnost prema XO. Kvercetin-3-O-ramnozid (QORh) i klorogenska kiselina (CGA) izolirani su iz etil-acetatne frakcije i ispitani na sposobnost inhibicije XO (pripremljene su različite koncentracije od 0, 40, 80, 120, 160 i 200 µg/ml). U ovom radu, XO inhibicijska aktivnost QORh i CGA procijenjena je UV-Vis spektrofotometrijom. Vrijednost IC_{50} za QORh iznosila je 99,22 µg/ml, a maksimalna inhibicija QORh od 64,29% dosegla je pri koncentraciji 200 µg/ml, a zatim je pokazala stabilan trend. CGA je pokazao inhibicijsku aktivnost na XO s $IC_{50}=99,47$ µg/ml. Inhibicijska aktivnost postupno je rasla s povećanjem koncentracije CGA. Maksimalna stopa inhibicije XO je na približno 60% ~ 70%. (13)



Slika 16. Inhibicijski učinak kvercetin-3-O-ramnozida (QORh) i klorogenske kiseline (CGA) na enzim ksantin oksidazu (XO) (13)



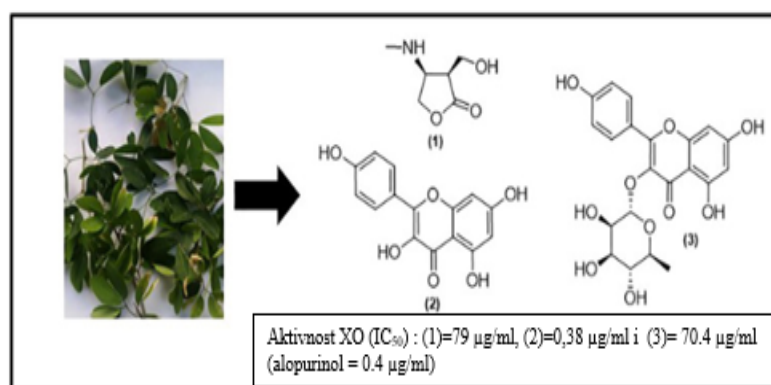
Slika 17. Struktura QORh (13)



Slika 18. Struktura CGA (13)

Watsika Wichaidit i Panumart Thongyoo su 2021. god. (14) objavili rezultate ispitivanja metanolnog ekstrakta biljke *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth i spojeva koji dolaze u ovom ekstraktu na inhibiciju enzima XO. Listovi *P. dulce* prikupljeni su iz Nacionalnog parka Hoey Sai, provincija Prachuabkirikhun, Tajland, u travnju 2013. Prvo, listovi *P. dulce* sakupljeni su i sušeni na zraku. Potom je provedeno usitnjavanje i ekstrakcija maceracijom pomoću metanola na sobnoj temperaturi dva tjedna. Metanolni ekstrakt je zatim koncentriran *in vacuo* i naknadno ispitan na XO inhibicijsku i antibakterijsku aktivnost protiv bakterijskih sojeva. Prema preliminarnim rezultatima inhibicije, otkriveno je da metanolni ekstrakt ima obećavajuću aktivnost inhibitora XO (50 µg/ml). Metanolni ekstrakt je izoliran korištenjem kombinacije Sephadex LH-20 i kromatografije na stupcu silikagela. Izolirani spojevi iz metanolnog ekstrakta testirani su na sposobnost inhibicije XO spektrofotometrijski na 290 nm, metodom koju je objavio Noro (Noro et

al. 1983). Aktivnost enzima je testirana kao $\Delta\text{Abs}_{295}/\text{min}$ korištenjem UV-spektrofotometra. Kao pozitivna kontrola korišten je alopurinol, poznati inhibitor XO. Novi 3-(hidroksimetil)-4-(metilamino)-dihidrofuran-2(3H)-on (**1**) izoliran je po prvi put iz lišća *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth., zajedno s kempferolom (**2**) i kempferol-3-ramnosid (**3**). Njihove su strukture razjašnjene prvenstveno na temelju analize MS i NMR podataka. Uočeno je (**1**) pokazuje inhibicijsku aktivnost XO s IC_{50} od 79 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dok (**2**) i (**3**) pokazuju IC_{50} vrijednosti od 0,38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 70,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ u odnosu na onu za alopurinol ($\text{IC}_{50} = 0,4 \mu\text{g}/\text{ml}$). (14)



Slika 19. Kemijska struktura i inhibicijski učinak na enzim XO spojeva izoliranih iz metanolnog ekstrakta biljke *Pithecellobium dulce* (Roxb.) (14)

Martins de Sá Müller i suradnici (15) su 2019. godine objavili rezultate istraživanja nadzemnih dijelova *Lychnophora pinaster* Mart. prikupljenih u Itabiritu, Brazil, te osušenih u pećnici s cirkulacijom zraka na 40 °C i usitnjeni u prah. Suhi i usitnjeni nadzemni dijelovi (2,4 kg) iscrpno su ekstrahirani perkolacijom s heksanom (EHL). Drugi dio biljnog materijala (2,0 g) iscrpno je ekstrahirano perkolacijom s etanolom. Etanol je uklonjen pod smanjenim tlakom što je rezultiralo osušenim sirovim etanolnim ekstraktom (EEL, 265,0 g). EEL je korišten za procjenu HPLC-om, za „fingerprint“ analizu i za biološke testove za procjenu antihiperurikemijske i protuupalne aktivnosti. EHL je podvrgnut kromatografskoj frakcionaciji za izolaciju *E*-lihnoforne kiseline. Aktivnost enzima XO određena je spektrofotometrijski praćenjem stvaranja mokraćne kiseline iz ksantina, kako su prethodno opisali Ferraz-Filha et al. (2016) (15)

Zhang i suradnici su 2019. godine (16) objavili rezultate testiranja učinka alkaloida izoliranih iz biljke *Erythrina arborescens* na enzim XO. Listovi *Erythria arborescens Roxburgh* skupljeni su u rujnu 2014. godine u provinciji Yunnan, Kina. Testirane otopine koncentracija 50 mg/ml pripremljene su dodavanjem ksantina (konačna koncentracija 29,2 mg/ml). Proizvodnja mokraćne kiseline izračunata je prema rastućoj apsorbanciji pri 290 nm. Alkaloidi 1-38 su testirani na inhibicijsku aktivnost XO s alopurinolom kao pozitivnom kontrolom od kojih su najznačajniji bili eritrivarin H-I (1,2), turkomanidin (21) izoboldin (26), eritaborin A (37) i eritaborin B (38). (16)

Tablica 1. Inhibicijski učinak alkaloida izoliranih iz biljke *Erythrina arborescens* na enzim XO

Spoj	IC₅₀ (µg/ml)
eritrivarin H	5,3
eritrivarin I	4,6
turkomanidin	2,7
izoboldin	2,4
eritaborin A	4,1
eritaborin B	4,2
alopurinol	0,60

Bao-Bao Shi i suradnici (17) su u listopadu 2019. godine objavili rezultate istraživanja inhibicije ksantin oksidaze alkaloidima biljke *Tabernaemontana bufalina*. Lišće i grančice prikupljeni su u veljači 2017. tijekom sušne sezone u Changjiangu, provinciji Hainan, NR Kina. Kao rezultat kemijskog ispitivanja alkaloidne frakcije iz biljne vrste *T. bufalina*, identificirano je 78 alkaloida. Aparicin (5) je pokazao snažne inhibicijske učinke prema XO, s IC₅₀ od 0,65 µM, što je gotovo jednako onom referentnog spoja, alopurinola IC₅₀ = 0,60 µM. (17)

Tablica 2. Inhibicijski učinak alkaloida izoliranih iz biljke *Tabernaemontana bufalina* na enzim XO

Spoj	IC ₅₀ (μM)
Spoj 3	43,67
Spoj 4	34,34
Aparacin (5)	0,65
Taberdivarin G (18)	6,50
10-hidroksiheineanin (24)	16,54
Vobasin (37)	10,24
Pandolin (55)	8,52
Konofilin (68)	6,83
Alopurinol	0,60

Perera i suradnici (18) su 2018. godine objavili rezultate istraživanja inhibicijskog učinka etanolnih ekstrakata biljaka sa Šri Lanke na enzim XO. Biljke su prikupljene u Gampaha, Šri Lanka. Inhibicijska aktivnost etanolnih biljnih ekstrakata na ksantin-oksidazu određena je kinetičkom metodom uz male modifikacije. Praćena je apsorpcija uz promjenu apsorbanije na $\lambda = 295$ nm tijekom 15 min na 25 °C. Alopurinol je korišten kao referentni standard. Svi ekstrakti su pokazali određeno inhibicijsko djelovanje na enzim ksantin oksidazu u rasponu od $6,26 \pm 0,93$ do $70,74 \pm 0,95$ %. Rezultati su pokazali da etanolni ekstrakt kore biljke *Flacourtia indica* ima najveću inhibicijsku aktivnost, a slijede ga ekstrakti *Symplocos cochinchinesis* i *Callophyllum innophyllum*. Ekstrakti *Acronychia pedunculata* L. i *Argyreia populifolia* Choisy pokazali su značajno nisku inhibicijsku aktivnost na enzim ksantin-oksidazu u odnosu na referentni standard alopurinol. (18)

Tablica 3. Inhibicijski učinak etalnonih ekstrakata biljaka sa Šri Lanke na enzim ksantin oksidazu

Biljka	Inhibicija ksantin oksidaze (%)*
<i>Sphaeranthus indicus</i>	30,35±0,32
<i>Acronychia pedunculata</i>	7,86±0,14
<i>Calophyllum innophyllum</i>	38,95±1,28
<i>Symplocos cochinchinesis</i>	44,86±1,43
<i>Tinospora cordifolia</i>	17,92±1,73
<i>Flacourtia indica</i>	70,46±0,18
<i>Leucus zeylanica</i>	13,26±0,25
<i>Barathranthus nodiflorus</i>	6,26±0,93
<i>Diospyros ebenum</i>	24,76±2,16
<i>Argyreia populifolia</i>	32,79±2,16
Alopurinol	99,26±0,72

*Inhibicija (%) ksantin oksidaze testirana je kod koncentracije ekstrakta od 250 µg/ml.

Orsohya Roza i suradnici (19) su 2016. godine objavili rad u kojem su predstavljeni rezultati istraživanja inhibicije enzima ksantin oksidaze flavonoidima metanolnih ekstrakata biljke *Cyclopia genistoides*. Biljka je prikupljena blizu Bredasdorpa u Južnoj Americi. Inhibicijska aktivnost XO mjerena je korištenjem protokola koji je preporučio Sigma-Aldrich (19), prilagođen testnom volumenu od 300 µL. XO je izoliran iz goveđeg mlijeka, kao pozitivna kontrola korišten je alopurinol. U ovom radu prikazana je kemijska analiza metanolnih ekstrakata lišća i stabljike *C. genistoides*. Pročišćavanje ovih frakcija dovelo je do izolacije luteolina i diosmetin, koji ima izvanredan inhibicijski učinak na XO s IC₅₀ vrijednostima od 0,84 µM. Inhibicijska aktivnost oba spoja značajno je premašila aktivnost alopurinola, koji je korišten kao pozitivna kontrola IC₅₀ (alopurinol) = 11,50 µM. Dva strukturno bliska flavanona, hesperetin i 5,7,3',5'-tetrahidroksiflavon, pokazali su slabu inhibiciju IC₅₀ = 55,20 µM i 120,55 µM. (19)

Tablica 4. Sposobnost inhibicije enzima ksantin oksidaze flavonoidima metanolnih ekstrakata biljke *Cyclopia genistoides*

Spoj	IC₅₀ µg/ml	CI(95%)	IC₅₀ µM	CI (95%)
diosmetin	0,16	0,12-0,24	0,53	0,40-0,80
luteolin	0,24	0,23-0,26	0,84	0,80-0,91
5,7,5',7' - tetrahidroskif lavon	34,75	29,32-41,18	120,55	101,71-142,86
hesperetin	16,69	12,52-22,24	55,20	41,40-73,55
alopurinol	1,50	1,40-1,60	11,02	10,29-11,76

CI- intervali pouzdanosti (95%)

Burcu S. Tüzüna i suradnici (20) su 2016. godine objavili rad u kojem je testirana sposobnost inhibicije enzima ksantin oksidaze ekstraktima biljke *Centaurea virgata Lam.* Biljka je prikupljena u lipnju 2011. godine u Elazigu u Turskoj. Cilj je bio odrediti aktivnost XO iz metanolnog ekstrakta i njegovih pod ekstrakata (*n*-heksan, CHCl₃) pripremljenih iz biljke. Umjereno djelovanje pokazao je CHCl₃ ekstrakt (98,9 ± 15,8 µg/ml) pa su analizirani sastojci ovog ekstrakta. Inhibicijska aktivnost XO mjerena je korištenjem protokola koji je preporučio Sigma-Aldrich (20), prilagođen testnom volumenu od 300 µL. Inhibitorna vrijednost analizirana je upotrebom alopurinola kao pozitivne kontrole (IC₅₀ = 7,49 ± 0,29 µM). Izolirani spojevi apigenin (IC₅₀ = 0,99 ± 0,33 µM) i hispidulin (IC₅₀ = 4,88 ± 1,21 µM) pokazali su značajni inhibitorni učinak. (20)

Tablica 5. Rezultati inhibicije XO spojevima izoliranih iz metanolnog ekstrakta te iz njega izoliranih podestrakata biljke *Centaurea virgata Lam.*

Spoj	Inhibicija % (20 g/ml)	IC ₅₀ (μ M) \pm SD
8 -sončukarpolid (1)	na	-
8-(3,4-dihidroksi-2-metilen-butanoiloksi)-dehidromelenzin (2)	na	-
Cnicin (3)	3,56 \pm 2,60	-
Apigenin (4)	96,07 \pm 4,25	0,99 \pm 0,33
Hispidulin (5)	87,78 \pm 0,90	4,88 \pm 1,21
Salvigenin (6)	Na	-
Eupatorin (7)	15,13 \pm 6,70	-
3-metileupatorin (8)	44,69 \pm 6,52	276,07 \pm 31,67
Izokempferid (9)	42,39 \pm 6,45	187,57 \pm 9,44
Alopurinol	-	7,49 \pm 0,29

na=nije aktivan

Jayaray i suradnici (21) su 2014. godine objavili rezultate istraživanja inhibicije enzima XO flavonoidima iz biljke *Spilanthes calva*. Biljka *S. calva* prikupljena je u lipnju 2010. godine u Indiji. Aktivnost XO ispitivana je spektrofotometrijski u aerobnim uvjetima korištenjem ksantina kao supstrata. (22) Iz etanolnog ekstrakta izoliran je flavonoid 6-3(metilbut-1-enil)-5,7-dimetoksi-4'-hidroksiflavon čija je aktivnost određena usporedbom sa standardnim alopurinolom (5-100 μ g/ml). Rezultat je pokazao da je izolirani flavonoid pridonio dobroj inhibiciji etanolnog ekstrakta (IC₅₀ = 16,56 \pm 2,34 μ M), dok je za alopurinol IC₅₀ = 3,42 \pm 0,56 μ M. (21)

Tablica 6. Inhibicijska aktivnost flavonoida izoliranog iz biljke *Spilanthes calva* na enzim ksantin oksidazu

Spoj	IC ₅₀ (μ M)
6-3(metilbut-1-enil)-5,7-dimetoksi-4'-hidroksiflavon (1)	16,56 \pm 2,34
Alopurinol	3,42 \pm 0,56

Orsolya Orbán-Gyapai i suradnici (23) su 2014. godine objavili rezultate inhibicijskog potencijala ekstrakata biljaka porodice Polygonaceae na enzim XO. Biljni materijali su skupljeni u nekoliko regija Karpatskog bazena (Hrvatska, Mađarska, Rumunjska) u razdoblju cvatnje od lipnja do rujna 2010. godine. Inhibicijska aktivnost XO vodenih i organskih ekstrakata 27 odabranih vrsta koje pripadaju u pet rodova (*Fallopia*, *Oxyria*, *Persicaria*, *Polygonum* i *Rumex*) obitelji Polygonaceae koje žive u Karpatskom bazenu ispitana je *in vitro*. Od različitih biljnih dijelova (nadzemni dijelovi, listovi, cvjetovi, plodovi i korijenje) ekstrakcijom metanola i vruće H₂O, te podjelom otapalo-otapalo ekstrakta MeOH dajući *n*-heksan, kloroform i 50% MeOH podekstraktima pripremljeno je ukupno 196 ekstrakata. Metoda za određivanje se temelji na modificiranom protokolu Sigmee-Adrich (23), kontinuiranom spektrofotometrijskom određivanju brzine. Utvrđeno je da kloroformski subekstrakt i/ili preostalih 50% MeOH ekstrakata vrste *Fallopia*, *Polygonum bistorta*, *Polygonum hydropiper* L., *Polygonum lapathifolium* L. i *Polygonum viviparum* pokazuju >85% inhibicije XO pri 400 µg/ml. (23)

Tablica 7. Inhibicijska aktivnost biljaka porodice Polygonaceae na enzim ksantin-oksidadazu

Biljka	IC ₅₀ (µg/ml ± SD)
<i>Polygonum bistorta</i>	33,40±0,87
<i>Polygonum hydropiper</i>	85,49±11,17
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	74,86±8,33
<i>Polygonum viviparum</i>	42,33±2,42

Hajdu i suradnici (24) su 2014. godine objavili rezultate istraživanja na temu inhibicijski učinak metanolnog ekstrakta i flavonoida biljke *Artemisia asiatica* na enzim XO. *A. asiatica* sakupljena je u rujnu 2008. godine u Vácraótótu, Mađarska. Sirovi MeOH i razdijeljeni ekstrakti (*n*-heksan, CHCl₃ i H₂O) nadzemnih dijelova *A. asiatica* ispitane su na XO-inhibicijsku aktivnost. Flavonoidi su izolirani iz aktivnog ekstrakta i identificirani kao eupatilin (1), hispidulin (2), jaceosidin (3), cirsilineol (4), 5,7,4',5'-tetrahidroksi-6,3'-dimetoksiflavon (5), 6-metoksitricin (6) i krizosplenetin (7). S iznimkom cirsilineola i krizosplenetina, svi ovi flavonoidi su pokazali izrazite XO-inhibicijske učinke. (24)

Tablica 8. Inhibicijska aktivnost metanolog ekstrakta i flavonoida biljke *Artemisia asiatica* na enzim ksantin oksidazu

Spoj	IC ₅₀ (µg/ml)
Metanolni ekstrakt <i>Artemisia asiatica</i>	2,93±0,80
eupatilin (1)	1,33±0,21
hispidulin (2)	4,88±1,21
jaceosidin (3)	3,27±0,31
cirsilineol (4)	-
5,7,4',5'-tetrahidroksi-6,3'- dimetoksiflavon (5)	2,59±0,35
6-metoksitricin (6)	6,13±0,34
krizosplenetin (7)	-
alopurinol	7,49 ±0,29

2012. godine Abdullahi i suradnici (12) su objavili rezultate istraživanja na temu inhibicije enzima XO frakcijama biljke *Crateva adansonii*. Biljni materijal se sastojao od osušenih i u prah samljevenih listova *C. adansonii* (obitelj Capparaceae). Lišće je prikupljeno oko Minne, država Nigerija, a enzim XO (izvor: govede mlijeko) je pročišćen iz govedeg mlijeka metodom Atmanija i suradnika. Hidrometanolni ekstrakt je zatim ekstrahiran uzastopno s jednakim volumenima petroletera, kloroforma i etil acetata. Svaka frakcija je potom koncentrirana pod sniženim tlakom kako bi se dobila petroleter frakcija (PEF), frakcija kloroforma (CF), frakcija etil acetata (EAF) i rezidualna frakcija (RF). Inhibicijska aktivnost XO ispitana je spektrofotometrijski koristeći postupak Owen i suradnici (22), a stupanj inhibicije enzima određen je mjerenjem porasta apsorbancije na 295 nm povezanog sa stvaranjem mokraćne kiseline. Kinetika enzima je provedena korištenjem Lineweaver-Burk dijagrama korištenjem ksantina kao supstrata. Fitokemijski pregled biljnog ekstrakta otkrio je prisutnost fenola, alkaloida, flavonoida i saponina. Među testiranim frakcijama, frakcija kloroforma pokazala je najveću sposobnost inhibicije XO (IC₅₀ = 20,2 ± 1,6 µg/ml), a zatim petroleter (IC₅₀ = 30,1 ± 2,2 µg/ml), etil acetat (IC₅₀ = 43,9 ± 1,4 µg/ml) i rezidualne (IC₅₀ = 98,0 ± 3,3 µg/ml) frakcije. IC₅₀ vrijednost korištenog alopurinola, kao standarda, bila je 5,7 ± 0,3µg/ml. (12)

Tablica 9. Fitokemijski sastav frakcija biljke *Crateva adansonii*

	Petroleter frakcija	Kloroform frakcija	Etilacetat frakcija
Alkaloidi	+	+	+
Fenoli	+	+	+
Tanini	-	-	-
Flavonoidi	+	+	+
Saponini	+	+	+
Karotenoidi	-	-	-
Ugljikohidrati	-	-	-
Glukozidi	-	-	-
Balzami	-	-	-

Tablica 10. Maseni udio i inhibicijski potencijal frakcija biljke *Crateva adansonii* na enzim ksantin oksidazu

Frakcija	Postotak inhibicije ksantin oksidaze	% (w/w)	IC₅₀(μg/ml)
Petroleter	-	1,8	30,1 \pm 2,20
Petroleter 5 μ g/ml	28,35 \pm 0,90	-	-
Petroleter 10 μ g/ml	39,53 \pm 1,20	-	-
Petroleter 25 μ g/ml	48,32 \pm 0,90	-	-
Petroleter 50 μ g/ml	66,73 \pm 1,57	-	-
Petroleter 100 μ g/ml	78,59 \pm 1,60	-	-
Kloroform	-	1,7	20,20 \pm 1,60
Kloroform 5 μ g/ml	19,55 \pm 1,30	-	-
Kloroform 10 μ g/ml	36,00 \pm 0,80	-	-
Kloroform 25 μ g/ml	55,00 \pm 1,00	-	-
Kloroform 50 μ g/ml	76,70 \pm 1,10	-	-
Kloroform 100 μ g/ml	84,7 \pm 50,50	-	-
Etil acetat	-	0,9	43,90 \pm 1,40
Etil acetat 5 μ g/ml	11,85 \pm 0,30	-	-
Etil acetat 10 μ g/ml	23,75 \pm 0,70	-	-
Etil acetat 25 μ g/ml	39,50 \pm 1,00	-	-
Etil acetat 50 μ g/ml	56,35 \pm 1,20	-	-
Etil acetat 100 μ g/ml	64,55 \pm 1,50	-	-

Ostatak	-	5,1	98,00±3,30
Ostatak 5 µg/ml	5,90±1,10	-	-
Ostatak 10 µg/ml	28,80±1,20	-	-
Ostatak 25 µg/ml	35,70±0,50	-	-
Ostatak 50 µg/ml	41,50±1,20	-	-
Ostatak 100 µg/ml	50,05±1,80	-	-
Alopurinol	-	-	5,70±0,30
Alopurinol 5 µg/ml	44,91±1,80	-	-
Alopurinol 10 µg/ml	66,91±0,80	-	-
Alopurinol 25 µg/ml	75,00±1,40	-	-
Alopurinol 50 µg/ml	85,46±0,80	-	-
Alopurinol 100 µg/ml	92,25±0,50	-	-

Nguyen i Nguyen su 2012. (26) godine objavili rezultate istraživanja inhibicije nadzemnih dijelova biljke *Blumea balsamifera* L. prikupljene u provinciji Lam Dona, Vijetnam u listopadu 2008. godine. Iz metanolnog (MeOH) ekstrakta nadzemnog dijela biljke izoliran je novi dihidroflavonol, (2R,3S)-(-)-4'-O-metildihidrokvercetin (1), zajedno sa sedam poznatih spojeva. Njihove su strukture bile razjašnjene na temelju spektroskopskih podataka. Inhibicijska aktivnost XO ispitana je spektrofotometrijski na 290 nm pod aerobnim uvjetima (Nguyen i sur., 2004.). Spojevi (2R,3S)-(-)-4'-O-metildihidrokvercetin(1), (2R,3R)-(+)-4'-ometildihidrokvercetin (2), (2R,3R)-(+)-4',7-di-O-metildihidrokvercetin (3), (2R,3R)-(+)-7-O-metildihidrokvercetin (4), kvarcetin (6), kvercetin-3,7,3'-trimetil eter (7) i kvercetin-3,3',4'-trimetil eter (8) pokazali su značajno inhibicijsko djelovanje na način ovisan o koncentraciji. Spojevi (2R,3S)-(-)-4'-O-metildihidrokvercetin (1), kvarcetin (6) i kvercetin-3,3',4'-trimetil eter (8) pokazali su snažniju inhibiciju s IC_{50} vrijednostima IC_{50} (1) = 0,23, IC_{50} (6) = 1,19, IC_{50} (8) = 1,18 µM u odnosu na alopurinol (IC_{50} = 2,50 mM). (26)

Tablica 11. Inhibicijski učinak spojeva izoliranih iz metanolnog ekstrakta biljke *Blumea balsamifera* na enzim ksantin oksidazu

Spoj	IC ₅₀ (μM)
(2R,3S)-(-)-4'-O-metildihidrokvercetin (1)	0,23±0,01
(2R,3R)-(+)-4'-ometildihidrokvercetin (2)	3,04±0,12
(2R,3R)-(+)-4',7-di-O-metildihidrokvercetin (3)	6,08±0,08
(2R,3R)-(+)-7-O-metildihidrokvercetin (4)	5,72±0,13
5,7,3',5'-tetrahidroksi flavanon (5)	>100
kvercetin (6)	1,91±0,02
kvercetin-3,7,3'-trimetil eter (7)	9,53±0,14
kvercetin-3, 3',4'-trimetil eter (8)	1,18±0,01
alopurinol	2,50±0,1

Ribeiro de Souza i suradnici (27) su 2012. godine objavili rezultate istraživanja nadzemnih dijelova biljke *Lychnophora trichocarpa* Spreng. prikupljenih u Minas Geraisu, Brazil, u listopadu 2006. godine. Aktivnost XO ispitana je spektrofotometrijski praćenjem stvaranja mokraćne kiseline iz ksantina, prema prethodno opisanoj metodi (Hall et al., 1990.) uz modifikaciju. (28) Etanolni ekstrakt *L. trichocarpa* (LTE), etil acetatna frakcija iz etanolnog ekstrakta (LTA) i izolirani spojevi procijenjeni su na aktivnost snižavanja urata i inhibiciju jetrene ksantin-oksidaze u miševa s oksonatom induciranom hiperurikemijom. Sirovi etanolni ekstrakt i njegova etil acetatna frakcija pokazali su značajne učinke snižavanja urata. LTE je također mogao značajno inhibirati aktivnost jetrene ksantin oksidaze *in vivo* u dozi od 250 mg/kg. Luteolin, apigenin, lupeol, lihnofolid i eremantolid C pokazali su antihiperurikemijsko djelovanje među testiranim spojevima. Apigenin je također pokazao aktivnost inhibicije XO *in vivo*. Luteolin, lihnofolid, lupeol i eremantolid C, nisu pokazali značajnu inhibicijsku aktivnost prema ovom enzimu, što ukazuje da ovaj mehanizam vjerojatno nije uključen u učinke tih spojeva na smanjenje urata. Također je utvrđeno da LTE, LTA, lupeol, β-sitosterol, lihnofolid, eremantolid, luteolin i apigenin inhibiraju edem šape izazvan kristalima mononatrijevog urata.(27)

Tablica 12. Učinci etanolnog ekstrakta *Lychnophora trichocarpa* (LTE), frakcije etil acetata (LTA) i čistih spojeva na aktivnost ksantin oksidaze u mišjoj jetri in vivo.

Liječenje	Doza (25 mg/kg)	XOD aktivnost (U/mg proteina)	Inhibicija (%)
Kontrola hiperurikemije	-	13,16±1,39	-
LTE	125	10,89±0,72	-
	250	8,58±1,07 **	34,8
LTA	62,5	13,03±0,73	-
	125	10,28±0,32	-
luteolin	25	12,04±0,37	-
apigenin	25	8,10±0,91 **	38,4
lupeol	25	14,54±0,54	-
β-sitosterol	25	12,70±0,91	-
eremantolid C	25	12,82±0,56	-
lihnofolid	25	10,89±1,07	-
alopurinol	25	1,91±0,12 ***	85,5

** = P < 0,01, *** P < 0,001 u usporedbi s hiperurikemijskom kontrolnom skupinom; U = nanomol mokraćne kiseline po minuti, LTE -Etanolni ekstrakt *L. trichocarpa*, LTA-etil acetatna frakcija iz etanolnog ekstrakta

Hudaib i suradnici (29) su 2011. godine objavili rezultate istraživanja na temu inhibicijski učinak metanolnog ekstrakta odabranih jordanskih ljekovitih biljaka na enzim XO. Biljni materijal odabranih vrsta prikupljen je iz različitih geografskih mjesta Jordana, tijekom razdoblja cvatnje ovih biljaka. Metanolni ekstrakti 23 ljekovite biljke, koje pripadaju 12 obitelji, testirani *su in vitro*, u koncentracijama od 200 µg/ml, na njihov inhibicijski potencijal XO. Inhibicijska aktivnost ekstrakta mjerenja je padom katalitičke brzine ksantin oksidaze nakon inkubacije s biljnim ekstraktima i korištenjem ksantina kao supstrata. Profili inhibicije ovisni o dozi najaktivnijih biljaka dodatno su procijenjeni procjenom IC₅₀ vrijednosti njihovih odgovarajućih ekstrakata, kao pozitivna kontrola korišten je alopurinol (IC₅₀ = 4,6 µg/ml). Utvrđeno je da je šest biljaka najaktivnije (% inhibicije više od 39%). Ove biljke su *Salvia spinosa* L. (IC₅₀ = 53,7 µg/ml), *Anthemis palestina* Boiss. (168,0 µg/ml), *Chrysanthemum coronarium* L. (199,5 µg/ml), *Achillea biebersteinii* Afansiev (360,0 µg/ml), *Rosmarinus officinalis* L. (650,0 µg/ml) i *Ginkgo biloba* L. (595,8 µg/ml). Štoviše, još četiri biljke, naime *Lavandula angustifolia* Mill. (28,7% inhibicije), *Helianthemum ledifolium* (L.) Mill. (28,4%), *Majorana syriaca* (L.) Kostel. (25,1%) i *Mentha spicata* L. (22,5%) pokazale su inhibicijsku aktivnost XO u rasponu od 22-30 %. (29)

Tablica 13. Inhibicijski učinak metanolnog ekstrakta odabranih jordanskih ljekovitih biljaka na enzim ksantin oksidazu

Naziv biljke	Inhibicija ksantin oksidaze (%)*
<i>Achillea biebersteinii</i> Afanasiev	45,0±0,7
<i>Anagallis arvensis</i> L.	1,6±0,2
<i>Anchusa italica</i> Retz	13,4±0,4
<i>Anthemis palestina</i> Reut. ex Boiss	51,5±1,5
<i>Artemisia herba-alba</i> Asso	16,2±0,3
<i>Calendula arvensis</i> L.	2,2±0,3
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	57,3±1,1
<i>Eryngium creticum</i> Lam.	4,5±0,3
<i>Fumaria densiflora</i> DC	7,3±0,6
<i>Ginkgo biloba</i> L.	39,2±0,7
<i>Glaucium aleppicum</i>	3,3±0,3
<i>Haplophyllum buxbaumii</i>	10,4±0,3
<i>Helianthemum ledifolium</i>	28,4±1,0
<i>Hypecoum dimidiatum</i> Delile	7,3±0,3
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	28,7±0,4
<i>Majorana syriaca</i> (L.) Kostel	25,1±0,8
<i>Mentha spicata</i> L.	22,5±0,9
<i>Ononis natrix</i> L.	11,8±0,9

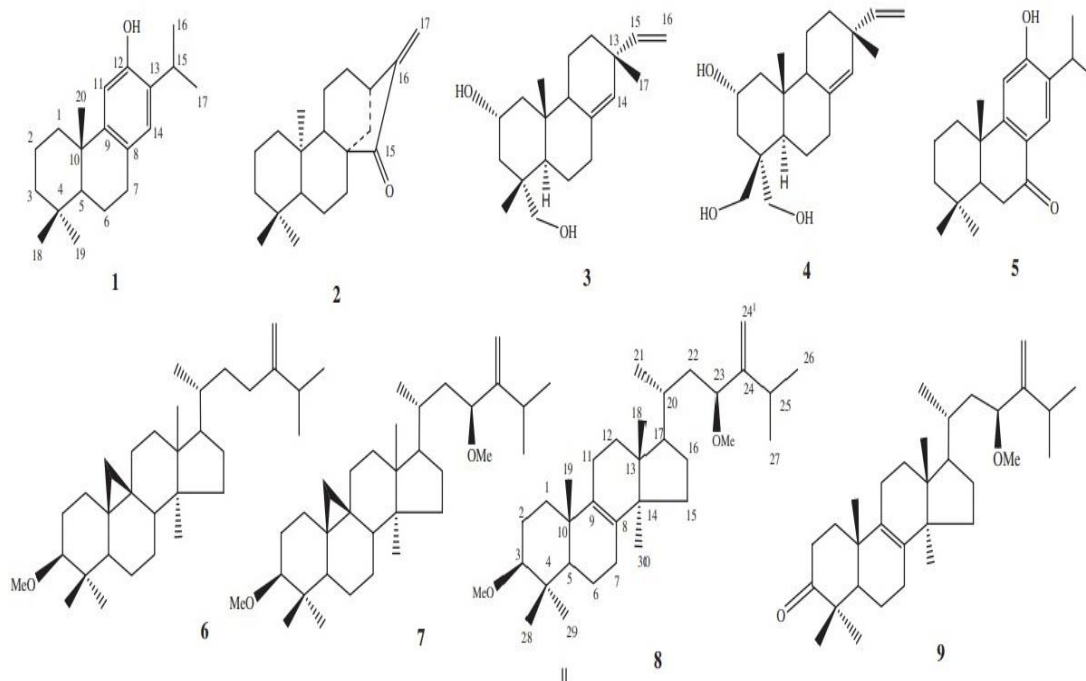
<i>Onosma gigantean</i> Lam.	-0,5±0,2
<i>Paronychia argentea</i> Lam	13,0±0,5
<i>Reseda lutea</i> L.	6,6±0,2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	42,0±1,2
<i>Salvia spinosa</i> L	71,5±1,7
Alopurinol	4,6

*Inhibicija (%) ksantin oksidaze testirana je kod koncentracije ekstrakta od 200 µg/ml.

Istraživanje koje su proveli Lin i suradnici (30) 2010. godine objašnjava učinak pojedinih terpena na enzim XO. Diterpenoidi (+)-feruginol (1), ent-kaur-16-en-15-on (2), ent-8(14),15-sandaracopimaradien 2a,18-diol (3), 8(14), 15-sandaracopimaradien-2a,18,19-triol (4) i (+)-sugiol (5) i triterpenoidi 3b-metoksicikloartan-24(241)-en (6), 3b,23b-dimetoksicikloartan-24(241)-en (7), 3b,23b-dimetoksi-5a-lanosta-24(241)-en (8) i 23(S)-23-metoksi-24-metilenelanosta-8-en-3-on (9), izolirani su iz biljke *Amentotaxus formosana*. Aktivnost XO ispitana je reakcijom enzima i ksantina kao supstrata, a apsorpcija je mjerena na 25°C prema protokolu Konga i dr. (27) Inhibicijski učinci spojeva (1-9) i alopurinola (pozitivna kontrola) proučavani su *in vitro*.

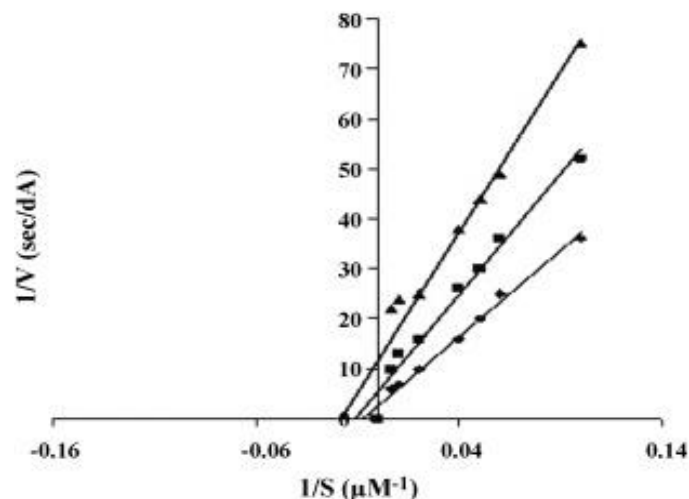
Tablica 14. Inhibicijski učinak spojeva izoliranih iz biljke *Amentotaxus formosana* na enzim XO

Spoj	IC ₅₀ (µM)
(+)-feruginol (1)	70,3±6,9
ent-kaur-16-en-15-on(2)	127±6,2
ent-8(14),15-sandaracopimaradien 2a,18-diol (3)	139,6±3,6
8(14), 15-sandaracopimaradien-2a,18,19-triol (4)	65,3±3,4
(+)-sugiol (5)	6,8±1,0
3b-metoksicikloartan-24(241)-en (6)	106,5±6,7
3b,23b-dimetoksicikloartan-24(241)-en (7)	79,4±4,2
3b,23b-dimetoksi-5a-lanosta-24(241)-en (8)	64,0±6
23(S)-23-metoksi-24-metilenelanosta-8-en-3-on (9)	67,3±0,9
alopurinol	2,0±0,7



Slika 20. Strukture izoliranih spojeva 1-9 (27)

Umamaheswam i suradnici (31) su 2009. godine objavili rezultate istraživanja inhibicije XO frakcijama biljke *Erythrina stricta*. Listovi biljke su prikupljeni u i oko okruga Coimbatore, Tamil Nadu, Indija tijekom mjeseca srpnja 2007. Enzim XO je izoliran iz mikroorganizama. Inhibicijska aktivnost ksantin oksidaze ispitana je spektrofotometrijski metodom (Owen i Johns, 1999.) u aerobnim uvjetima, a stupanj inhibicije enzima određen je mjerenjem porasta apsorbancije na 295 nm povezanog s stvaranjem mokraćne kiseline. Kinetika enzima je provedena korištenjem Lineweaver-Burk dijagrama korištenjem ksantina kao supstrata. Među testiranim frakcijama, frakcija kloroforma pokazala je najveću snagu ($IC_{50} = 21,2 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$), a zatim petroleter ($IC_{50} = 30,2 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$), etil acetat ($IC_{50} = 44,9 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$) i rezidualne ($IC_{50} = 100 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$) frakcije. Vrijednost IC_{50} za alopurinol (standard) bila je $6,1 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$. Mehanizam inhibicije enzima ukazuje da je način inhibicije mješovitog tipa. (31)



Slika 21. Lineweaver-Burk dijagram inhibicije ksantin oksidaze kloroformskom frakcijom *Erythina stricta* (■) i alopurinolom (▲). Simbol (◆) predstavlja negativnu kontrolu. (28)

Nguyen i suradnici (32) su 2006. godine objavili rezultate istraživanja osušenih cvijetova *Chrysanthemum sinense* sakupljenih u gradu Nha Trang, Vijetnam u travnju 2004. godine. Osušeni cvijetovi ekstrahirani su metanolom. Inhibicijska aktivnost XO ispitana je spektrofotometrijski u aerobnim uvjetima na temelju postupka koji su objavili Noro i suradnici. Iz MeOH ekstrakta cvjetova *Chrysanthemum sinense* izoliran je novi flavonski glukozid, akacetin 7-O-(3-O-acetil-β-D-glukopiranozid) (1), zajedno s 27 poznatih spojeva uključujući flavonoide, derivate kava kiseline, fenoli i monoterpenoidni glukozid. Njihova struktura je razjašnjena na temelju spektroskopskih podataka. Spojevi 1-15, 20-24 i 27 pokazali su inhibicijsku aktivnost na način ovisan o koncentraciji, a spojevi 2-11 i 22 pokazali su snažniju inhibicijsku aktivnost, s IC_{50} vrijednostima u rasponu od 0,13 do 2,31 μM , nego alopurinol pozitivne kontrole ($IC_{50} = 2,50 \mu\text{M}$). (32)

Tablica 15. Inhibicijska aktivnost spojeva izoliranih iz metanolnog ekstrakta biljke *Chrysanthemum sinense* (1-15. 20-24,27) na enzim ksantin oksidazu

SPOJ	IC₅₀ (μM)	SPOJ	IC₅₀ (μM)
akcetin-7-O-(3-o-acetil-B-D-glukopiranozid) (1)	80,03	apigenin (12)	5,36
Selgin (2)	0,22	akcetin 7-O-3D-glukopiranozid(13)	28,5
luteolin(3)	1,24	luteolin 7-O- glukozid (14)	18,9
diosmetin(4)	0,3	eriodiktiol(15)	43,8
apigenin(5)	0,36	4,5-O-dikafeoilkininska kiselina (20)	42,6
eupafolin(6)	0,20	metil ester 3,5-O-dikafeoilkininske kiseline(21)	12,2
krizoeriol(7)	0,19	metil ester 4,5-O-dikafeoilkininske kiseline	2,31
akcetin(8)	0,16	kafeinska kiselina (23)	85,4
jaceidin(9)	1,15	metil kafeat (24)	12,3
tricetin-3,4,5-trimetil eter(10)	0,51	3,4-dihidroskibenzaldehid (27)	56,8
5,7,3-trimetoksi-6,4,5-trimetoksiflavon(11)	1,33	alopurinol	2,50

Ferraz Filha i suradnici (33) su 2006. godine objavili rezultate istraživanja na temu inhibicijskog učinka etanolnih ekstrakata biljaka *Lychnophora* vrsta na enzim XO. Nadzemni dijelovi *Lychnophora ericoides* (Mart.) (LE), *Lychnophora passerina* (Mart. ex. DC) Gardn (Lpa), *Lychnophora staavioides* Mart. (LS) i *Lychnophoriopsis candelabrum* Schultz-Bip. R. Luque & NL Menezes (LC), prikupljeni su u rujnu 2000. Nadzemni dijelovi *Lychnophora pinaster* Mart. (LPi) prikupljeni su u ožujku 2002. i *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (LT) sakupljene su u listopadu 2003. Sve vrste su sakupljene u državi Minas Gerais, Brazil. Nadzemni dijelovi (800 g) šest vrsta osušeni su na zraku, reducirani u prah i ekstrahirani etanolom, na sobnoj temperaturi, 2 tjedna. Otapalo je uklonjeno pod sniženim tlakom (ispod 40° C) kako bi se dobili osušeni sirovi etanolni ekstrakti nazvani LCE, LEE, LPaE, LPiE, LSE i LTE. Dijelovi *Lychnophora staavioides* i *Lychnophoriopsis candelabrum* iscrpno su ekstrahirani heksanom, kloroformom i etanolom kako bi se dobilo LS1, LS2, LS3, LC1, LC2 i L3. Nadzemni dijelovi *Lychnophora trichocarpha* iscrpno su ekstrahirani etil acetatom (EtOAc) i metanolom (MeOH) da se dobije LT1, odnosno LT2. Sirovi etanolni ekstrakti *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora passerina* i *Lychnophora pinaster* su pročišćeni ekstrakcijom s heksanom, EtOAc i etanolom da se dobije LE1, ekstrakti LPa1, LPi1, LE2, LPa2, LPi2, LE3, LPa3 i LPi3. Provođenje testa temeljeno je na postupku koji su objavili Sweeney et al. (2001), s izmjenama. Alopurinol, poznati inhibitor XO, korišten je kao pozitivna kontrola u konačnoj koncentraciji od 10 µg/ml u mješavini za ispitivanje. Najaktivnije ispitivane biljke bile su *Lychnophora trichocarpha*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora staavioides* i *Lychnophoriopsis candelabrum*, s inhibicijama od 77%, 78%, 66% i 63% pri koncentraciji 100 µg/ml, te IC₅₀ vrijednostima od 6,16, 8,2, 8,33, 97 i 37,70 µg/ml. (33)

Tablica 16. Inhibicijska aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka roda *Lychnophora* (Asteraceae) iz Brazila na enzim ksantin oksidazu

Biljka	Ekstrakt	Inhibicija 100 g/ml (% ± SD)	IC ₅₀ (µg/ml ± SD)
<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	LCE	66±3,27	49,3410±4,4047
	LC1	1,7±1,70	-
	LC2	57±3,30	37,7028±1,7711
<i>Lychnophora passerina</i>	LC3	43±1,00	92,0387±4,6349
	LPaE	55±4,18	44,1251±3,1915
	LPa1	13±6,00	-
	LPa2	61±2,94	42,5860±5,4384
<i>Lychnophora staavioides</i>	LPa3	20±7,50	-
	LSE	66±1,73	51,0670±3,0951
	LS2	63±10,28	33,9732±0,5822
<i>Lychnophora trichocarpha</i>	LS3	57±1,08	79,7944±2,5376
	LTE	64±5,35	28,8451±0,2857
	LT1	77±0,50	6,1598±2,2607
<i>Lychnophora pinaster</i>	LT2	38±2,00	60,0182±0,1052
	LPiE	47±9,40	73,9522±2,5641
	LPi1	4±4,00	-
	LPi2	38±6,50	43,1716±0,1902
<i>Lychnophora ericoides</i>	LPi3	16±0,00	-
	LEE	54±2,73	42,1751±0,9470
	LE1	18±0,00	-
	LE2	78±0,50	8,2764±0,4611
	LE3	38±0,50	38,9758±3,5515

LCE, LC1, LC2, LC3- etanolni ekstrakt *Lychnophoriopsis candelabrum*, frakcija heksana, kloroforma i etanola

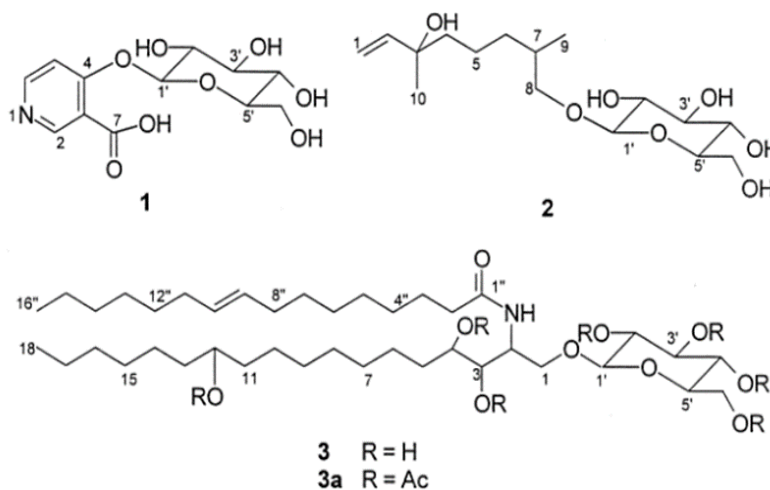
LPaE, LPa1, LPa2, LPa3- etanolni ekstrakt *Lychnophora passerina*, frakcija heksana, etil acetata i etanola

LSE, LS2, LS3- etanolni ekstrakt *Lychnophora staavioides*, frakcija heksana, kloroforma i etanola

LPiE, LPi1, LPi2, LPi3- etanolni ekstrakt *Lychnophora pinaster*, frakcija heksana, etil acetata i etanola

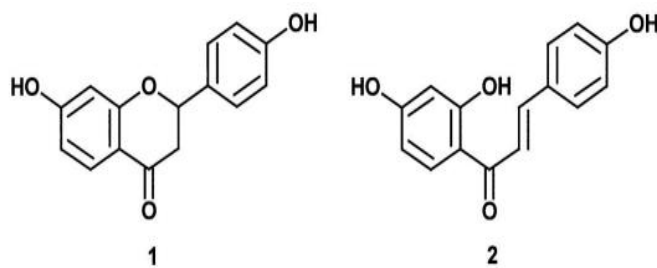
LTE, LT1, LT2- etanolni ekstrakt *Lychnophora trichocarpha*, frakcija etil acetata i metanola

Kong i suradnici (34) su 2001. godine objavili rezultate istraživanja inhibicijskog učinka metanolnog ekstrakta biljke *Conyza bonariensis* na enzim XO. Nadzemni dijelovi *C. bonariensis* sakupljeni su 19. lipnja 1996. iz parka jezera Xuanwu, Kina. Praškasti biljni materijal osušen na zraku (900 g) ekstrahiran je dva puta (po 24 sata) s MeOH na sobnoj temperaturi. Inhibicijska aktivnost XO mjerena je prema maloj modifikaciji prethodno objavljene metode (Li i sur., 1999., Zhou i sur., 1999.). Ksantin oksidaza iz kravljeg mlijeka, ksantin i standardni inhibitor alopurinol nabavljeni su od Sigma Chemical Co. Frakcioniranje metanolnog ekstrakta *Conyza bonariensis* koji inhibira XO dalo je tri glikozida, uz devet poznatih spojeva uključujući amirin, β -sitosterol, daukosterol, siringinsku kiselinu, 3-hidroksi-5-metoksibenzojevu kiselinu, eugenol 4-*O*-glukopiranozid, luteolin, apigenin, takakin 8-*O*-glukuronid. Izolirani glikozidi su 4-hidroksipiridin-3-karboksilna kiselina 4-*O*-glukopiranozid, 8-hidroksi-6,7-dihidrolinalool-8-*O*-glukopiranozid i bonarozid. Enzimski test *in vitro* pokazao je da siringinska kiselina i takakin 8-*O*-glukuronid pokazuju slabu inhibicijsku aktivnost protiv ksantin oksidaze s IC_{50} vrijednostima od $500 \pm 41 \mu\text{M}$ odnosno $170 \pm 12 \mu\text{M}$. (34)



Slika 22. Strukture izoliranih glikozida (31)

Kongo i suradnici su 2000. godine (35) objavili rezultate istaživanja na zraku osušene stabljike *S.chinensis* sakupljene su u Gannan Perfecture, Kina. Metanolni ekstrakt biljke podvrgnut je kromatografiji na stupcu kako bi se dobilo 5 frakcija. Iz četvrte frakcije izolirani su likviritigenin i izolikviritigenin čije su strukture potvrđene kombinacijom metoda infracrvene spektroskopije (IR) i molekulske spektroskopije (MR). Aktivnost enzima XO (porijeklom iz goveđeg mlijeka) ispitana je reakcijom enzima sa ksantinom u aerobnim uvjetima. Spektrografski je praćen porast apsorbancije na 293 nm koji predstavlja stvaranje mokraćne kiseline. IC₅₀ za likviritigenin iznosio je 49,3 mM, dok je IC₅₀ za izolikviritigenin iznosio 55,8 mM. Kao pozitivna kontrola korišten je alopurinol IC₅₀ = 24,4 mM. (35)



Slika 23. Struktura likviritigenina (1) i izolikviritigenina (2) (32)

Pregledom literature uočeno je da je do danas objavljen veliki broj radova na temu inhibicije enzima ksantin oksidaze ekstraktima i spojevima koji ulaze u sastav ekstrakata biljaka. Ovo je bilo i za očekivati obzirom da su biljke neiscrpan izvor biološki aktivnih spojeva.

Autori su za ekstrakciju koristili cijelu biljku ili različite dijelove biljke. Jednako, za ekstrakciju su koristili različita otapala, kao etanol, metanol, etil acetat i druge.

Metode koje su korištene tijekom testiranja sposobnosti biljnog materijala da inhibira enzim ksantin oksidazu se temelje na prevođenju ksantina kao supstrata u mokraćnu kiselinu kao produkt reakcije. Kao pozitivnu kontrolu autori su koristili poznati inhibitor ovog enzima alopurinol.

Kod prezentacije rezultata, neki autori su rezultate prezentirali u obliku IC₅₀ vrijednosti, a neki u obliku % za otopinu uzorka testirane koncentracije. Rezultati iskazani u obliku IC₅₀ vrijednosti su prikazani u različitim mjernim jedinicama, masenim ili molarnim koncentracijama (g/l, mol/l).

Dolje su prikazani sumirani rezultati inhibicijskog učinka čistih spojeva (Tablica 17.) i ekstrakata (Tablica 18.) sabrani ovim radom.

Tablica 17. Sumarni rezultati inhibicijskog učinka čistih spojeva izoliranih iz biljnih ekstrakata

Literaturna referenca	Spoj	Izolacija	Inhibicijska aktivnost	Pozitivna kontrola (alopurinol)
13	kvercetin-3-O-ramnozid	<i>Smilax china</i> L.	IC ₅₀ =99,22 µg/ml	-
13	klorogenska kiselina	<i>Smilax china</i> L.	IC ₅₀ =99,47 µg/ml	-
14	3-(hidroksimetil)-4-(metilamino)-dihidrofuran-2(3H)-on	<i>Pithecellobium dulce</i>	IC ₅₀ =79 µg/ml	IC ₅₀ =0,4 µg/ml
14	kaemferol	<i>Pithecellobium dulce</i>	IC ₅₀ =0,38 µg/ml	IC ₅₀ =0,4 µg/ml
14	kaempferol-3-ramnosid	<i>Pithecellobium dulce</i>	IC ₅₀ =70,4 µg/ml	IC ₅₀ =0,4 µg/ml
16	eritrivarin H	<i>Erythrina arborescens</i>	IC ₅₀ = 5,3 µg/ml	IC ₅₀ =0,60 µM
16	eritrivarin I	<i>Erythrina arborescens</i>	IC ₅₀ =4,6 µg/ml	IC ₅₀ =0,60 µM
16	turkomanidin	<i>Erythrina arborescens</i>	IC ₅₀ =2,7 µg/ml	IC ₅₀ =0,60 µM
16	izoboldin	<i>Erythrina arborescens</i>	IC ₅₀ =2,4 µg/ml	IC ₅₀ = 0,60 µM
16	eritaborin A	<i>Erythrina arborescens</i>	IC ₅₀ =4,1 µg/ml	IC ₅₀ =0,60 µM
16	eritaborin B	<i>Erythrina arborescens</i>	IC ₅₀ =4,2 µg/ml	IC ₅₀ =0,60 µM
17	spoj 3	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =43,67 µM	IC ₅₀ =0,60 µM
17	spoj 4	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =34,34 µM	IC ₅₀ =0,60 µM

17	aparacin	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =0,65 µM	IC ₅₀ =0,60 µM
17	taberdivarin	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =6,50 µM	IC ₅₀ =0,60 µM
17	10-hidroksiheineanin	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =16,54 µM	IC ₅₀ =0,60 µM
17	vobasin	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =10,24 µM	IC ₅₀ =0,60 µM
17	pandolin	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =8,52 µM	IC ₅₀ =0,60 µM
17	konofilin	<i>Tabernaemontana bufalina</i>	IC ₅₀ =6,83 µM	IC ₅₀ =0,60 µM
19	diosmetin	<i>Cyclopia genistoiedes</i>	IC ₅₀ =0,53 µM	IC ₅₀ = 11,02 µM
19	leuteolin	<i>Cyclopia genistoiedes</i>	IC ₅₀ =0,84 µM	IC ₅₀ = 11,02 µM
19	5,7,3,5-tetrahidroksiflavon	<i>Cyclopia genistoiedes</i>	IC ₅₀ =120,55 µM	IC ₅₀ =11,02 µM
19	hisperetin	<i>Cyclopia genistoiedes</i>	IC ₅₀ =55,20 µM	IC ₅₀ =11,02 µM
20	cnicin	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	3,56±2,60 % /20 µg/ml	-
20	apigenin	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	IC ₅₀ =0,99±0,33 µM	IC ₅₀ =7,49±0,29 µM
20	hispidulin	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	IC ₅₀ =4,88±1,21 µM	IC ₅₀ =7,49±0,29 µM
20	eupatorin	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	15,13±6,70 %/µg/ml	-
20	3-metilleupatorin	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	276,07±31,67 µM	IC ₅₀ =7,49±0,29 µM
20	isokaemferid	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	IC ₅₀ =187,57±9,44 µM	IC ₅₀ =7,49±0,29 µM
20	8-sončukarpolid	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	neaktivan	-
20	8-(3,4-dihidroksi-2-metilen-butanoiloksi)-dehidromelenzin	<i>Centaurea virgata Lam.</i>	neaktivan	-
21	6-3(metilbut-1-enil)-5,7-dimetoksi-4'-hidroksiflavon	<i>Spilanthes calva D.C</i>	IC ₅₀ =16,56±2,34 µM	IC ₅₀ =3,42±0,56 µM
24	eupatilin	<i>Artemisia asiatica</i>	IC ₅₀ =1,33±0,21 µg/ml	IC ₅₀ =7,49±0,29 µg/ml
24	hispidulin	<i>Artemisia asiatica</i>	IC ₅₀ =4,88±1,21 µg/ml	IC ₅₀ =7,49±0,29 µg/ml

24	jaceosidin	<i>Artemisia asiatica</i>	IC ₅₀ =3,27±0,31 µg/ml	IC ₅₀ =7,49±0,29 µg/ml
24	cirsilineol	<i>Artemisia asiatica</i>	-	-
24	5,7,4',5'- tetrahidroksi- 6,3'- dimetoksiflavon	<i>Artemisia asiatica</i>	IC ₅₀ =2,59±0,35 µg/ml	IC ₅₀ =7,49±0,29 µg/ml
24	6-metoksitricin	<i>Artemisia asiatica</i>	IC ₅₀ =6,13±0,34 µg/ml	IC ₅₀ =7,49±0,29 µg/ml
24	krizosplenetin	<i>Artemisia asiatica</i>	-	-
26	(2R,3S)-(-)-4'- O- metildihidrokv cetin	<i>Blumea balsamifera</i>	IC ₅₀ =0,23±0,01 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
26	(2R,3R)-(+)-4'- ometildihidrokv ercetin	<i>Blumea balsamifera</i>	IC ₅₀ =3,04±0,12 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
26	(2R,3R)-(+)- 4',7-di-O- metildihidrokv cetin	<i>Blumea balsamifera</i>	IC ₅₀ =6,08 ±0,108 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
26	(2R,3R)-(+)-7- O- metildihidrokv cetin	<i>Blumea balsamifera</i>	IC ₅₀ =5,72±0,13 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
26	5,7,3',5'- tetrahidroksi flavanon	<i>Blumea balsamifera</i>	>100 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
26	kvarcetin	<i>Blumea balsamifera</i>	IC ₅₀ =1,91±0,02 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
26	kvercetin-3,7,3'- trimetil eter	<i>Blumea balsamifera</i>	IC ₅₀ =9,53±0,14 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
26	kvercetin-3, 3',4'-trimetil eter	<i>Blumea balsamifera</i>	IC ₅₀ =1,18±0,01 µM	IC ₅₀ =2,50±0,01 µM
27	luteolin	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	12,04±0,37 (U/mg prot.)	1,91±0,12
27	apigenin	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	8,10±0,91 (U/mg prot.)	1,91±0,12
27	lupeol	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	14,54±0,54 (U/mg prot.)	1,91±0,12
27	β -sitosterol	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	12,70±0,91 (U/mg prot.)	1,91±0,12
27	eremantolid C	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	12,82±0,56 (U/mg prot.)	1,91±0,12
27	lihnofolid	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	10,89±1,07 (U/mg prot.)	1,91±0,12
30	(+)-feruginol	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =70,3±6,9 µM	IC ₅₀ =2,0±0,7

30	ent-kaur-16-en-15-on	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =127 ± 6,2 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
30	ent-8(14),15-sandaracopimaradien 2a,18-diol	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =139,6±3,6 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
30	8(14), 15-sandaracopimara dien-2a,18,19-triol	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =65,3±3,4 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
30	(+)-sugiol	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =6,8±1,0 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
30	3b-metoksikloartan-24(24)-en	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =106,5±6,7 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
30	3b,23b-dimetoksikloartan-24(241)-en	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =79,4±4,2 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
30	3b,23b-dimetoksi-5a-lanosta-24(241)-en	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =64,0±6,0 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
30	23(S)-23-metoksi-24-metilenlanosta-8-en-3-on	<i>Amentotaxus formosana</i>	IC ₅₀ =67,3±0,9 μM	IC ₅₀ =2,0±0,7
32	akcetin-7-O-(3-o-acetil-B-D-glukopiranozid)	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =80,03 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	selgin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,22 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	luteolin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =1,24 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	diosmetin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,13 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	apigenin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,36 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	eupafolin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,20 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	krizoeriol	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,19 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	akacetin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,16 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	jaceidin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =1,15 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	tricetin-3,4,5-trimetil eter	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,51 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	5,7,3-trimetoksi-6,4,5-trimetoksiflavon	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =1,33 μM	IC ₅₀ =2,5 μM

32	apigenin	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =0,36 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	akacetin 7-O-3D-glukopiranozid	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =28,5 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	luteolin 7-O-glukozid	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =18,9 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	eriodiktiol	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =43,8 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	4,5-O-dikafeoilkininska kiselina	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =42,6 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	metil ester 3,5-O-dikafeoilkininske kiseline	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =12,2 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	metil ester 4,5-O-dikafeoilkininske kiseline	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =2,31 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	kafeinska kiselina	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =85,4 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	metil kafeat	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =12,3 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
32	3,4-dihidroskibenzaldehid	<i>Chrysanthemum sinense</i>	IC ₅₀ =56,8 μM	IC ₅₀ =2,5 μM
34	siringinska kiselina	<i>Conyza bonariensis</i>	IC ₅₀ =500±41 μM	-
34	8-O-glukuronid	<i>Conyza bonariensis</i>	IC ₅₀ =170±12 μM	-
35	likviritigenin	<i>Sinofranchetia chinensis</i>	IC ₅₀ = 49,3 mM	IC ₅₀ = 22,4 mM
35	izolikviritigenin	<i>Sinofranchetia chinensis</i>	IC ₅₀ =55,8 Mm	IC ₅₀ =22,4 mM

Tablica 18. Sumarni rezultati inhibicijskog učinka ekstrakata

Literaturna referenca	Ekstrakt	Izolacija	Inhibicijska aktivnost	Pozitivna kontrola
12	petroleter frakcija	<i>Crateva adansonii</i>	IC ₅₀ =30,1±2,2 µg/ml	IC ₅₀ =5,7±0,3 µg/ml
12	kloroform frakcija	<i>Crateva adansonii</i>	IC ₅₀ =20,2±1,6 µg/ml	IC ₅₀ =5,7±0,3 µg/ml
12	etil acetat frakcija	<i>Crateva adansonii</i>	IC ₅₀ =43,9±1,4 µg/ml	IC ₅₀ =5,7±0,3 µg/ml
12	rezidualna frakcija	<i>Crateva adansonii</i>	IC ₅₀ =98,0±3,3 µg/ml	IC ₅₀ =5,7±0,3 µg/ml
18	ekstrakt metanola	<i>Sphaeranthus indicus</i>	30,35±0,32 % (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt metanola	<i>Acronychia pedunculata</i>	7,86±0,14% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt metanola	<i>Calophyllum innophyllum</i>	38,95±1,28% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt etanola	<i>Symplocos cochinchinesis</i>	44,86±1,43% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt etanola	<i>Tinospora cordifolia</i>	17,92±1,73% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt etanola	<i>Flacourtia indica</i>	70,46±0,18% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt etanola	<i>Leucus zeylanica</i>	13,26±0,25% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt etanola	<i>Barathranthus nodiflorus</i>	6,26±0,93% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt etanola	<i>Diospyros ebenum</i>	24,76±2,16%(250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
18	ekstrakt etanola	<i>Argyreia populifolia</i>	32,79±2,16% (250 µg/ml)	IC ₅₀ =99,26±0,72 %
23	ekstrakt metanola	<i>Polygonum bistorta</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 33,40±0,87	-
23	ekstrakt metanola	<i>Polygonum hydropiper</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 85,49 ± 11,17	-
23	ekstrakt metanola	<i>Polygonum lapathifolium</i> L	IC ₅₀ (µg/ml ± SD)= 74,86 ± 8,33	-
23	ekstrakt metanola	<i>Polygonum viviparum</i>	IC ₅₀ (µg/ml ± SD)= 42,33 ± 2,42	-
24	metanolni ekstrakt	<i>Artemisia asiatica</i>	IC ₅₀ =2,93±0,80 µg/ml	IC ₅₀ =7,74±0,29 µg/ml
27	ekstrakt etanola (LTE)	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	10,89±0,72 U/mg proteina	1,91±0,12 U/mg proteina

27	ekstrakt etanola (LTE)	<i>Lychnophora trichocarpa</i>	8,58±1,07 **U/mg proteina	1,91±0,12 U/mg proteina
27	frakcija etil acetata (LTA)	<i>Lychnophora trichocarpa</i>	13,03±0,73 U/mg proteina	1,91±0,12 U/mg proteina
27	frakcija etil acetata (LTA)	<i>Lychnophora trichocarpa</i>	10,28±0,32 U/mg proteina	1,91±0,12 U/mg proteina
29	metanolni ekstrakt	<i>Achillea biebersteinii Afanasiev</i>	45,0±0,7 % (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Anagallis arvensis L.</i>	1,6±0,2 % (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Anchusa italica Retz</i>	13,4±0,4 % (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Anthemis palestina Reut. ex Boiss</i>	51,5±1,5% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Artemisia herba-alba Asso</i>	16,2±0,3% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Calendula arvensis L.</i>	2,2±0,3% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Chrysanthemum coronarium L.</i>	57,3±1,1% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Eryngium creticum Lam.</i>	4,5±0,3% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Fumaria densiflora DC</i>	7,3±0,6% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Ginkgo biloba L.</i>	39,2±0,7% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Glaucium aleppicum</i>	3,3±0,3% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Haplophyllum buxbaumii</i>	10,4±0,3% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Helianthemum ledifolium</i>	28,4±1,0% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Hypecoum dimidiatum Delile</i>	7,3±0,3% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Lavandula angustifolia Mill.</i>	28,7±0,4% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Majorana syriaca (L.) Kostel</i>	25,1±0,8% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Mentha spicata L.</i>	22,5±0,9% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Ononis natrix L.</i>	11,8±0,9% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Onosma gigantean Lam.</i>	-0,5± 0,2% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml

29	metanolni ekstrakt	<i>Paronychia argentea</i> Lam.	13,0±0,5% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Reseda lutea</i> L.	6,6±0,2% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	42,0±1,2% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
29	metanolni ekstrakt	<i>Salvia spinosa</i> L.	71,5±1,7% (200 µg/ml)	IC ₅₀ =4,6 µg/ml
31	kloroform frakcija	<i>Erythrina stricta</i> Roxb	IC ₅₀ =21,2±1,6 µg/ml	IC ₅₀ =6,1±0,3 µg/ml
31	petroleter frakcija	<i>Erythrina stricta</i> Roxb	IC ₅₀ =30,2±2,2 µg/ml	IC ₅₀ =6,1±0,3 µg/ml
31	etil acetat frakcija	<i>Erythrina stricta</i> Roxb	IC ₅₀ =44,9±1,4 µg/ml	IC ₅₀ =6,1±0,3 µg/ml
31	rezidua	<i>Erythrina stricta</i> Roxb	IC ₅₀ =100 ±3,3 µg/ml	IC ₅₀ =6,1±0,3 µg/ml
33	ekstrakt etanola LCE	<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	IC ₅₀ (µg/ml ± SD)= 49,3410 ± 4,4047	-
33	frakcija heksana LC1	<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	-	-
33	frakcija kloroforma LC2	<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 37,7028 ± 1,7711	-
33	frakcija etanola LC3	<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 92,0387 ± 4,6349	-
33	ekstrakt etanola LPaE	<i>Lychnophora passerina</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 44,1251 ± 3,1915	-
33	frakcija heksana LPa1	<i>Lychnophora passerina</i>	-	-
33	frakcija etil acetata LPa2	<i>Lychnophora passerina</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 42,5860 ± 5,4384	-
33	frakcija etanola LPa3	<i>Lychnophora passerina</i>	-	-
33	ekstrakt etanola LSE	<i>Lychnophora staavioides</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 51,0670 ± 3,0951	-
33	frakcija kloroforma LS2	<i>Lychnophora staavioides</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 33,9732 ± 0,5822	-
33	frakcija etanola LS3	<i>Lychnophora staavioides</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 79,7944 ± 2,5376	-

33	ekstrakt etanola LTE	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 28,8451 ± 0,2857	-
33	frakcija etil acetata LT1	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 6,1598 ± 2,2607	-
33	frakcija metanola LT2	<i>Lychnophora trichocarpha</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 60,0182 ± 0,1052	-
33	ekstrakt etanola LPiE	<i>Lychnophora pinaster</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 73,9522 ± 2,5641	-
30	frakcija etil acetata LPi1	<i>Lychnophora pinaster</i>	-	-
33	frakcija metanola LPi2	<i>Lychnophora pinaster</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 43,1716 ± 0,1902	-
33	frakcija etanola LPi3	<i>Lychnophora pinaster</i>	-	-
33	etanolni ekstrakt LEE	<i>Lychnophora ericoides</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 42,1751 ± 0,9470	-
33	frakcija etil acetata LE1	<i>Lychnophora ericoides</i>	-	-
33	frakcija metanola LE2	<i>Lychnophora ericoides</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)= 8,2764 ± 0,4611	-
33	frakcija etanola LE3	<i>Lychnophora ericoides</i>	IC ₅₀ (µg/ml±SD)=3 8,9758 ± 3,5515	-

** = P <0,01

Iz rezultata je vidljivo da ekstrakti biljaka nisu tako dobar izvor potencijalnih inhibitora enzima ksantin oksidaza kao što su čisti spojevi izolirani iz pojedinih ekstrakata. Među ekstraktima, kao onaj s boljim inhibicijskim potencijalom na enzim ksantin oksidazu (XO) ističe se primjerice etilacetatna frakcija etanolnog ekstrakta nadzemnog dijela biljke *Lychnophora trichocarpha* Spreng sakupljene u Brazilu (Ferraz Filha i suradnici (33), 2006.). IC₅₀ vrijednost ove frakcije iznosila je 6,1598 ± 2,2607 µg/ml. Metanolna frakcija etanolnog ekstrakta biljke *Lychnophora ericoides* iz Brazila (Ferraz Filha i suradnici (33), 2006.) također je pokazala zamjetnu sposobnost inhibicije enzima ksantin oksidaza, IC₅₀ = 8,2764 ± 0,4611 µg/ml. Nažalost autori nisu testirali ili nisu pokazali IC₅₀ vrijednost pozitivne kontrole tako da nema stvarne potvrde dobrog inhibicijskog učinka

ovih dviju frakcija biljaka roda *Lychnophora*. Dobar inhibicijski potencijal pokazao je i metanolni ekstrakt biljke *Artemisia asiatica*, (Hajdu i suradnici (24) 2014.) s $IC_{50}=2,93 \pm 0,80 \mu\text{g/ml}$. IC_{50} za alopurinol testiran ovim radom iznosio je $7,49 \pm 0,29 \mu\text{M}$.

Među spojevima izoliranih iz biljnih ekstrakata mogu se izdvojiti flavonoidi diosmetin i luteolin izolirani iz metanolne frakcije biljke *Cyclopia genistoides* iz Južne Amerike (Orsohya Roza i suradnici (19), 2016.). Njihova IC_{50} vrijednost iznosila je 0,53 i 0,84 μM , u odnosu na IC_{50} za alopurinol koji je iznosio 11,02 μM . Flavonoidi izolirani iz metanolnog ekstrakta biljke *Centaurea virgata*, apigenin i hispidulin, također su pokazali snažnu sposobnost inhibicije ksantin oksidaze ($IC_{50} = 0,99 \pm 0,33$ i $4,88 \pm 1,21 \mu\text{M}$) u odnosu na IC_{50} alopurinola koji je iznosio $7,49 \pm 0,29 \mu\text{M}$.

Flavonoidi izolirani iz metanolnog ekstrakta iz cvjetova biljke *Chrysanthemum sinense* iz Vijetnama (Nguyen i suradnici (32), 2006.) su pokazali snažni inhibicijski potencijal na enzim ksantin oksidazu. To su diosmetin ($IC_{50} = 0,13 \mu\text{M}$), akacetin ($IC_{50} = 0,16 \mu\text{M}$), krizoeriol ($IC_{50} = 0,19 \mu\text{M}$), eupafolin ($IC_{50} = 0,20 \mu\text{M}$), selgin ($IC_{50} = 0,22 \mu\text{M}$), apigenin ($IC_{50} = 0,36 \mu\text{M}$), tricetin 3',4',5'-trimetil eter ($IC_{50} = 0,51 \mu\text{M}$), jaceidin ($IC_{50} = 1,15 \mu\text{M}$), luteolin ($IC_{50} = 1,24 \mu\text{M}$) i 5,7,3'-trihidroksi-6,4',5'-trimetoksiflavon ($IC_{50} = 1,33 \mu\text{M}$). Svi oni redom su pokazali bolji inhibicijski učinak od alopurinola $IC_{50} = 2,5 \mu\text{M}$. Metil ester 4,5-O-dikafeoilkininske kiseline iz iste biljke pokazao je pak inhibicijski učinak ($IC_{50} = 2,31 \mu\text{M}$) usporediv s onim za alopurinol.

Inhibicijski učinak nekih od spojeva izoliranih iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dijela biljke *Blumea balsamifera* iz Vijetnama (Nguyen i Nguyen (26), 2012.) također su pokazali zamjetni učinak na enzim ksantin oksidazu. To su spojevi (2R,3S)-(-)-4'-O-metildihidrokvercetin ($IC_{50} = 0,23 \pm 0,01 \mu\text{M}$), kvercetin-3, 3',4'-trimetil eter ($IC_{50} = 1,18 \pm 0,01 \mu\text{M}$) i kvercetin ($IC_{50} = 1,91 \pm 0,02 \mu\text{M}$). Inhibicijski učinak alopurinola u ovom radu iznosio je $IC_{50} = 2,50 \mu\text{M}$.

Dobar inhibicijski potencijal pokazali su i flavonoidi izolirani iz metanolnog ekstrakta biljke *Artemisia asiatica*, (Hajdu i suradnici (24), 2014.) eupatilin ($IC_{50} = 1,33 \pm 0,21 \mu M$), hispidulin ($IC_{50} = 4,88 \pm 1,21 \mu M$), jaceosidin ($IC_{50} = 3,27 \pm 0,31 \mu M$), 5,7,4',5'-Tetrahidroksi-6,3'-dimetoksiflavon ($IC_{50} = 2,59 \pm 0,35 \mu M$) i 6-metoksitricin ($IC_{50} = 6,13 \pm 0,34 \mu M$), u odnosu na alopurinol ($IC_{50} = 7,49 \pm 0,29 \mu M$).

Flavonoid kaemferol izoliran iz metanolnog ekstrakta iz lišća biljke *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth (Watsika Wichaidit i Panumart Thongyoo (14), 2021.) pokazao je inhibicijski učinak ($IC_{50} = 0,38 \mu M$) ekvivalentan onom alopurinola ($IC_{50} = 0,4 \mu M$), slično kao i alkaloid aparacin izoliran iz listova i grančica biljke *Tabernaemontana bufalina* sabrane u Kini (Bao-Bao Shi i suradnici (17), 2019.) ($IC_{50} = 0,65 \mu M$; IC_{50} za alopurinol = $0,60 \mu M$).

4. ZAKLJUČAK

Pregledom literature uočeno je da je do danas objavljen veliki broj radova na temu inhibicije enzima ksantin oksidaze ekstraktima i spojevima koji ulaze u sastav ekstrakata biljaka.

Iz obrađenih rezultata se može izvesti zaključak da ekstrakti biljaka nisu tako dobar izvor potencijalnih inhibitora enzima ksantin oksidaza kao što su čisti spojevi izolirani iz pojedinih ekstrakata.

Među ekstraktima, kao onaj s boljim inhibicijskim potencijalom na enzim ksantin oksidazu ističe se etilacetatna frakcija etanolnog ekstrakta biljke *Lychnophora trichocarpa Spreng* sakupljene u Brazilu te metanolna frakcija etanolnog ekstrakta biljke *Lychnophora ericoides* također iz Brazila. Dobar inhibicijski potencijal pokazao je i metanolni ekstrakt biljke *Artemisia asiatica*.

Među spojevima izoliranih iz biljnih ekstrakata izdvajaju se flavonoidi diosmetin i luteolin izolirani iz metanolne frakcije biljke *Cyclopia genistoides* iz Južne Amerike; flavonoidi izolirani iz metanolnog ekstrakta biljke *Centaurea virgata*, apigenin i hispidulin; flavonoidi izolirani iz metanolnog ekstrakta iz cvjetova biljke *Chrysanthemum sinense* iz Vijetnama diosmetin, akacetin, krizoeriol, eupafolin, selgin, apigenin, tricetin 3',4',5'-trimetil eter, jaceidin, luteolin i 5,7,3'-trihidroksi-6,4',5'-trimetoksiflavon; spojevi izolirani iz metanolnog ekstrakta biljke *Blumea balsamifera* iz Vijetnama (2R,3S)-(-)-4'-O-metildihidrokvercetin, kvercetin-3, 3',4'-trimetil eter i kvercetin; flavonoidi izolirani iz metanolnog ekstrakta biljke *Artemisia asiatica* eupatilin, hispidulin, jaceosidin, 5,7,4',5'-Tetrahidroksi-6,3'-dimetoksiflavon i 6-metoksitricin. Svi su oni pokazali inhibicijski učinak bolji od onog za alopurinol.

Flavonoid kaemferol izoliran iz metanolnog ekstrakta biljke *Pithecellobium dulce* i alkaloid aparacin izoliran iz biljke *Tabernaemontana bufalina* pokazali su inhibicijski učinak na ksantin oksidazu ekvivalentan onom za alopurinol.

5. LITERATURA

1. M. Bortolotti, L. Polito, M. G. Battelli, A. Bolognesi, *Redox Biology*, **2021**, Volume 41, 101882. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101882>
2. <https://goaravetisyan.ru/bs/ingibirovanie-ksantinoksidazy-kak-put-uluchsheniya-serdechno-sosudistyh-ishodov-ksantinoksidazy-ingibi/>
3. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Ksantin-oksidaza>
4. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition, USA: W. H. Freeman and Company, **2005**, str. 862-878.
5. C. Chen, J.M. Lü, Q. Yao, *An Overview Med. Sci. Monit*, **2016**; 22: 2501-2512. <https://doi.org/10.12659/MSM.899852>
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545245/>
7. <https://www.fitness.com.hr/zdravlje/ozljede-bolesti/Giht-simptomi-lijecenje-prehrana.aspx>
8. D. Treutter, *Plant Biol (Stuttg)*. **2005** Nov;7(6):581-91. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873009>
9. D.D. Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. PE Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier, *Antioxid Redox Signal*, **2013**, Vol. 18, br. 14.
10. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=1790>
11. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Alkaloidi>
12. A. Abdullahi, R.U. Hamzah, A.A. Jigam, A. Yahya, A.Y. Kabiru, H. Muhammad, S. Sakpe, F. S. Adefolalu, M. C. Isah, M.Z. Kolo, *Journal of Acute Disease*, **2012**, Volume 1, Issue 2, Pages 126-129. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60029-3](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60029-3)
13. X. Li, W. Jin, W. Zhang, G. Zheng, *Int J Biol Macromol*, **2022**, 31;213:447-455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.188>
14. W. Wichaidit, P. Thongyoo, *Natural Product Research*, **2021** <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1999943>

15. C. Martins de Sá Müller, G. Brandão Coelho, M.C.P. Michel, Araújo, D.A. Saúde-Guimarães, *Journal of Ethnopharmacology*, **2019**, Volume 242, 112040. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112040>
16. B.J.Zhang, W.N. Xiao, J.Chen, M.F. Bao, J. Schinnerl, Q. Wang, X. H. Cai, *Tetrahedron*, **2019**, Volume 75, Issue 38, 130515. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.130515>
17. B.B.Shi , J.Chen , M.F.Bao , Y.Zang , X.H. Cai, *Phytochemistry* , **2019**, Volume 166, 112060. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112060>
18. H.D.S. Melshandi Perera, J.K. Ramani Radhika Samarasekera, S. Mangalika Handunnetti, O.V. Don Sisira Jagathpriya Weerasena, H.D.Weeratunga, A. Jabeen, M. Iqbal Choudhary, *BMC Complement Altern Med*, **2018**, broj članka: 271. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2335-1>
19. O. Roza, A. Martins, J. Hohmann, W.C. Lai, J. Eloff, F.R. Chang, D. Csupor, *Planta Med.*, **2016**, Sep;82(14):1274-8. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110656>
20. B.S. Tuzun, Z. Hajdu, O.Orban-Gyapai, Z.P. Zomborszki, N. Jedlinszki, P. Forgo, B. Kivcak, J. Hohmann, *Med Chem*, **2017**, 13(5):498-502. <https://doi.org/10.2174/1573406413666161219161946>
21. P.Jayaraj, B. Mathew, B. Parimaladevi, V.A. Ramani, R. Govindarajan, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, **2014**, Volume 4, Issue4, Pages 481-484. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.07.005>
22. P.L. Owen, J. Timothy, *J. Ethnopharmacol* , **1999**, 64: 149-160. [10.1016/s0378-8741\(98\)00119-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00119-6)
23. O.O. Gyapai, I. Lajter, J. Hohmann, G. Jakab, A. Vasas, *Phytother Res.*, **2015**, ožujak 29(3):459-65. <https://doi.org/10.1002/ptr.5275>
24. Z. Hajdú, A. Martins, O. Orbán-Gyapai, P. Forgo, N. Jedlinszki, I. Máthé, J. Hohmann, *Rec. Nat. Prod.* 8:3 (**2014**), 299-302.
25. P. L. Owen, T. Johns, *J. Ethnopharmacol* , **1999**, 64: 149-160. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00119-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00119-6)
26. M .T .T Nguyen and N. T Nguyen, *Phytotherapy Research*, **2012**, Volume 26, Issue 8, Pages 1178 - 1181. <https://doi.org/10.1002/ptr.3710>
27. M. Ribeiro de Souzaa, C. Aparecida de Paulaa, M. L. Pereira de Resendea, A.Grabe-Guimarães, J. D. de Souza Filho and D. A. Saúde-Guimarãesa, *Journal*

of Ethnopharmacology ,**2012**, Volume 142, Issue 3,Pages 845-850.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.012>

28. I. H. Hall, J. P. Scoville, D. J. Reynolds, R. Simlot and P. Duncan, *Life Sciences*, **1990**, Volume 46, Issue 26, Pages 1923-1927. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90507-N](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90507-N)
29. M. M. Hudaib, K. A. Tawaha, M. K. Mohammad, A. M. Assaf, A.Y. Issa, F. Q. Alali, T. A. Aburjai, Y. K. Bustanji, *Pharmacogn Mag.*, **2011**, Oct-Dec; 7(28): 320–324. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.90413>
30. C. N. Lin, K. W. Lin, T. C. Hour, Y.S. Pu, H. H. Ko, S.C. Yang, A. M Huang, *Phytochemistry* **71**, **2010**, 2140–2146. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.012>
31. M. Umamaheswari, K. Asokkumar, A.T. Sivashanmugam, A. Remyaraju, V. Subhadradevi, T. K. Ravi, *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**, Volume 124, Issue 3, Pages 646-648. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.018>
32. M. T. Thi Nguyen, S. Awale, Y. Tezuka, J. Ueda, Q. Le Tran, S. Kadota, *Planta Medica*, **2006**, Volume 72, Issue 1, Pages 46. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873181>
33. Z S. Ferraz Filha, I.F. Vitolo, L. G. Fietto, J. A. Lombardi, D. A. Saúde-Guimarães, *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**, Volume 107, Issue 1, 11 Pages 79-82. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.011>
34. L.D. Kong, Z. Abliz, C. X. Zhou, L.J. Li, C. H. K. Cheng, R.X. Tan, *Phytochemistry* , **2001**, Volume 58, Issue 4, Pages 645-651. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00176-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00176-5)
35. L.D. Kong, Y. Zhang, X. Pan, R.X. Tan, C. H. K. Cheng, *Cell Mol Life Sci*, **2000**, ožujak; 57(3):500-5. <https://doi.org/10.1007/PL00000710>