Fitokemijska karakterizacija plodova i listova vrste Myrtus communis L.

Bračić, Vlatka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:486186

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Vlatka Bračić

Fitokemijska karakterizacija plodova i listova vrste *Myrtus communis* L.

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom poslijedoktorandice dr. sc. Marije Kindl.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Mariji Kindl na odabiru teme, stručnom vodstvu, pomoći pri izradi eksperimentalnog kao i pisanog dijela diplomskog rada, trudu, predanosti i strpljenju tijekom izrade istog. Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Željki Vanić na pomoći kod pripreme biljnih ekstrakata. Također zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmakognoziju.
Veliko hvala mojoj obitelji i svim prijateljima na pruženoj potpori, razumijevanju i vjeri tokom svih godina studija.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Botanička obilježja o vrsti *Myrtus communis* L. 2

1.2 Fitokemijski sastav plodova i listova vrste *Myrtus communis* 3

1.3 Fitoterapijski potencijal vrste *Myrtus communis* 6

1.4 Bioaktivni sekundarni metaboliti vrste *Myrtus communis* 8

1.4.1 Polifenolni spojevi 8

1.4.2 Eterično ulje 10

1.5 Metode ekstrakcije bioaktivnih tvari iz biljnog materijala 11

2. OBRAZLOŽENJE TEME 12

3. MATERIJALI I METODE 14

3.1 Materijali 15

3.1.1 Istraživani biljni materijal 15

3.1.2 Instrumenti i pribor 15

3.1.3 Reagensi, standardi i ostale kemikalije 16

3.2 Istraživanje bioaktivnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC) 17

3.2.1 Priprema uzoraka i standarda 17

3.2.2 Ispitivanje flavonoida i fenolnih kiselina 17

3.2.3 Ispitivanje antocijana 18

3.2.4 Ispitivanje eteričnih ulja 18

3.3 Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola 18

3.3.1 Priprema ekstrakata 18

3.3.2 Određivanje flavonoida 19

3.3.3 Određivanje trjeslovina 20

3.3.4 Određivanje procijanidina 21

3.3.5 Određivanje antocijana 22

3.4 Istraživanje sastava eteričnog ulja metodom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) 23

3.4.1 Izolacija eteričnog ulja 23

3.4.2 GC-MS analiza 23

3.5 Statistička analiza 24

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1 TLC karakterizacija bioaktivnih sastavnica 26

4.1.1 Flavonoidi 26

4.1.2 Antocijani 28

4.1.3 Eterično ulje 29

4.2 Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama 30
4.2.1 Flavonoidi 30
4.2.2 Trjeslovine 31
4.2.3 Procijanidini 32
4.2.4 Antocijani 33
4.2.5 Usporedni prikaz sadržaja polifenola 34
4.3 Kromatografski profil eteričnog ulja 35
5. ZAKLJUČCI 39
6. LITERATURA 42
7. SAŽETAK/SUMMARY 48
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

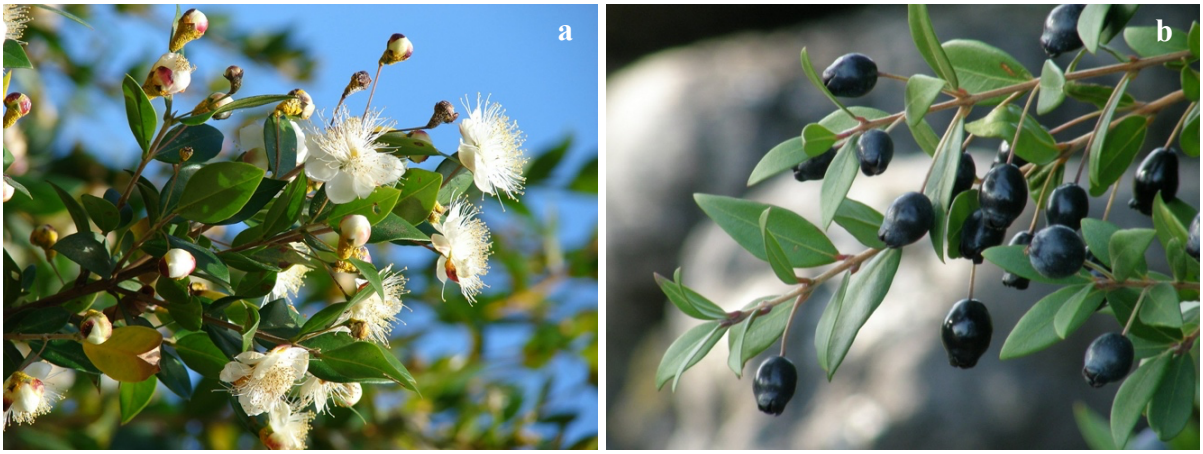
1. UVOD

Hrvatska flora obiluje brojnim aromatičnim i ljekovitim biljnim vrstama. Među njima je i mirta (*Myrtus communis* L.), tipična mediteranska biljka iz porodice Myrtaceae karakterističnih bijelih cvjetova i tamno plavih do crnih plodova. Prvi zapisi o primjeni mirte u ljekovite svrhe potječu iz stare Grčke te su o njenoj ljekovitosti pisali poznati grčki filozofi Hipokrat, Dioskorid, Plinije i Galen. O važnosti mirte u antičko doba svjedoči i to da je bila simbol Afrodite, grčke božice ljubavi, ljepote i plodnosti, kao i rimske božice Venere koja je Afroditin pandan. Danas se, osim u medicinske svrhe, mirta koristi kao začin, u proizvodnji likera te u kozmetičkoj i parfemskoj industriji. U tradicionalnoj medicini različiti biljni organi se zbog antiseptičkih svojstava primjenjuju u liječenju raznih infektivnih stanja kao što su dijareja, dizenterija, infekcije dišnog sustava te urinarne infekcije. Mirta se također koristi za zacjeljivanje rana, kod hiperglikemije, krvarenja, hemoroida, gastrointestinalnih tegoba, nesanice i anksioznosti. Do danas su provedena brojna istraživanja mirte kako bi se utvrdio fitokemijski sastav te pokušali rasvijetliti mehanizmi njenog farmakološkog djelovanja. Procjenjena je i klinička učinkovitost mirte u liječenju hemoroida, stomatitisa, metrohemoragije, gastroezofagealne refluksne bolesti, bakterijske vaginoze i peruti. Dobivene znanstvene spoznaje jasno su ukazale da je mirta bogat izvor strukturno različitih molekula te ima veliki biomedicinski potencijal. Utvrđeno je da djeluje antioksidacijski, antimikrobno, antiviralno, antiparazitski, insekticidno, antiulkusno, antidijaroično, protuupalno, antitumorski, neuroprotektivno i kardioprotektivno te antidijabetički (Akbar, 2020; Giampier i sur., 2020; Sisay i Gashaw, 2017; Özkan i Güray, 2009).

1.1. Botanička obilježja o vrsti *Myrtus communis* L.

Obična mirta ili mrča je uspravan, razgranati, zimzeleni grm visok do 5 m. Kora je u mladosti crvenkasta, zatim pepeljastosiva i uzdužno se ljušti. Listovi na kratkim peteljkama su nasuprotni, cjeloviti, jajoliko lancetasti, šiljasti, kožasti, dugi do 5 cm. Izrazito su aromatični kada se zdrobe. Cvjetovi su promjera do 3 cm, na dugačkim stapkama, smješteni pojedinačno u pazušcima listova. Dvospolni su, građeni od pet bijelih latica i pet lapova te velikog broja prašnika koji uočljivo strše iz cvijeta (Slika 1a). Cvate u lipnju i srpnju. Plod je mnogosjemena okruglasta boba veličine 7-10 x 6-8 mm, tamno plave do crne boje, na vrhu s ostacima čaške (Slika 1b). Dozrijeva u studenom. Gorkog je okusa dok sazrijeva, a veoma slatka kada sazrije. Sjemenke su tvrde, bubrežastog oblika (Kovačić i sur., 2008; Domac, 2002; Tutin i sur., 1972).

Mirta je prirodno rasprostranjena u južnoj Europi, sjevernoj Africi i zapadnoj Aziji. Raste u sastavu makije, svijetle i prorijeđene šume alepskog bora i hrasta crnike (Kovačić i sur., 2008).



Slika 1. *Myrtus communis* L. u vrijeme cvjetanja (a) i sazrijevanja plodova (b) (preuzeto s https://en.wikipedia.org/wiki/*Myrtus_communis* i https://www.visitlosinj.hr/9-mio mirisni-listopad--mirta-planika-maslacak-i-sipak.aspx)

1.2. Fitokemijski sastav plodova i listova vrste *Myrtus communis*

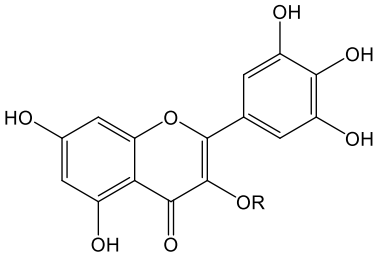
Pregled dosadašnjih znanstvenih istraživanja fitokemijskog sastava ukazuje da su polifenoli i monoterpeni (eterično ulje) glavni sekundarni metaboliti vrste *Myrtus communis* (Slika 2). Najveći broj istraživanja odnosi se na kemijsku analizu bioaktivnih tvari plodova i listova mirte. Najzastupljeniji spojevi iz skupine polifenola su flavonoli, antocijani i trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini i elagtanini). Najveći udio među flavonoidima određen je za derivate miricetin, kvercetina i katehina. Neki od najčešće zastupljenih flavonola u ekstraktima mirte su miricetin-3-O-ramnozid, miricetin-3-O-galaktozid, miricetin-3-O-glukozid, kvercetin-3-O-rutinozid, kvercetin-3-O-ramnozid. Plodovi, odnosno perikarp plodova mirte, bogat su izvor glikozida delfinidina, petunidina, cijanidina i malvidina koji im daju karakterističnu tamno plavu do crnu boju. Ustanovljeno je da listovi i plodovi mirte također sadrže fenolne kiseline i kondenzirane trjeslovine (proantocijanidini). Fenolne kiseline detektirane u ekstraktima mirte su galna, elagna, kavena, vanilinska i ferulična kiselina (Siracusa i sur., 2019; D'Urso i sur., 2017; Aleksic i Knezevic, 2014; Taamalli i sur., 2013; Barboni i sur., 2010; Wannes i sur., 2010). Osim toga plodovi mirte sadrže masne (linolna, palmitinska, oleinska i starinska kiselina) i organske kiseline (limunska kiselina) (Özcan i sur., 2020; Hacıseferoğulları i sur., 2012; Wannes i sur., 2009). Važne bioaktivne sastavnice mirte su također mirtukomuloni i semimirtukomuloni, oligomerni acetilirani derivati floroglucinola, koji su po prvi puta u prirodi otkriveni upravo u listovima ove vrste (Nicoletti i sur., 2018). Sadržaj i sastav navedenih sastavnica značajno se razlikuje ovisno o biljnom organu, ali i lokalitetu, metodi ekstrakcije i polarnosti ekstrakcijskog otapala (Peredo i sur., 2019; Bouaoudia-Madi i sur., 2017; Pereira i

sur., 2017; Pereira i sur., 2016; Aleksic i Knezevic, 2014). Usporedna istraživanja fitokemijskog sastava plodova i listova mirte su pokazala da ekstrakti listova mirte, dobiveni različitim metodama ekstrakcije, sadrže značajno više ukupnih polifenola u odnosu na ekstrakte plodova (Pereira i sur., 2017; Amensour i sur., 2009).

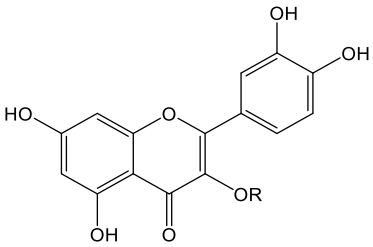
Sastav eteričnih ulja izoliranih iz plodova i listova mirte bio je predmet brojnih znanstvenih istraživanja. Dosad objavljeni rezultati ukazali su na varijabilnost sastava eteričnog ulja odnosno postojanje različitih kemotipova. Kemijski sastav ulja ovisi o brojnim čimbenicima kao što su biljni organ, geografsko podrijetlo, okolišni uvjeti, vrijeme sakupljanja biljnog materijala odnosno vegetacijsko razdoblje, uvjeti skladištenja te varijetet, kultivar ili genotip biljke. Metoda izolacije eteričnog ulja iz biljnog materijala također značajno utječe na sastav ulja (Hennia i sur., 2019; Alipour i sur., 2014; Berka-Zougali i sur., 2012; Ghasemi i sur., 2010). Bez obzira na razlike u sastavu, većina istraživanja je pokazala da glavne komponente pripadaju skupini monoterpena. Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja mirte na različitim područjima rasprostranjenosti u većini slučajeva su bile: a) α-pinen i 1,8-cineol; b) α-pinen, 1,8-cineol i linalol c) α-pinen, 1,8-cineol, limonen i linalol; d) mirtenil-acetat; e) 1,8-cineol, linalol i mirtenil-acetat; f) 1,8-cineol, α-pinen i mirtenil-acetat; g) 1,8-cineol, limonen i mirtenil-acetat; h) α-pinen, 1,8-cineol, limonen, linalol i mirtenil-acetat. Ulje mirte često u značajnom postotku sadrži i α-terpineol. Glavne komponente eteričnih ulja sicilijanskih uzoraka su bile: a) α-pinen, p-cimen, limonen i 1,8-cineol; b) limonen, 1,8-cineol, linalol i geranil-acetat; c) linalol i geranil-acetat; d) α-pinen, 1,8-cineol, limonen, linalol i geranil-acetat. Ostale zastupljene sastavnice eteričnih ulja mirte, ali u rijetkim slučajevima, su bile linalil-acetat, mirtenol, eugenol, β-kariofilen, kamfen, (E)-β-ocimen, β-elemen, triciklen, pentil dekanoat, oktadienol, estragol, cis-geraniol i dihidroeugenol butanoat (Bekhechi i sur., 2019; Hennia i sur., 2019). Dosadašnjim istraživanjima vrste *Myrtus communis* hrvatskog podrijetla obuhvaćen je jedan biljni uzorak sa otoka Visa. Najveći sadržaj eteričnog ulja listova određen je za uzorke sakupljene u srpnju i studenom dok su plodovi najviše ulja imali u listopadu. Mirtenil-acetat, 1,8-cineol + limonen, linalol i α-pinen su bile glavne sastavnice (Jerkovic i sur., 2002).

Biološka aktivnost biljnih pripravaka značajno ovisi njihovom sastavu. Stoga, prethodno navedene dosadašnje znanstvene spoznaje o kemijskom sastavu vrste *Myrtus communis* ukazuju na važnost provedbe fitokemijske analize ekstrakata i eteričnog ulja mirte.

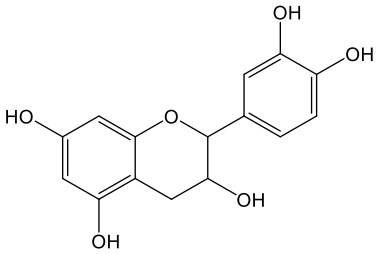
POLIFENOLI



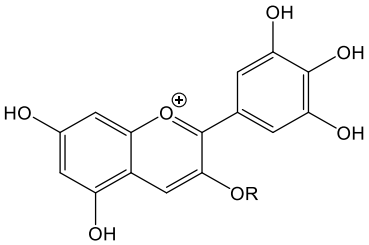
miricetin (R = H)
miricetin-3-O-ramnozid (R = ramnoza)
miricetin-3-O-glukozid (R = glukoza)



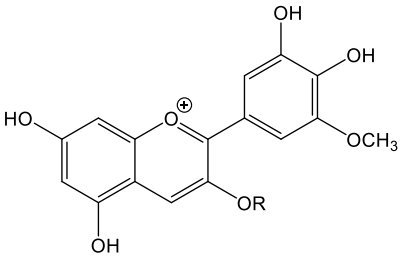
kvercetin (R = H)
kvercetin-3-O-ramnozid (R = ramnoza)



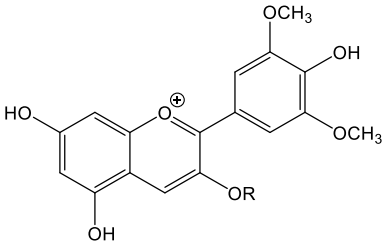
katehin



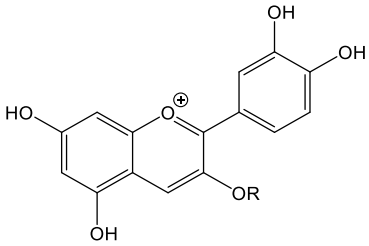
delfinidin (R = H)
delfinidin-3-O-glukozid (R = glukoza)



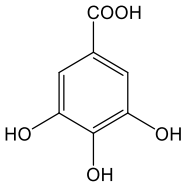
petunidin (R = H)
petunidin-3-O-glukozid (R = glukoza)



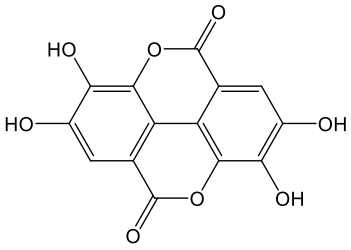
malvidin (R = H)
malvidin-3-O-glukozid (R = glukoza)



cijanidin (R = H)
cijanidin-3-O-glukozid (R = glukoza)

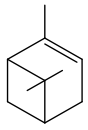


galna kiselina

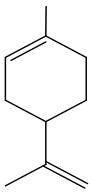


elagna kiselina

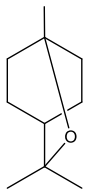
MONOTERPENI



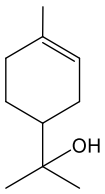
α-pinen



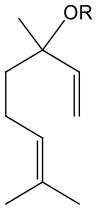
limonen



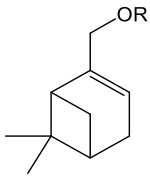
1,8-cineol



α-terpineol



linalol
linalil-acetat (R = acetat)



mirtenol
mirtenil-acetat (R = acetat)

Slika 2. Odabrani sekundarni metaboliti plodova i listova vrste *Myrtus communis*: polifenoli iz ekstrakata i monoterpeni iz eteričnog ulja

1.3. Fitoterapijski potencijal vrste *Myrtus communis*

Biološka aktivnost vrste *Myrtus communis* je bila predmet brojnih znanstvenih istraživanja te je objavljeno više preglednih radova (Giampier i sur., 2020; Sisay i Gashaw, 2017; Bouzabata i sur., 2016; Aleksic i Knezevic, 2014; Alipour i sur., 2014). Mnogobrojna istraživanja su pokazala da ekstrakti listova i plodova mirte, kao i njihovo eterično ulje, pokazuju **antioksidacijski učinak**. Usporedna istraživanja ekstrakata listova i plodova mirte su ukazala na snažnija antioksidacijska svojstva listova koja se pripisuju prisutnosti derivata galne kiseline i/ili flavonola, dok je za antocijane plodova utvrđena slaba učinkovitost. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata ovisi o brojnim faktorima kao što su biljni organ, vrijeme sakupljanja biljnog materijala, skladištenje, ekstrakcijsko otapalo, metoda ekstrakcije i dr. (Hennia i sur., 2018). Eterična ulja mirte su pokazala slabu do umjerenu antioksidacijsku aktivnost što je najvjerojatnije posljedica odsutnosti fenolnih spojeva (Hennia i sur., 2019). Različiti ekstrakti plodova i listova, kao i eterična ulja mirte, puno su istraživana zbog svojih **antibakterijskih** i **antifungalnih svojstava**. Dokazan je dobar antimikrobni učinak na različite komercijalno dostupne sojeve, ali i klinički značajne mikroorganizme koji su višestruko rezistentni na antibiotike. U kombinaciji s antibioticima eterično ulje mirte je djelovalo sinergistički čime se smanjuje učinkovita doza antibiotika i njegove potencijalne nuspojave. Eterično ulje je također pokazalo sposobnost inhibicije stvaranja biofilma. Uklapanjem eteričnog ulja mirte u liposome postignuta je bolja antibakterijska učinkovitost. Mirta djeluje antibakterijski tako što utječe na propusnost stanične stijenke i membrane bakterijskih stanica zbog čega dolazi do gubitka citoplazmatskog sadržaja. Također, djeluje na prijenos elektrona, enzimsku aktivnost i transport nutrijenata. Terpenski spojevi kao što su α-pinen,1,8-cineol, linalol i α-terpineol važne su sastavnice ulja odgovorne za antimikrobni učinak (Mir i sur., 2020; Hennia i sur., 2019; Aleksic i Knezevic, 2014). Mirta je također pokazala **antiparazitski** (rodovi *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trichomas*) i **insekticidni učinak** (porodice Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera i Pulicidae) (Hennia i sur., 2019). Dokazano je **protuupalno djelovanje** mirte na različitim eksperimentalnim modelima upale koje se pripisuje prisutnosti flavonoida i/ili trjeslovina koje hidroliziraju te (semi)mirtukomulona. Neki od mehanizama protuupalnog učinka mirte su bili: inhibicija ciklooksigenaze-1, lipooksigenaze-5, mikrosomalne PGE2 sintaze-1, produkcije dušikovog oksida te stvaranja proupalnih citokina (Cruciani i sur., 2019; Hennia i sur., 2019). U novije vrijeme intezivno se istražuje protektivni učinak mirte na probavni trakt eksperimentalnih životinja. **Antiulkusni učinak** se očituje smanjenjem oštećenja sluznice i markera oksidacijskog stresa, povećanjem aktivnosti antioksidacijskih

enzima i obnovom ionske homeostaze. Istraživanja su pokazala da mirta također inhibira motilitet gastrointestinalnog trakta i izlučivanje tekućine pa ima veliki potencijal u **liječenju dijareje**. **Antidijabetički učinak** mirte je dokazan na nekoliko različitih animalnih modela, a smanjenje razine glukoze je postignuto povećanjem glikolize, glikogeneze te smanjenjem glikogenolize i intestinalne apsorpcije glukoze (Giampier i sur., 2020). Eterično ulje listova mirte, te derivati miricetina izolirani iz listova su pokazali **antimutagenu aktivnost**. Ulje listova i mirtukomuloni su inducirali apoptozu različitih tumorskih staničnih linija (**citotoksični učinak**) (Giampier i sur., 2020; Harassi i sur., 2019). Vodeni ekstrakt listova je u topikalnoj primjeni pokazao **hemostatski učinak** (Ebrahimi i sur., 2019). Rezultati animalnih studija su pokazali da mirta djeluje **kardioprotektivno**. Ekstrakti plodova i listova su djelovali hipolipemijski, antitrombotski i antifibrotski (Giampier i sur., 2020). Također, ekstrakti različite polarnosti plodova i listova mirte su inhibirali aktivnost acetilkolinesteraze, butirilkolinesteraze i tirozinaze što je ukazalo na njihov **neuroprotektivni potencijal** (Tumen i sur., 2012).

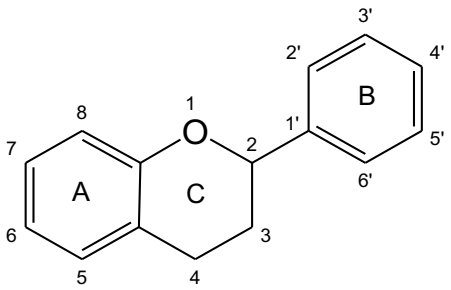
Do sada je provedeno nekoliko kliničkih studija u kojima je ispitana učinkovitost i sigurnost vanjske i unutarnje primjene mirte u različitim farmaceutskim oblicima. Topikalna primjena pripravaka s eteričnim uljem mirte je imala povoljan učinak u liječenju hemoroida, stomatitisa te peruti. Vaginalni gel koji je sadržavao ekstrakt listova mirte i metronidazol pokazao je bolju kliničku učinkovitost u liječenju bakterijskih vaginoza nego sam metronidazol. Primjena sirupa mirte je kod žena s metrohemoragijom smanjila krvarenje. Vodeni ekstrakt plodova je bio jednako učinkovit kao omeprazol u olakšavanju simptoma gastroezofagealne refluksne bolesti (smanjenje refluksa i dispepsije) (Akbar, 2020; Giampier i sur., 2020; Mahboubi, 2017).

1.4. Bioaktivni sekundarni metaboliti vrste *Myrtus communis*

1.4.1. Polifenolni spojevi

Polifenoli su najbrojniji biljni sekundarni metaboliti. Danas je poznato nekoliko tisuća polifenola, spojeva s više od jednom hidroksilnom skupinom vezanom za jedan ili više benzenskih prstenova. Široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu i vrlo zastupljeni u ljudskoj prehrani. U novije vrijeme, ovim se prirodnim spojevima zbog njihove potencijalne primjene u prevenciji i terapiji različitih oboljenja pridaje velika pozornost. Ovisno o broju fenolnih prstenova i strukturnim elementima koji te prstenove povezuju, polifenoli se dijele u nekoliko skupina: flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Vladimir-Knežević i sur., 2012).

Flavonoidi, sa više od 6000 identificiranih struktura, najzastupljenija su skupina biljnih polifenola. To su spojevi strukture tipa C_6-C_3-C_6 kod kojih su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem. U većini flavonoida središnji fragment povezan je s kisikom u piranski prsten (Slika 3).



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida

Razlikujemo nekoliko osnovnih struktura flavonoida: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, flavanonoli, antocijanidini i izoflavonoidi. Navedena podjela se primarno temelji na stupnju oksidacije heterocikličkog prstena (prsten C), zatim dvostrukoj vezi između C2 i C3 središnjeg (C) prstena te hidroksilnim skupinama na B prstenu. Međusobne razlike unutra pojedinih podskupina uvjetovane su brojem i položajem hidroksilnih skupina te opsegom njihove alikilacije i/ili glikozilacije. Flavone karakterizira prisutnost dvostruke veze između C2 i C3 atoma heterocikličkog prstena. Benzenski prsten (B) vezan je na C2 atom dok C3 uglavnom nije supstituiran. Flavonoli na položaju C3 središnjeg prstena imaju hidroksilnu skupinu, dok flavononi imaju zasićeni heterocikliči prsten. Oba navedena svojstva su prisutna u strukturi flavanola. Antocijanidini su pozitivno nabijeni u kiselom pH i taj ravnotežni oblik se naziva flavilium kation. Za razliku od flavonoida kod kojih je benzenski prsten (B) vezan s piranskim prstenom preko C2 atoma, kod izoflavonoida je smješten na C3 atomu. Flavonoidi se u prirodi

pojavljuju u slobodnom obliku ili glikozidno vezani kao O-glikozidi, a ponekad i kao C-glikozidi. Šećernu komponentu najčešće čine glukoza, ramnoza, galaktoza i arabinoza.
Flavonoidi pokazuju brojne biološke učinke te je znanstveno dokazano da djeluju antioksidacijski, antimikrobno, antivirusno, protuupalno, antitutumorski, antitrombozno, kardioprotektivno, neuroprotektivno, hepatoptotektivno, estrogeno i antidijabetički (Santos i sur., 2017; Panche i sur., 2016; Kumar i Pandey, 2013; Vladimir-Knežević i sur., 2012).

Antocijani su velika skupina u vodi topljivih biljnih pigmenata koji, ovisno o pH, daju crvenu, ljubičastu i plavu boju cvjetova, listova, plodova, stabljike i kore. U prirodi dolaze u obliku glikozida kod kojih je aglikon antocijanidin vezan na šećer. Najzastupljeniji antocijanidini su cijanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin i malvidin. Glukoza, galaktoza, arabinoza, rutinoza, ramnoza i ksiloza su najčešći šećeri vezani na antocijanidine kao mono-, di- ili trisaharidi. Šećeri se obično vežu preko hidroksilne skupine na položaju C3 središnjeg prstena ili na C5 i C7 atomu prstena A (Khoo i sur., 2017; Fang, 2014).

Trjeslovine su izrazito heterogena skupina, u vodi topljivih, polifenolnih spojeva vrlo rasprostranjenih u biljnom svijetu. Prema kemijskoj strukturi dijele se na dvije osnovne skupine, kondenzirane trjeslovine i trjeslovine koje hidroliziraju. Kondenzirane trjeslovine ili proantocijanidini su flavanski oligomeri ili polimeri u kojima su jedinice flavan-3-ola povezane C-C vezom, najčešće 4→8 ili rijeđe 4→6. Ovakvim načinom povezivanja nastaju tzv. proantocijanidini tipa B, dok dodatnim povezivanjem flavan-3-ol jedinica između C2 i C7 atoma nastaju proantocijanidini tipa A. Glavni strukturni elementi proantocijanidina su katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin, afzelehin i epiafzelehin. Kondenzirane trjeslovine čiji su osnovni elementi katehin i epikatehin se još nazivaju procijanidini jer njihovom oksidativnom depolimerizacijom nastaje cijanidin. Djelovanjem kiselinama ili enzimima, ili tijekom sušenja i skladištenja biljnog materijala, najčešće dolazi do polimerizacije kondenziranih tjeslovina i nastanka netopljivih crvenih do smeđecrnih produkata flobafena. Trjeslovine koje hidroliziraju su esteri fenolnih kiselina (galne ili elagne kiseline) i šećera. Ovisno o fenolnim kiselinama koje nastaju kao produkti hidrolize, dijele se na galotanine i elagtanine. Galotanini su esteri galne kiseline i poliola, najčešće glukoze. Elagtanini nastaju iz galotanina intramolekularnim povezivanjem najmanje dvije galoil jedinice pri čemu nastaje heksahidroksidifenolna kiselina koja u vodenoj otopini spontano prelazi u elagna kiselinu. Reakcijom između galotanina ili elagtanina i katehinskih jedinaca nastaju kompleksne trjeslovine.

Droge s trjeslovinama se najčešće primjenjuju kao adstrigensi i antidijaroici. Također je znanstveno dokazano da su trjeslovine biološki vrlo aktivni spojevi koji posjeduju antioksidacijsku, antibakterijsku, antivirusnu, protuupalnu, imunomodulacijsku, antialergijsku, antidijabetsku, protutumorsku i vazodilatacijsku aktivnost (Smeriglio i sur., 2017).

1.4.2. Eterično ulje

Eterična ulja su hlapljivi i mirisni sekundarni biljni produkti. Sposobnost stvaranja eteričnog ulja nije općenito raširena u biljnom svijetu te se pokazalo da oko 10 % biljnih vrsta proizvodi eterično ulje. Aromatične biljne vrste vrlo su zastupljene u porodicama Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae i Zingiberaceae. Biljka odlaže eterično ulje u posebnim stanicama, intracelularnim prostorima ili kanalima te u žljezdanim dlakama na površini biljnih organa. Eterična ulja su najvećim dijelom bistre, bezbojne do svijetložute tekućine, a samo je manji broj jače obojen. Sadržaj eteričnog ulja u biljnim drogama je najčešće između 1 % i 2 %. Smatra se da je funkcija eteričnih ulja u biljkama mirisom privući kukce zbog oprašivanja, odbiti biljojede, zaštititi biljku od fitopatogenih mikroorganizama i nametnika, te inhibirati rast drugih biljaka. Eterična ulja se dobro otapaju u lipofilnim otapalima, a teško su topljiva u vodi. Većina ih je lakša od vode te su optički aktivna. Eterična ulja su smjese velikog broja kemijskih spojeva koji pripadaju različitim skupinama spojeva kao što su ugljikovodici, alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, esteri, eteri i laktoni. Uglavnom su 2-3 sastavnice zastupljene u većim koncentracijama (20-70 %) te one određuju mirisna, fizikalno-kemijska i biološka svojstva eteričnog ulja. Najveći broj sastavnica eteričnih ulja su terpeni, spojevi koji se sastoje od izoprenske jedinice $(C_5H_8)_n$. Prema broju ugljikovih atoma terpeni se mogu svrstati u nekoliko skupina, a u eteričnim uljima su uglavnom prisutni monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}). Mogu biti aciklične, mono-, bi- i triciklične strukture. Ostale sastavnice pripadaju uglavnom fenilpropanskim derivatima, lančanim ugljikovodicima te spojevima s dušikom i sumporom (Swamy i sur., 2016; Kuštrak, 2005).

Znanstvenim istraživanjima utvrđen je širok spektar bioloških učinaka eteričnih ulja. Imaju antimikrobni, antiviralni, anthelmintični, repelentni, sedativni, antinociceptivni, protuupalni, analeptični, kao i antioksidacijski, antikancerogeni i antimutageni učinak. Mogu se primijeniti kao ekspektoransi, mukolitici i spazmolitici. Međutim, eterična ulja pokazuju i neke neželjene učinke. Mogu izazvati alergiju, djelovati abortivno, nefrotoksično ili hepatotoksično, a nekim se eteričnim uljima pripisuju kancerogena, narkotična i fotosenzibilizirajuća svojstva (Saad i sur., 2013; Adorjan i Buchbauer, 2010; Pisseri i sur., 2008).

1.5. Metode ekstrakcije bioaktivnih tvari iz biljnog materijala

Prvi korak u znanstvenom istraživanju ljekovitog bilja je ekstrakcija biološki aktivnih sastavnica iz biljnog materijala. Ekstrakcija otapalima je najčešće korištena metoda ekstrakcije, a podrazumijeva postupak izdvajanja i koncentriranja određenih tvari iz biljnog tkiva pomoću odgovarajućeg otapala. Osnovni cilj ekstrakcije je izolacija što veće količine željenih spojeva, a da pritom izolirana tvar ima što veću kvalitetu. To ovisi o veličini čestica biljnog materijala, odnosu droge i otapala, te o uvjetima (vrsta otapala, pH, vrijeme, temperatura) i metodi ekstrakcije (Zhang i sur., 2018). Kao ekstrakcijska sredstva, najčešće se primjenjuju voda, etanol, metanol i etil-acetat, a vrlo se često koristi i smjesa alkohola i vode u različitim volumnim omjerima. Sun i suradnici (2015) su pokazali da je za ekstrakciju polifenola, među različitim koncentracijama etanola, najbolji 75 %-tni etanol. Za pripremu biljnih ekstrakata vrlo se često koriste konvencionalne (klasične) ekstrakcijske metode: maceracija, dekokcija, perkolacija, ekstrakcija uz refluks te soxhlet ekstrakcija. Danas se sve više primjenjuju i nove ekstrakcijske tehnike među koje se ubrajaju superkritična ekstrakcija, ubrzana ekstrakcija otapalima te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvukom, atmosferskom plazmom, enzimima i pulsirajućim električnim poljem. One imaju prednosti pred klasičnim postupcima kao što su veća učinkovitost i selektivnost, smanjena potrošnja otapala, omogućena kontrola temperature (Zhang i sur., 2018). Međutim, treba imati na umu da iako primjena novih metoda u izolaciji bioaktivnih spojeva ima brojne prednosti, one uglavnom zahtijevaju velike troškove samih uređaja, kao i uvjeta za njihovo izvođenje. Istraživanja su pokazala da je za izolaciju različitih skupina polifenola iz listova i plodova mirte ultrazvučna ekstrakcija vrlo učinkovita metoda (Pereira., 2017) te omogućuje ekstrakciju veće količine flavonoida, trjeslovina i antocijana iz perikarpa plodova u odnosu na klasičnu i mikrovalnu ekstrakciju (Bouaoudia-Madi i sur., 2019).

Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala se provodi različitim destilacijskim i ekstrakcijskim postupcima ili mehaničkim putem. Eterična ulja se najčešće izoliraju destilacijom pomoću vodene pare primjenom postupka koji propisuje Europska farmakopeja (EDQM, 2018). U novije vrijeme istražuju se i neke druge metode kao što su mikrovalna i superkritična ekstrakcija (Dima i Dima, 2015). Međutim, sastav eteričnog ulja značajno ovisno o metodi ekstrakcije. Tako se primjerice pokazalo da su ulja dobivena vodenom i parnom destilacijom bogatija terpenskim ugljikovodicima dok ulja dobivena mikrovalnom i superkritičnom ekstrakcijom sadrže veći udio oksigeniranih spojeva (Aleksic i Knezevic, 2014; Berka-Zougali i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U novije vrijeme primjena fitopreparata u svrhu očuvanja zdravlja te prevencije i liječenja različitih akutnih i kroničnih oboljenja, u neprestanom je porastu. Fitopreparati sadrže biljne pripravke kao što su ekstrakti i eterična ulja koji su bogat izvor strukturno različitih bioaktivnih molekula. Stoga je fitokemijska karakterizacija biljnih pripravaka važan pokazatelj njihove biološke učinkovitosti.

Hrvatska flora obiluje brojnim ljekovitim vrstama među kojima je i aromatična biljka *Myrtus communis* L. Različiti biljni organi i eterično ulje mirte široko se primjenjuju u farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj i parfemskoj industriji. Dosadašnja znanstvena istraživanja mirte ukazala su na značajne razlike u fitokemijskom sastavu hlapljivih i nehlapljivih sastavnica ovisno o biljnom organu kao i metodi ekstrakcije te korištenom ekstrakcijskom otapalu.

U ovom su radu provedena istraživanja sa sljedećim ciljevima:

- koristeći metodu tankoslojne kromatografije i spektrofotometrijske metode provesti fitokemijsku analizu etanolnih (70 % *V*/*V*) i vodenih ekstrakata plodova i listova vrste *Myrtus communis* dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom,
- primjenom kromatografskih tehnika (tankoslojna i plinska kromatografija) provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu eteričnih ulja izoliranih destilacijom pomoću vodene pare iz plodova i listova vrste *Myrtus communis*.

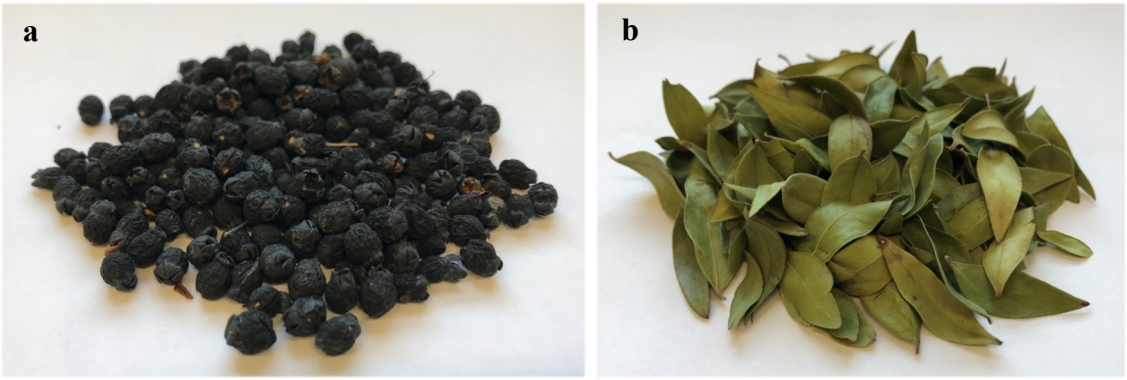
Istraživanja provedena u ovom radu će pružiti nove znanstvene spoznaje o polifenolnim i terpenskim sastavnicama vrste *Myrtus communis*, a dobiveni rezultati predstavljaju osnovu za daljnja istraživanja fitokemijskog sastava te *in vitro* i *in vivo* bioloških učinaka ove vrste.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Istraživani biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su plodovi i listovi biljne vrste *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) sakupljeni u studenom 2018. godine na Dugom otoku (Slika 4). Identifikacija biljnog materijala provedena je u Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta prema dostupnim literaturnim podacima (Kovačić i sur., 2008; Domac, 2002; Tutin i sur., 1972). Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku pri sobnoj temperaturi, uz zaštitu od svjetlosti.



Slika 4. Istraživani biljni materijal: plodovi (a) i listovi (b) biljne vrste *Myrtus communis* L.

3.1.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- kolona za plinsku kromatografiju HP-5ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- liofilizator Alpha 1-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Njemačka)
- maseni spektrometar Agilent 5977A VL MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD)
- plinski kromatograf Agilent 7890B (Agilent Technologies, Palo Alto, SAD)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju TLC silikagel 60 F_{254} (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakuum-uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)

- UV-Vis spektrofotometar *Helios γ* (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

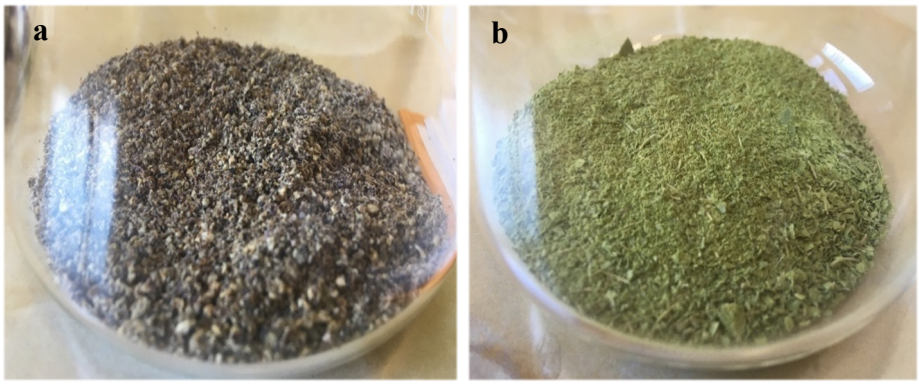
- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- n-alkani (C8-C20) (Supelco, Darmstadt, Njemačka)
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2-aminoetil-difenilborat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- anisaldehid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- butanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- 1,8-cineol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- etanol 96 % p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etil-acetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- Folin-Ciocalteau reagens (Scharlau, Barcelona, Španjolska)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- n-heksan za GC analizu (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kloridna kiselina 37 % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- mirtenil-acetat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- mravlja kiselina 98-100 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- natrijev karbonat dekahidrat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina ≥ 99,5 % (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- pirogalol 99 % (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- sumporna kiselina 95 % (Poch SA, Gliwice, Poljska)
- toluen (Avantor-Macron, Gliwice, Poljska)

3.2. Istraživanje bioaktivnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

3.2.1. Priprema uzoraka i standarda

Na zraku osušen biljni materijal samljeven je u prah (Slika 5). Uzeto je po 0,2 g praškastog uzorka i ekstrahirano 5 minuta s 2 mL metanola na vodenoj kupelji pri 60 °C, uz povratno hladilo. Dobiveni filtrati korišteni su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti flavonoida, fenolnih kiselina i antocijana. Poredbena otopina pripremljena je otapanjem rutina, izokvercitrina i kvercitrina u metanolu u koncentraciji od 0,05 % (Wagner i Bladt, 2009).

Eterično ulje izolirano je postupkom destilacije pomoću vodene pare iz plodova i listova mirte (*poglavlje 3.4.1.*). Uzorci za kromatografiranje pripremljeni su otapanjem 10 µL eteričnog ulja u 1,0 mL heksana. Referentne sastavnice 1,8-cineol i mirtenil-acetat također su otopljene u heksanu.



Slika 5. Osušeni i samljeveni plodovi (a) i listovi (b) vrste *Myrtus communis*

3.2.2. Ispitivanje flavonoida i fenolnih kiselina

Na TLC ploču s tankim slojem silikagela 60 F_{254} su pomoću kapilare linijski, u duljini 10 mm, naneseni uzorci (20 µL) i otopina standarda (10 µL). Za kromatografsku analizu flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima plodova i listova mirte kao pokretna faza korištena je smjesa etil-acetata, mravlje kiseline, ledene octene kiseline i vode u volumnim omjerima 100:11:11:26 (*V*/*V*/*V*/*V*). Odjeljene sastavnice detektirane su nakon prskanja kromatograma specifičnim NS/PEG reagensom (1 %-tna metanolna otopina 2-aminoetil-difenilborata i 5 %-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000) i promatranjem ploče pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i Bladt, 2009).

3.2.3. Ispitivanje antocijana

Prisutnost antocijana u metanolnim ekstraktima plodova i listova mirte ispitana je na TLC ploči (5 x 10 cm) s tankim slojem silikagela 60 F_{254}, korištenjem pokretne faze etil-acetat–mravlja kiselina–ledena octena kiselina–voda (100:11:11:26, *V/V/V/V*). Uzorci su naneseni pomoću kapilare kao linija duljine 10 mm. Detekcija odjeljenih antocijana provedena je promatranjem ploče na vidljivom svjetlu (Wagner i Bladt, 2009).

3.2.4. Ispitivanje eteričnih ulja

TLC analiza eteričnih ulja plodova i listova mirte provedena je na tankom sloju silikagela korištenjem pokretne faze toluen–etil-acetat (93:7, *V/V*). Po 10 µL uzoraka i otopina standarda naneseno je linijski pomoću kapilare(10 mm). Odijeljene sastavnice eteričnih ulja vizualizirane su na dnevnom svjetlu nakon prskanja ploče anisaldehid reagensom (0,5 mL anisaldehida pomiješano s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL koncentrirane sulfatne kiseline) i zagrijavanja u sušioniku na 100-105 °C tijekom 5-10 minuta (Wagner i Bladt, 2009).

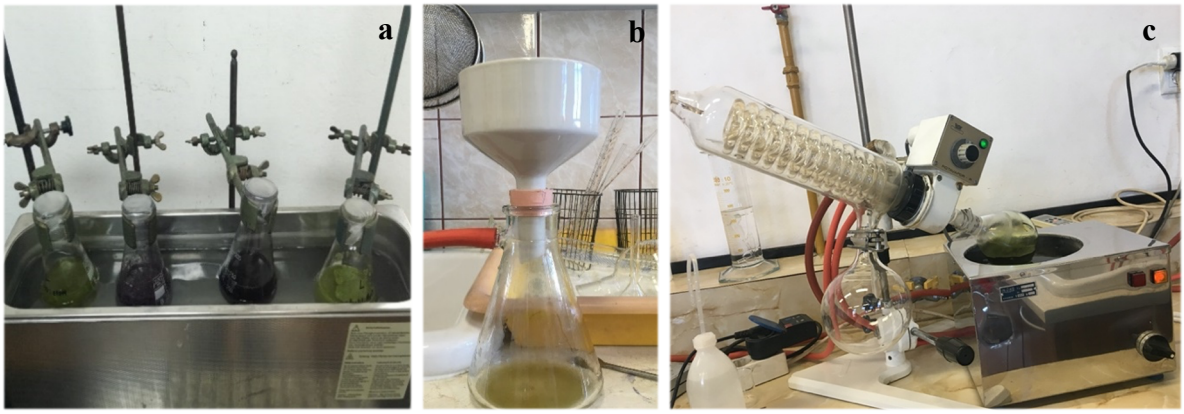
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola

3.3.1. Priprema ekstrakata

U svrhu spektrofotometrijskog određivanja sadržaja različitih skupina polifenolnih sastavnica, pripremljeni su etanolni i vodeni ekstrakti plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis*. Po 10,00 g praškasto usitnjenih plodova i listova mirte pomiješano je sa 100 mL 70 %-tnog etanola ili vode te ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 minuta (Slika 6a). Nakon filtriranja uz pomoć Büchnerovog lijevka (Slika 6b), ostacima biljnog materijala u tikvici i na filtar-papiru dodana je nova porcija od 100 mL istog otapala te je ekstrakcija ponovljena pod istim uvjetima. Dobiveni filtrati su sjedinjeni te im je uklonjeno otapalo. Etanol je uklonjen pomoću rotacijskog vakuum-uparivača (Slika 6c), a voda postupkom liofilizacije. Tikvice sa suhim ekstraktima ostavljene su jedan dan u eksikatoru i potom izvagane. Iskorištenje dobivenih ekstrakata izračunato je prema sljedećoj formuli:

$$\%\ \boldsymbol{iskorištenje} = \frac{\boldsymbol{m_e}}{\boldsymbol{m_d}} \times \mathbf{100}$$

gdje je $\boldsymbol{m_e}$ masa dobivenog ekstrakta u gramima, a $\boldsymbol{m_d}$ masa droge u gramima uzeta za pripremu ekstrakta. Suhi ekstrakti su čuvan u hladnjaku na 4 °C za daljnju analizu.



Slika 6. Priprema ekstrakata: ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji (a), filtriranje preko Büchnerovog lijevka (b), uparavanje uz pomoć rotacijskog vakuum-uparivača (c)

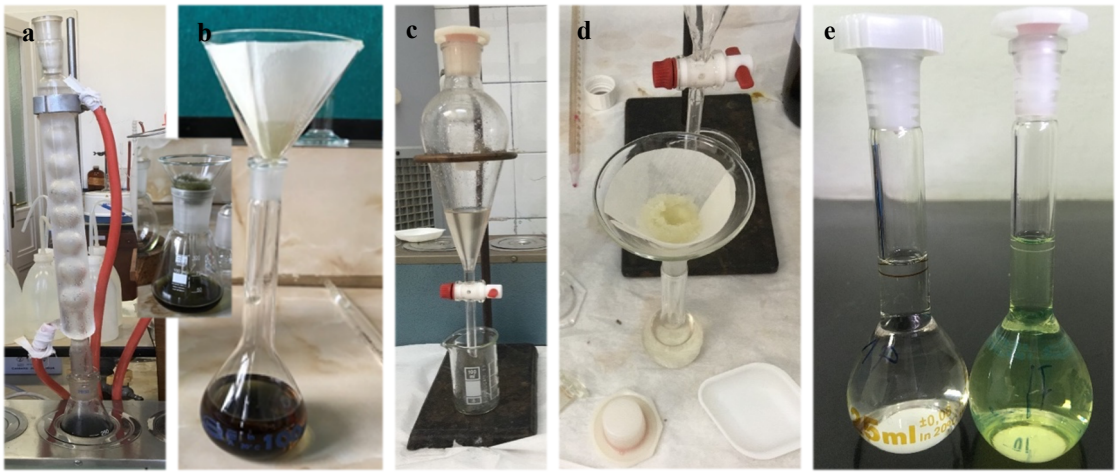
3.3.2. Određivanje flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku (EDQM, 2018). U tikvici okruglog dna od 100 mL odgovarajuća količina suhog ekstrakta prelivena je s 1 mL otopine heksametilentetramina (5 g/L), 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L), te je sadržaj zagrijavan 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo (Slika 7a). Hidrolizat je filtriran preko malo pamuka, a ostaci u tikvici i na pamuku ponovno su ekstrahirani dva puta s 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati filtrirani su preko filtar-papira uz ispiranje tikvice i filtar-papira, te je otopina razrijeđena acetonom do 100,0 mL (Slika 7b). U lijevak za odjeljivanje preneseno je 20,0 mL acetonskog ekstrakta i pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku prvo je izmućkivan s 15 mL etil-acetata (Slika 7c), a zatim još tri puta s po 10 mL etil-acetata. Sjedinjeni etil-acetatni slojevi isprani su dva puta s 50 mL vode te filtrirani preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata (Slika 7d) u odmjernu tikvicu od 50 mL te je sadržaj nadopunjen etil-acetatom do oznake. 10,0 mL dobivenog etil-acetatnog ekstrakta pomiješano je s 1,0 mL reagensa aluminijevog klorida (2,0 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline) u odmjernoj tikvici od 25 mL i razrjeđeno s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake (Slika 7e). Za pripremu poredbene otopine 10,0 mL etil-acetatnog ekstrakta je razrjeđeno do 25,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline (Slika 7e). Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je nakon 30 minuta na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu.

Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercitrozid, izračunat je prema izrazu:

$$\%\ \boldsymbol{flavonoida} = \frac{\boldsymbol{A \times 1,25}}{\boldsymbol{m}}$$

gdje ***A*** predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 425 nm, a ***m*** masu droge u gramima.



Slika 7. Određivanje flavonoida: ekstrakcija na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (a), priprema acetonskog ekstrakta (b), izmućkavanje s etil-acetatom u lijevku za odjeljivanje (c), filtracija preko bezvodnog natrijevog sulfata (d), poredbena i ispitivana otopina (e)

3.3.3. Određivanje trjeslovina

Sadržaj trjeslovina određen je spektrofotometrijskom metodom prema postupku opisanom u Europskoj farmakopeji (EDQM, 2018). Odgovarajuća masa suhog ekstrakta pomiješana je u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode, nakon čega je provedena ekstrakcija zagrijavanjem 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt ohlađen je pod tekućom vodom, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu, razrijeđen destiliranom vodom do 250,0 mL te profiltriran. Prvih 50 mL filtrata je odbačeno dok je ostatak filtrata uzet za analizu. 5,0 mL filtrata je preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjeno vodom do oznake. Potom je 2,0 mL te otopine pomiješano s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL te je sadržaj nadopunjen otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Apsorbacija je izmjerena nakon 30 minuta na 760 nm (A_1), uz vodu kao poredbenu otopinu. Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninskih polifenola), u 10,0 mL filtrata dodano je 0,1000 g kožnog praška i sadržaj tikvice snažno je mućkan tijekom 60 minuta. Nakon filtriranja, 5,0 mL dobivenog filtrata razrijeđeno je vodom do 25,0 mL, potom je 2,0 mL te otopine pomiješano u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL

Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode, a sadržaj tikvice je zatim nadopunjen do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Apsorbancija je izmjerena nakon 30 minuta na 760 nm (A_2), uz vodu kao poredbenu otopinu. Standardna otopina pirogalola pripremljena je otapanjem 50,0 mg pirogalola u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL, te je zatim 5,0 mL dobivene otopine razrijeđeno vodom do 100,0 mL. U odmjernoj tikvici od 25 mL, alikvot od 2,0 mL dobivene otopine pomiješan je s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode te je sadržaj tikvice nadopunjen do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbancija na 760 nm (A_3), uz vodu kao poredbenu otopinu. Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

$$\%\ \boldsymbol{trjeslovina} = \mathbf{62,5} \times \frac{(\boldsymbol{A_1} - \boldsymbol{A_2}) \times \boldsymbol{m_2}}{\boldsymbol{A_3} \times \boldsymbol{m_1}}$$

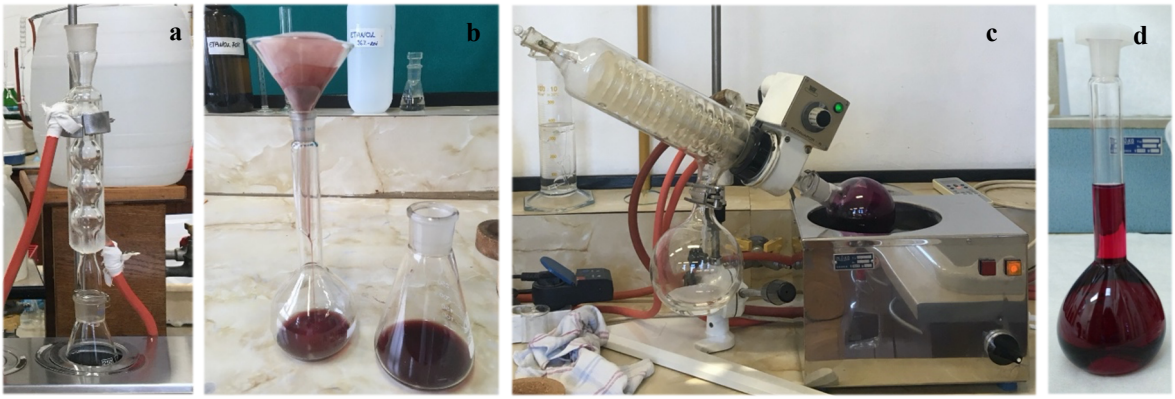
gdje je m_1 masa ispitivanog uzorka u gramima, a m_2 masa pirogalola u gramima.

3.3.4. Određivanje procijanidina

Određivanje sadržaja procijanidina provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku (EDQM, 2018) uz male modifikacije. U tikvici okruglog dna pomiješana je odgovarajuća masa suhog ekstrakta i 30 mL 70 %-tnog etanola te je ekstrakcija provedena zagrijavanjem 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (Slika 8a). Nakon filtriranja (Slika 8b), filtar-papir je ispran s 10,0 mL 70 %-tnog etanola. Filtratu je dodano 15,0 mL kloridne kiseline (250 g/L) i 10,0 mL vode, a zatim je sadržaj tikvice zagrijavan 80 minuta na vodenoj kupelji, pod povratnim hladilom. Nakon što je ohlađena smjesa profiltrirana, ostatak na filtar-papiru ispran je s 70 %-tnim etanolom sve dok filtrat nije postao bezbojan, a potom je filtrat razrijeđen 70 %-tnim etanolom do 250,0 mL. Alikvot dobivene otopine od 25,0 mL prenesen je u tikvicu s okruglim dnom te je reduciran na volumen od oko 3 mL pomoću rotacijskog vakuum-uparivača (Slika 8c), potom je prenesen u ljevak za odjeljivanje, uz ispiranje tikvice s 10 mL i 5 mL vode. Sjedinjene otopine izmućkivane su tri puta s po 15 mL butanola, a dobiveni organski ekstrakti su sjedinjeni i razrijeđeni butanolom do 100,0 mL (Slika 8d). Apsorbancija dobivene otopine izmjerena je na 555 nm, uz butanol kao poredbenu otopinu. Udio procijanidina izračunat je kao cijanidin klorid prema izrazu:

$$\%\ \boldsymbol{procijanidina} = \frac{\boldsymbol{A} \times \mathbf{1000}}{\mathbf{1200} \times \boldsymbol{m}}$$

gdje A predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 555 nm, a m masu droge u gramima.



Slika 8. Određivanje procijanidina: zagrijavanje na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (a), priprema etanolnog ekstrakta (b), uparavanje uz pomoć rotacijskog vakuum-uparivača (c), ispitivana otopina (d)

3.3.5. Određivanje antocijana

Određivanje sadržaja antocijana u ekstraktima plodova mirte provedeno je spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji uz male modifikacije (EDQM, 2018). Odgovarajuća masa ekstrakta pomiješana je s 80 mL metanola i ekstrakcija je provedena mehaničkim miješanjem na tresilici 30 minuta i u ultrazvučnoj kupelji tijekom 10 minuta. Ekstrakt je filtriran u odmjernu tikvicu od 100 mL, filtar-papir ispran metanolom i sadržaj tikvice potom nadopunjem do oznake istim. Alikvot od 0,5 mL te otopine razrijeđen je do 25,0 mL s 0,1 %-tnom otopinom kloridne kiseline (*V/V*) u metanolu. Apsorbancija dobivene otopine izmjerena je na 528 nm, koristeći 0,1 %-tnu metanolnu otopinu kloridne kiseline (*V/V*) kao poredbenu otopinu. Postotni udio antocijana, izražen kao cijanidin-3-glukozid klorid, izračunat je prema izrazu:

$$\%\ \boldsymbol{antocijana} = \frac{\boldsymbol{A} \times \mathbf{5000}}{\mathbf{718} \times \boldsymbol{m}}$$

gdje je $\boldsymbol{A}$ apsorbancija ispitivane otopine na 528 nm, 718 specifični koeficijent apsorbancije cijanidin-3-glukozid klorida na 528 nm, a $\boldsymbol{m}$ masa droge u gramima.

3.4. Istraživanje sastava eteričnog ulja metodom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS)

3.4.1. Izolacija eteričnog ulja

Eterično ulje plodova i listova vrste *Myrtus communis* izolirano je destilacijom pomoću vodene pare u aparaturi koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM, 2018). U tikvicu s destiliranom vodom stavljena je odgovarajuća masa usitnjenog biljnog materijala i provedena je destilacija u trajanju od 3 sata, prethodno prilagođenom brzinom od 2-3 mL po minuti.

3.4.2. GC-MS analiza

Eterična ulja plodova i listova mirte podvrgnuta su analizi u spregnutom sustavu plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (Slika 9). Uzorci za analizu pripremljeni su otapanjem eteričnog ulja u heksanu (1:100) te je po 1 μL uzorka injektirano u split modu (1:50) pri temperaturi 250 °C. Kao plin nositelj korišten je helij, uz protok 1 mL/min. Sastavnice eteričnog ulja odijeljene su u kapilarnoj koloni HP-5ms (5 % fenil-metilpolisiloksan) duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25 μm, uz sljedeći temperaturni program: početna temperatura kolone 60 °C (1 min), zagrijavanje 3 °C/min do 200 °C te zadržavanje temperature kolone 10 min na 200 °C. Odijeljene sastavnice analizirane su na masenom spektrometru (EI 70 eV, *m/z* 40-400). U svrhu izračuna retencijskih indeksa pod istim je uvjetima analizirana i smjesa n-alkana od C-8 do C-20. Obrada rezultata provedena je korištenjem računalnog paketa Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03. Sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom spektara masa u bazi NIST 14, Wiley 9 i HPCH 2205. Identifikacija je također provedena na temelju linearnog retencijskog indeksa (RI) koji je izračunat za svaku odjeljenu sastavnicu prema sljedećem izrazu:

$$\boldsymbol{RI = 100 \times C + 100 \frac{(t_R)_X - (t_R)_C}{(t_R)_{C+1} - (t_R)_C}}$$

gdje je $\boldsymbol{C}$ broj C atoma n-alkana, $\boldsymbol{t_R}$ retencijsko vrijeme za pojedinu sastavnicu, a $\boldsymbol{X}$ komponenta za koju se računa retencijski indeks.

Slika 9. Spregnuti sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa

3.5. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Exel 2010 programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software, La Jolla, SAD). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija triju određivanja. Za testiranje statističke razlike između dvije skupine podataka korišten je t-test. Sva zaključivanja u radu provedena su uz razinu značajnosti $P < 0,05$.

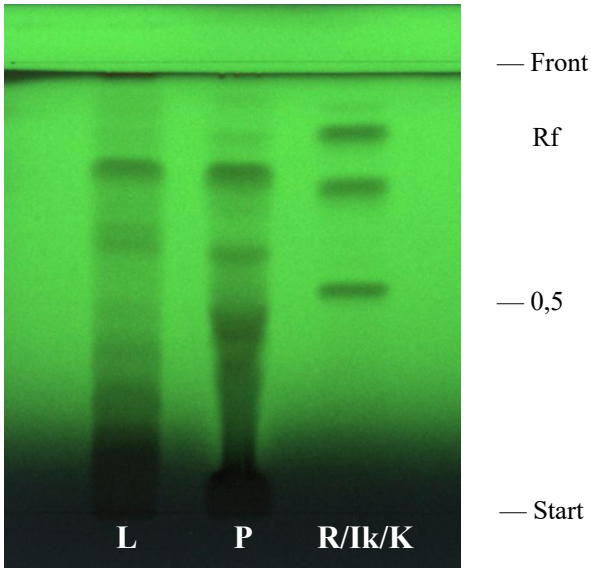
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. TLC karakterizacija bioaktivnih sastavnica

Metanolni ekstrakti plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis* analizirani su tankoslojnom kromatografijom u svrhu ispitivanja prisutnosti flavonoida, fenolnih kiselina, antocijana i sastavnica eteričnih ulja. Odjeljivanje bioaktivnih sastavnica provedeno je primjenom silikagela kao adsorbensa (nepokretna faza), odgovarajućih pokretnih faza i reagensa za detekciju. Sastavnice su karakterizirane prema položaju odijeljenih zona tj. faktoru zaostajanja (R_F, odnos udaljenosti koju prijeđe supstancija i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza) te boji i intenzitetu obojenja tih zona, u usporedbi s odgovarajućim referentnim spojevima (Kaštelan-Macan i sur., 2006).

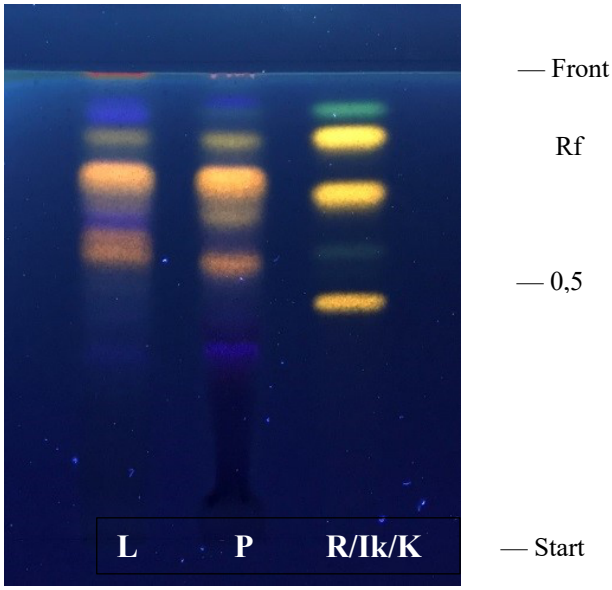
4.1.1. Flavonoidi

Odjeljivanje flavonoida i fenolnih kiselina u ispitivanim ekstraktima na tankom sloju silikagela postignuto je primjenom smjese otapala etil-acetat, mravlja kiselina, ledena octena kiselina i voda u omjeru 100:11:11:26 (*V/V/V/V*). Flavonoidi i fenolne kiseline se vizualiziraju pod UV svjetlom na 254 nm kao zone gašenja fluorescencije (Slika 10) i nakon prskanja ploče NS/PEG reagensom pri čemu nastaju spojevi koji pod utjecajem UV zračenja (365 nm) fluoresciraju (Slika 11). Na kromatogramu dobivenom nakon prskanja i promatranja ploča na 365 nm vidljivo je po četiri zone narančaste fluorescencije u R_F području od 0,55 do 0,95 koje ukazuju na prisutnost flavonoidnih glikozida. Kromatografsku sliku ekstrakata listova i plodova mirte karakterizirala je prisutnost intezivne narančaste zone R_F vrijednosti 0,75 za koju se može pretpostaviti pripadnost miricetinskim derivatim budući su dosadašnja fitokemijska istraživanja mirte pokazala da su glikozidi miricetina najzastupljeniji flavonoidi ove biljne vrste. Usporedbom kromatograma istraživanih ekstrakata i poredbene otopine, u oba je ekstrakta detektirana prisutnost kvercitrina (R_F = 0,86) što je u skladu s dosad objavljenim istraživanjima (D'Urso i sur., 2019). Zone plave fluorescencije koje pripadaju fenolnim kiselinama nisu uočene.



Slika 10. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoida u listovima (**L**) i plodovima (**P**) vrste *Myrtus communis*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254} TLC ploča
Pokretna faza: etil-acetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26, *V*/*V*/*V*/*V*)
Detekcija: UV-254 nm
Poredbene tvari: **R** – rutin (R_F = 0,51), **Ik** – izokvercitrin (R_F = 0,75), **K** – kvercitrin (R_F = 0,86)

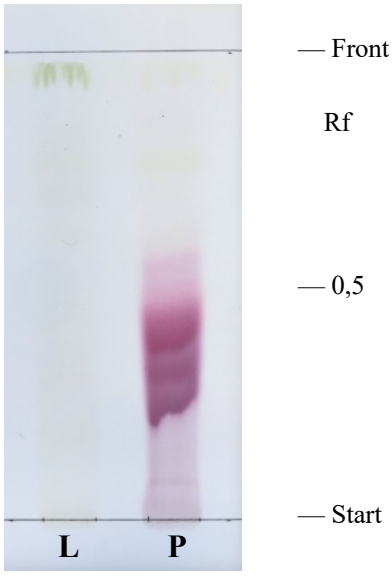


Slika 11. Zone fluorescencije na kromatogramu flavonoida u listovima (**L**) i plodovima (**P**) vrste *Myrtus communis*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254} TLC ploča
Pokretna faza: etil-acetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26, *V*/*V*/*V*/*V*)
Detekcija: NS/PEG, UV-365 nm
Poredbene tvari: **R** – rutin (R_F = 0,51), **Ik** – izokvercitrin (R_F = 0,75), **K** – kvercitrin (R_F = 0,86)

4.1.2. Antocijani

U svrhu ispitivanja prisutnosti antocijana provedeno je kromatografsko odjeljivanje metanolnih ekstrakata listova i plodova mirte na tankom sloju silikagela primjenom prikladne smjese otapala etil-acetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda u omjeru 100:11:11:26 (*V/V/V/V*). Detekcija odjeljenih antocijana provedena je promatranjem ploče na vidljivom svjetlu (Slika 12). Na kromatogramu plodova vrste *Myrtus communis* uočeno je nekoliko ružičastih zona (slabo odjeljenih) koje ukazuju na prisutnost antocijana. U ekstraktu lista nije dokazana prisutnost antocijana.

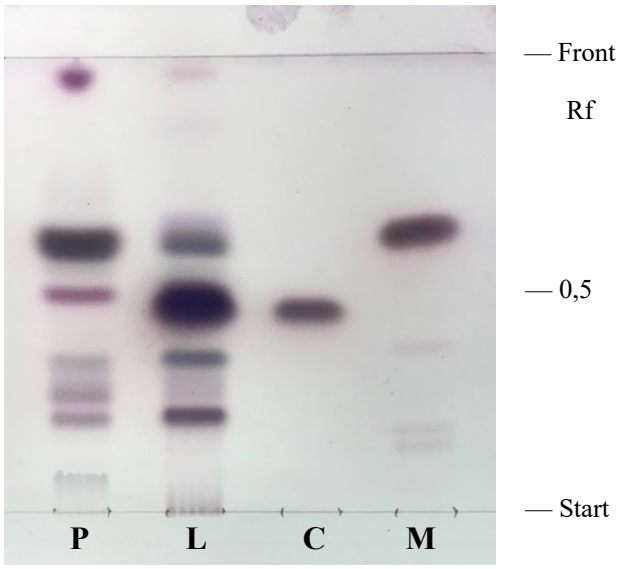


Slika 12. Kromatogram antocijana u listovima (**L**) i plodovima (**P**) vrste *Myrtus communis*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254} TLC ploča
Pokretna faza: etil-acetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26, *V/V/V/V*)
Detekcija: VIS

4.1.3. Eterično ulje

Eterična ulja plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis* izolirana su metodom hidrodestilacije. Odjeljivanje sastavnica provedeno je na tankom sloju silikagela korištenjem smjese toluena i etil-acetata u volumnim omjerima 93:7. Nakon vizualizacije sastavnica anisaldehid-sumpornom kiselinom i zagrijavanja, dobiven je kromatogram koji je prikazan na Slici 13. Najzastupljenije terpenske sastavnice eteričnih ulja karakterizirane su korištenjem poredbenih otopina koje su sadržavale 1,8-cineol i mirtenil-acetat. Kromatografsku sliku eteričnog ulja plodova karakterizirala je prisutnost intezivne ljubičastosive zone R_F vrijednosti 0,62 koja je bojom i položajem odgovarala poredbenom mirtenil-acetatu. Na kromatogramu eteričnog ulja listova mirte isticala se intenzivna ljubičastosiva zona koja je kromatografski odgovarala 1,8-cineolu. U eteričnom ulju listova također je detektirana zona koja pripada mirtenil-acetata, ali slabijeg inteziteta nego na kromatogramu eteričnog ulja plodova.



Slika 13. Kromatogram eteričnih ulja plodova **(P)** i listova **(L)** vrste *Myrtus communis*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254} TLC ploča
Pokretna faza: toluen-etil-acetat (93:7, *V/V)*
Detekcija: anisaldehid reangens, 100-105 °C, Vis
Poredbene tvari: **C** – 1,8-cineol (R_F = 0,46), **M** – mirtenil-acetat (R_F = 0,62)

4.2. Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama

Fitokemijska analiza ekstrakata plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis* provedena je primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda prema postupcima Europske farmakopeje. U tu svrhu, uz pomoć ultrazvuka, pripremljeni su etanolni (70 %, *V/V*) i vodeni ekstrakti plodova i listova mirte (P-EtOH, L-EtOH, P-H_2O i L-H_2O). Iskorištenja dobivenih suhih ekstrakata prikazana su u Tablici 1. Iskorištenja za plodove iznosila su 28,0 % za vodeni ekstrakt i 29,2 % za etanolni ekstrakt, dok je za ekstrakte listova dobiveno više etanolnog ekstrakta (26,4 %) nego vodenog (22,0 %). U ekstraktima je određen sadržaj ukupnih flavonoida, trjeslovina, procijanidina (kondenziranih trjeslovina) i antocijana.

Tablica 1. Iskorištenja etanolnih i vodenih ekstrakata plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis*

Biljni organ	Ekstrakcijsko otapalo Ekstrakt	Iskorištenje (%)
	etanol (70 %, *V/V*) **P-EtOH**	29,2
	voda **P-H_2O**	28,0
	etanol (70 %, *V/V*) **L-EtOH**	26,4
	voda **L-H_2O**	22,0

4.2.1. Flavonoidi

Farmakopejski postupak spektrofotometrijskog određivanja sadržaja flavonoida uključuje ekstrakciju istraživanih biljnih ekstrakata sa smjesom acetona i kloridne kiseline pri čemu dolazi do hidrolize flavonoidnih glikozida (odcjepljivanje šećernog dijela molekule). Zatim se izmućkavanjem s etil-acetatom odijeljuju slobodni aglikoni koji s ionima aluminija(III) stvaraju žuto obojene komplekse s maksimumom apsorbancije na 425 nm. Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercitrozid, izračuna se pomoću specifične apsorbancije koja za izokvercitrozid na 425 nm iznosi 500. Iz rezultata prikazanih u Tablici 2 vidljivo je da je sadržaj flavonoida u istraživanim ekstraktima bio u rasponu od 0,52% do 3,42 %. Udio flavonoida u

etanolnim ekstraktima plodova i listova (1,35 % i 3,42 %) bio je veći u odnosu na udio određen u vodenim ekstraktima (0,85 % i 0,52 %).

Tablica 2. Udio i masa flavonoida u etanolnim i vodenim ekstraktima plodova i listova vrste *Myrtus communis*

Ekstrakt	Flavonoidi (%)	Flavonoidi (mg, ekstrakt)
P-EtOH	$1,35 \pm 0,01^{a}$	$39,6 \pm 0,2^{a}$
P-H_2O	$0,85 \pm 0,02^{b}$	$23,7 \pm 0,6^{b}$
L-EtOH	$3,42 \pm 0,05^{c}$	$90,2 \pm 1,3^{c}$
L-H_2O	$0,52 \pm 0,01^{d}$	$11,6 \pm 0,2^{d}$

Vrijednosti označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$).

Uzimajući u obzir iskorištenje ekstrakta i dobiveni udio flavonoida u ekstraktu, izračunata je masa flavonoida (mg) koja je ekstrahirana iz 10,00 grama biljnog materijala (Tablica 2). Etanolni ekstrakt listova sadržavao je više flavonoida nego etanolni ekstrakt plodova, dok je suprotno utvrđeno za vodene ekstrakte, odnosno vodeni ekstrakt plodova je sadržavao više flavonoida u odnosu na vodeni ekstrakt listova. Rezultati su pokazali da je za ekstrakciju favonoida 70 %-tni etanol bolje ekstrakcijsko sredstvo u odnos na vodu. U etanolnom ekstraktu listova je dobivena čak 9 puta veća vrijednost nego u vodenom.

4.2.2. Trjeslovine

U svrhu određivanja sadržaja trjeslovina korištena je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na određivanju ukupnih polifenola prije i nakon obrade kožnim praškom na koji se vežu trjeslovine. Polifenolne sastavnice u reakciji s Folin Ciocalteuovim reagensom (fosfomolibdenovolframovim reagensom) formiraju plavo obojene komplekse s maksimumom apsorbancije na 760 nm. Sadržaj trjeslovina određuje se iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak. Udio ukupnih polifenola i trjeslovina izražen je kao pirogalol, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 3. Također su izračunate količine ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima uzimajući u obzir iskorištenja dobivenih ekstrakata (Tablica 3). Najveći udio ukupnih polifenola određen je u etanolnom ekstraktu lista (18,90 %) te je nešto niži postotak određen u vodenom ekstraktu istog organa (17,79 %). Udio polifenola u ekstraktima plodova je bio dvostruko i trostruko manji u odnosu na odgovarajuće

ekstrakte listova te je određeno da etanolni ekstrakt ploda sadrži 9,41 %, a vodeni 6,35 %. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da su ekstrakti listova vrste *Myrtus communis* bogatiji izvor polifenola u odnosu na ekstrakte plodova.

Tablica 3. Udio i masa ukupnih polifenola i trjeslovina u etanolnim i vodenim ekstraktima plodova i listova vrste *Myrtus communis*

Ekstrakt	Ukupni polifenoli (%)	Ukupni polifenoli (mg, ekstrakt)	Trjeslovine (%)	Trjeslovine (mg, ekstrakt)
P-EtOH	$9,41 \pm 0,01^{a}$	$274,7 \pm 0,01^{a}$	$5,12 \pm 0,06^{a}$	$149,4 \pm 1,9^{a}$
P-H_2O	$6,35 \pm 0,13^{b}$	$177,8 \pm 3,6^{b}$	$3,63 \pm 0,08^{b}$	$101,5 \pm 2,2^{b}$
L-EtOH	$18,90 \pm 0,16^{c}$	$499,0 \pm 4,1^{c}$	$14,12 \pm 0,30^{c}$	$372,9 \pm 7,7^{c}$
L-H_2O	$17,79 \pm 0,13^{d}$	$391,7 \pm 3,2^{d}$	$13,41 \pm 0,03^{d}$	$295,1 \pm 0,8^{d}$

Vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$).

Najviši udio trjeslovina sadržavao je etanolni ekstrakt listova (14,12 %) te je sličan udio (13,41 %) određen i za vodeni ekstrakt tog biljnog organa. U etanolnom ekstraktu plodova je određen gotovo tri puta manji postotak trjeslovina (5,12 %) nego u etanolnom ekstraktu listova. Najmanji sadržaj trjeslovina (3,63 %), kao i ukupnih polifenola, određen je u vodenom ekstraktu plodova. Kao i za ukupne polifenole, 70 %-tni etanol se u odnosu na vodu pokazao kao bolje ekstrakcijsko sredstvo za trjeslovine (1,4 puta više trjeslovina ekstrahirano je u etanolne ekstrakte nego u vodene). Dobiveni rezultati su pokazali da ekstrakti listova mirte sadrže znatno više trjeslovina u odnosu na plodove.

4.2.3. Procijanidini

Određivanje sadržaja procijanidina (kondenziranih trjeslovina) provedeno je prema farmakopejskom postupku koji uključuje njihovu ekstrakciju razrijeđenim etanolom, a zatim zagrijavanje u prisutnosti kloridne kiseline. Oksidativnom depolimerizacijom nastaju flavanolske monomerne jedinice koje u kiselom mediju stvaraju crveno obojene cijanidin katione koji se ekstrahiraju butanolom. Apsorbancija crvene otopine mjeri se na 555 nm, a sadržaj procijanidina se izrazi prema cijanidin kloridu. Dobiveni udjeli i sadržaj procijandina u gramima prikazani su u Tablici 4. Sadržaj procijanidina u etanolnim i vodenim ekstraktima plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis* bio je u rasponu 0,15-2,86 %. Znatno veći udio procijanidina određen je u ekstraktima plodova mirte nego u ekstraktima listova. Etanolni ekstrakt plodova sadržavao je 2,86 % procijandina, a vodeni 1,60 %. U etanolnom i vodenom

ekstraktu listova određeno je 0,32 % i 0,15 % procijanidina, što je otprilike 10 puta manje u odnosu na odgovarajuće ekstrakte plodova. Ako uspoređujemo učinkovitost ekstrakcijskih otapala, etanolni ekstrakti plodova i listova su sadržavali više procijandina u odnosu na vodene ekstrakte odgovarajućih biljnih organa.

Tablica 4. Udio i masa procijanidina u etanolnim i vodenim ekstraktima plodova i listova vrste *Myrtus communis*

Ekstrakt	Procijanidini (%)	Procijanidini (mg, ekstrakt)
P-EtOH	$2,86 \pm 0,01^{a}$	$83,5 \pm 0,01^{a}$
P-H_2O	$1,60 \pm 0,01^{b}$	$44,8 \pm 0,3^{b}$
L-EtOH	$0,32 \pm 0,01^{c}$	$8,4 \pm 0,01^{c}$
L-H_2O	$0,15 \pm 0,01^{d}$	$3,21 \pm 0,05^{d}$

Vrijednosti označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$).

4.2.4. Antocijani

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja antocijana zasniva se na njihovom svojstvu da u jako kiseloj sredini (pH = 1) povećavaju apsorbanciju na valnoj duljini 528 nm. Udio antocijana izračuna se kao cijanidin-3-glukozid klorid uzevši u obzir da specifična apsorbancija cijanidin-3-glukozid klorida na 528 nm iznosi 718. Sadržaj antocijana određen je samo u ekstraktima plodova jer rezultati provedene TLC analize nisu pokazali prisutnost antocijana u listovima mirte (Tablica 5). Kao i u ostalim metodama određivanja, 70 %-tni etanol se pokazao boljim ekstrakcijskim otapalom u odnosu na vodu. Određeno je da etanolni ekstrakt plodova sadrži 4,80 % antocijana, dok je vodeni ekstrakt sadržavao 2,88 %.

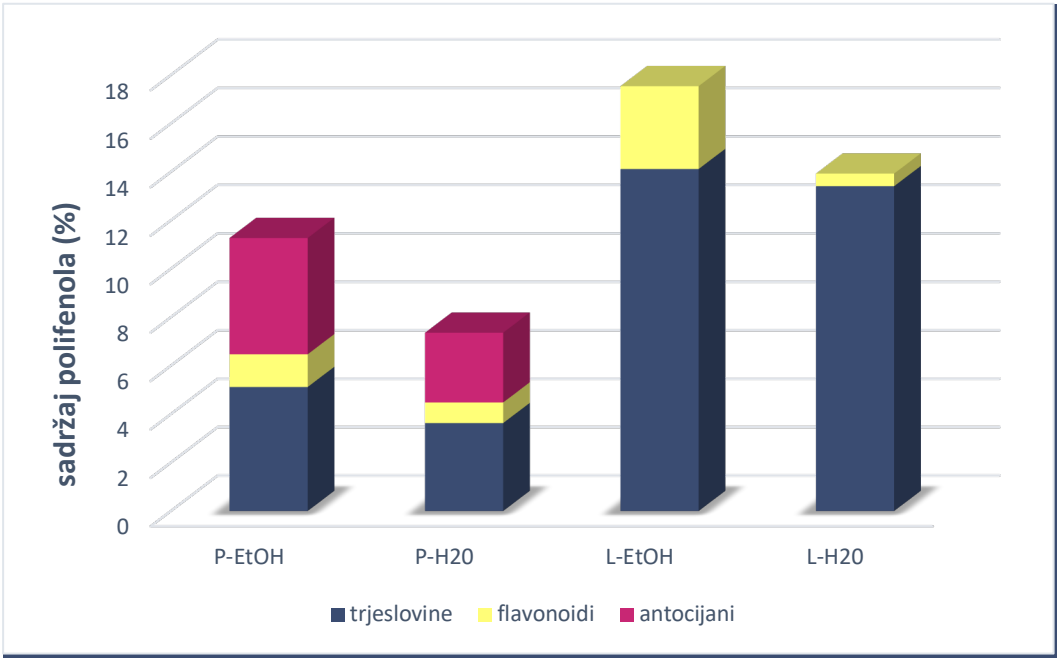
Tablica 5. Udio i masa antocijana u etanolnom i vodenom ekstraktu plodova vrste *Myrtus communis*

Ekstrakt	Antocijani (%)	Antocijani (mg, ekstrakt)
P-EtOH	$4,80 \pm 0,12^{a}$	$140,1 \pm 3,5^{a}$
P-H_2O	$2,88 \pm 0,04^{b}$	$80,7 \pm 1,2^{b}$

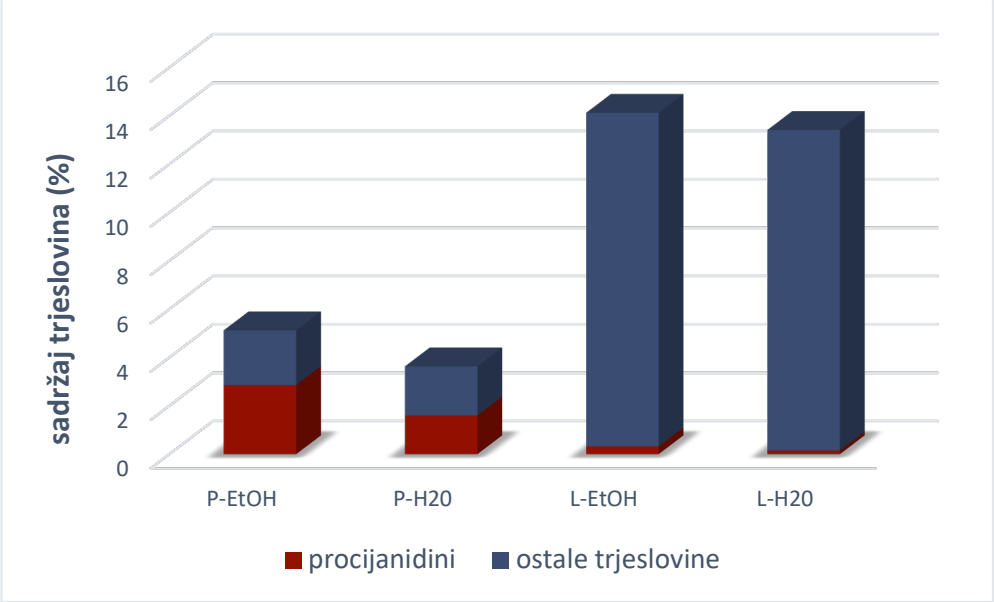
Vrijednosti označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$).

4.2.5. Usporedni prikaz sadržaja polifenola

Na Slici 14 je dan usporedni grafički prikaz sadržaja ukupnih trjeslovina, flavonoida i antocijana u etanolnim i vodenim ekstraktima plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis*. Slika 15 donosi usporedni grafički prikaz sadržaja kondenziranih trjeslovina (procijanidina) i ostalih trjeslovina. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da su ekstrakti plodova mirte bogat izvor antocijana (posebice etanolni ekstrakt), dok ekstrakti listova sadrže visoki udio trjeslovina među kojima najvjerojatnije dominiraju trjeslovine koje hidroliziraju. Ekstrakti plodova su sadržavali znatno manje ukupnih trjeslovina, ali su bogatiji izvor procijanidina. Najveći udio flavonoida određen je u etanolnom ekstraktu listova. Za sve skupine polifenolnih sastavnica čiji sadržaj je u ovom radu određen spektrofotometrijski, pokazalo se da je 70 %-tni etanol bolje ekstrakcijsko otapalo u odnosu na vodu. Samo je udio trjeslovina u ekstraktima listova bio međusobno vrlo sličan dok su za sve druge skupine polifenolnih spojeva znatno veći udjeli dobiveni za etanolne ekstrakte.



Slika 14. Usporedni prikaz udjela ukupnih trjeslovina, flavonoida i antocijana u etanolnim vodenim ekstraktima plodova i listova vrste *Myrtus communis*

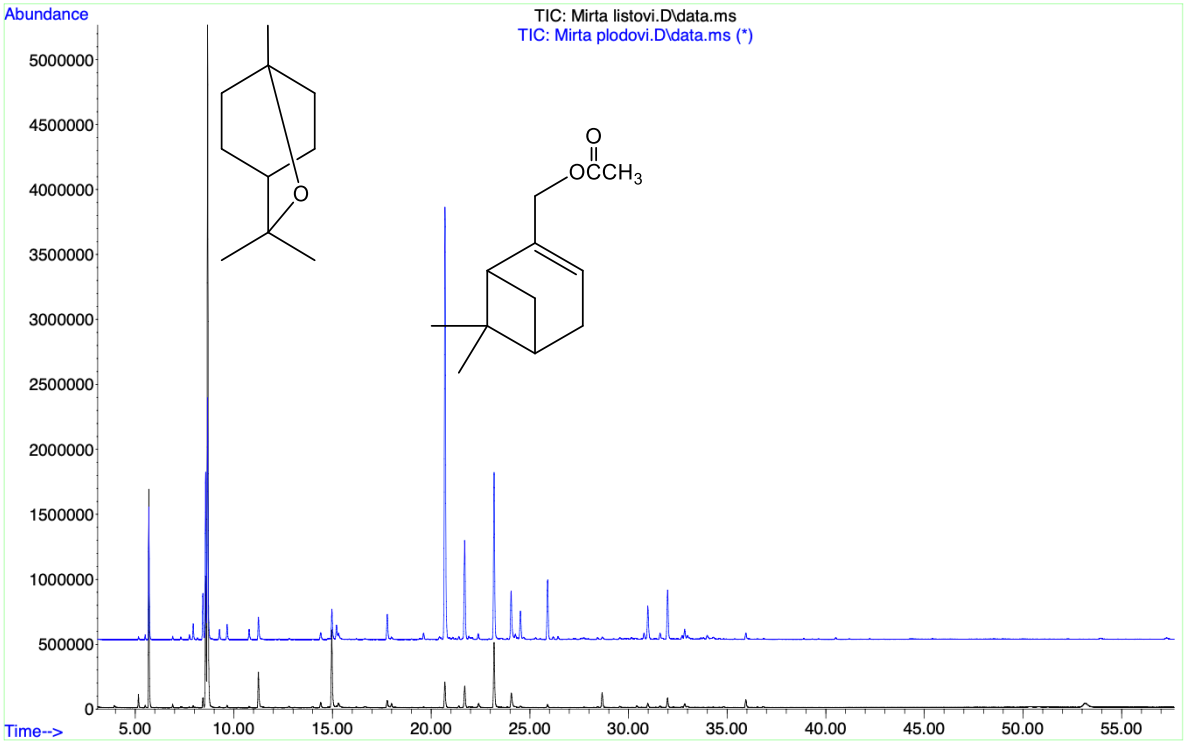


Slika 15. Usporedni prikaz udjela ukupnih procijanidina i ostalih trjeslovina u etanolnim i vodenim ekstraktima plodova i listova vrste *Myrtus communis*

4.3. Kromatografski profil eteričnog ulja

Istražen je sastav eteričnog ulja plodova i listova vrste *Myrtus communis*. Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnog ulja, izoliranog destilacijom vodenom parom provedena je spregnutim sustavom plinski kromatograf-spektrometar masa (GC-MS), uz uvjete opisane u poglavlju 3.4.2. Sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom dobivenih masenih spektara s masenim spektrima pohranjenim u dostupnim bazama podataka (NIST 14, Wiley 9 i HPCH 2205). Identifikacija je također provodena prema retencijskom indeksu (RI) koji se izračuna za svaku odijeljenu sastavnicu nakon što je pod istim uvjetima analizirana smjesa n-alkana od C-8 do C-20, te usporedi s vrijednostima dostupnim u bazama podataka. Karakteristični plinski kromatogrami eteričnih ulja plodova i listova mirte prikazani su na Slici 16. U Tablici 6 su navedene identificirane sastavnice prema redoslijedu zadržavanja u koloni HP-5ms. U oba su eterična ulja ukupno identificirane 34 sastavnice. U eteričnom ulju plodova su identificirane 33 komponente koje su činile 96,5 % ukupnog ulja, dok je ulje listova sadržavalo manji broj sastavnica (22), a činile su 96,9 % ulja. Ustanovljeno je da osnovu eteričnog ulja plodova i listova čine monoterpeni (80,6 % i 92,8 %), dok su seskviterpeni prisutni u značajno manjoj količini (11,8 % i 1,5 %) (Tablica 7). Među monoterpenima oba eterična ulja veći je udio spojeva s kisikom (62,2 % i 70,2 %) u odnosu na ugljikovodike (18,4 % i 22,6 %). Od monoterpena s kisikom u eteričnom ulju plodova najviše je bilo estera (45,9 %), dok su u eteričnom ulju listova najprisutniji bili eteri (48,6 %). Eterično ulje plodova je

sadržavalo podjednako seskviterpenskih ugljikovodika (5,8 %) i seskviterpena s kisikom (6,0 %). Među seskviterpenima ulja listova više je bilo spojeva s kisikom (1,3 %) nego ugljikovodika (0,3 %). Seskviterpenske spojeve s kisikom u oba ulja uglavnom ili u potpunosti čine eteri. Udio alifatskih spojeva je iznosio 0,1 % za eterično ulje plodova i 0,9 % za ulje listova. U oba eterična ulja bili su prisutni fenilpropani s udjelom 3,9 % (plod) i 1,7 % (list). Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja plodova su bile mirtenil-acetat (27,5 %), 1,8 cineol (11,8 %) i geranil-acetat (10,1 %). Od ostalih zastupljenijih sastavnica bili su prisutni limonen (7,8 %), α-terpinil-acetat (6,1 %) i α-pinen (5,1 %). U eteričnom ulju listova najviše je bilo 1,8-cineola (48,6 %) i α-pinena (12,3 %), a ostale zastupljenije sastavnice su bile limonen (9,1 %), α-terpineol (6,9 %) i geranil-acetat (5,9 %).



Slika 16. Karakteristični plinski kromatogrami eteričnih ulja izoliranih iz plodova i listova vrste *Myrtus communis*

Tablica 6. Sastav eteričnih ulja plodova i listova vrste *Myrtus communis*

Sastavnica	RI HP-5ms	Udio (%)	
		Plod	List
trans-2-heksenal	-	-	0,15
izobutil-izobutirat	913	0,11	0,74
α-tujen	926	0,18	0,14
α-pinen	932	**5,10**	**12,31**
β-pinen	976	0,15	0,22
mircen	991	0,14	-
α-felandren	1005	0,23	-
δ-3-karen	1010	0,74	-
p-cimen	1024	2,21	0,66
limonen	1028	**7,79**	**9,10**
1,8-cineol	1030	**11,81**	**48,59**
trans-β-ocimen	1047	0,53	-
γ-terpinen	1057	0,77	0,17
terpinolen	1088	0,55	-
linalol	1101	1,25	2,83
terpinen-4-ol	1177	0,46	0,47
α-terpineol	1190	1,90	**6,91**
mirtenol	1196	0,90	-
metil kavikol	1199	0,50	0,39
linalil-acetat	1256	1,58	0,80
metil citronelat	1261	0,15	0,37
mirtenil-acetat	1325	**27,45**	2,41
α-terpinil-acetat	1349	**6,05**	1,96
neril-acetat	1365	0,38	-
geranil-acetat	1384	**10,07**	**5,90**
metil eugenol	1405	3,43	1,28
β-kariofilen	1417	1,84	-
α-humulen	1451	3,80	0,27
alo-aromadendren	1458	0,18	-
mirtenil-izobutirat	1464	0,19	-
spatulenol	1575	0,36	-
kariofilen oksid	1580	2,27	0,41
humulen epoksid II	1606	3,22	0,86
kariofila-4(12),8(13)-dien-5-β-ol	1633	0,13	-
ukupno identificirano		**96,49**	**96,93**

RI – retencijski indeks

Tablica 7. Udjeli sastavnica u eteričnom ulju plodova i listova vrste *Myrtus communis*

Sastavnice	**Udio (%)**	
	Plod	**List**
Monoterpeni	80,58	92,84
Ugljikovodici	18,39	22,6
Monoterpeni s kisikom	62,19	70,24
Alkoholi	4,51	10,21
Esteri	45,87	11,44
Eteri	11,81	48,59
Seskviterpeni	11,80	1,54
Ugljikovodici	5,82	0,27
Seskviterpeni s kisikom	5,98	1,27
Alkoholi	0,49	0
Eteri	5,49	1,27
Alifatski spojevi	0,11	0,89
Fenilpropani	3,93	1,67

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada provedena je fitokemijska analiza etanolnih i vodenih ekstrakata te eteričnih ulja plodova i listova vrste *Myrtus communis* L. hrvatske flore.

Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata vrste Myrtus communis

Kvalitativna analiza flavonoida, fenolnih kiselina i antocijana u metanolnim ekstraktima plodova i listova mirte provedena je tankoslojnom kromatografijom. Dokazana je prisutnost flavonoida i antocijana u plodovima te flavonoida u listovima mirte.

Primjenom spektrofotometrijskih metoda prema postupcima iz Europske farmakopeje određen je sadržaj različitih skupina polifenola u etanolnim (70 % *V*/*V*) i vodenim ekstraktima plodova (P-EtOH i P-H_2O) i listova (L-EtOH i L-H_2O) vrste *Myrtus communis* pripremljenih ultrazvučnom ekstrakcijom. Dobiveni rezultati su pokazali da su ekstrakti listova mirte bogatiji izvor ukupnih polifenola u odnosu na ekstrakte plodova. Određeno je da etanolni i vodeni ekstrakti listova sadrže 18,90 % i 17,79 % ukupnih polifenola, dok su dvostruko i trostruko niže vrijednosti dobivene za odgovarajuće ekstrakte plodova (P-EtOH: 9,41 % i P-H_2O: 6,35 %). Također, ekstrakti listova su sadržavali znatno veći udio ukupnih trjeslovina (L-EtOH: 14,12 % i L-H_2O: 13,41 %) u odnosu na ekstrakte plodova (P-EtOH: 5,12 % i P-H_20: 3,63 %). Međutim u ekstraktima plodova određen je veći postotak kondenziranih trjeslovina (procijanidina) (P-EtOH: 2,86 % i P-H_2O: 1,60 %) nego u ekstraktima listova (L-EtOH: 0,32 % i L-H_2O: 0,15 %). Udio flavonoida u etanolnim ekstraktima plodova (1,35 %) i listova (3,42 %) bio je veći u odnosu na udio određen u vodenim ekstraktima (P-H_2O: 0,85 % i L-H_2O: 0,52 %). Ekstrakti plodova mirte bogat su izvor antocijana te je određeno da etanolni ekstrakt sadrži 4,80 %, a vodeni ekstrakt 2,88 %. Etanol (70 % *V*/*V*) se pokazao kao bolje ekstrakcijsko sredstvo za izolaciju ukupnih polifenola kao i pojedinačnih skupina polifenolnih sastavnica (flavonoida, trjeslovina i antocijana) iz biljnog materijala.

Provedenim istraživanjem ustanovljeno je da su etanolni (70 % *V*/*V*) ekstrakti plodova i listova vrste *Myrtus communis* bogat izvor različitih skupina polifenola (flavonoida, trjeslovina i antocijana). Vodeni ekstrakt listova sadrži visok udio ukupnih polifenola među kojima najviše trjeslovina.

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja vrste Myrtus communis

Tankoslojnom kromatografijom je dokazana prisutnost terpenskih sastavnica u eteričnim uljima plodova i listova vrste *Myrtus communis*, izoliranih destilacijom pomoću vodene pare. Kromatografsku sliku eteričnog ulja plodova karakterizirala je prisutnost mirtenil-acetata dok je eterično ulje listova bilo bogato 1,8-cineolom.

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja plodova i listova provedena je u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa (GC-MS). U uzorcima eteričnih ulja identificirano je ukupno 34 različite sastavnice koje su činile 97 % ulja. Osnovu oba eterična ulja činili su monoterpeni (80,6 % i 92,8 %) dok su seskviterpeni bili prisutni u značajno manjoj količini (11,8 % i 1,5 %). U oba eterična ulja bili su prisutni fenilpropani s udjelom 3,9 % (plod) i 1,7 % (list). Glavne komponente eteričnog ulja plodova su bile mirtenil-acetat (27,5 %), 1,8-cineol (11,8 %) i geranil-acetat (10,1 %), dok je u ulju listova najveći udio određen za 1,8-cineol (48,6 %) i α-pinen (12,3 %).

6. LITERATURA

Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Frag J*, 2010, 25, 407-426.

Akbar S. Handbook of 200 medicinal plants, a comprehensive review of their traditional medical uses and scientific justifications. 2020, 1251-1262.

Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiol Res*, 2014, 169, 240-254.

Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother Res,* 2014, 28, 1125-1136.

Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat Prod Commun*, 2009, 4, 819-824.

Barboni T, Cannac M, Massi L, Perez-Ramirez Y, Chiaramonti N. Variability of polyphenol compounds in *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) berries from Corsica. *Molecules*, 2010, 15, 7849-7860.

Bekhechi C, Malti CEW, Boussaïd M, Achouri I, Belilet K, Gibernau M, Casanova J, Tomi F. Composition and chemical variability of *Myrtus communis* leaf oil from Northwestern Algeria. *Nat Prod Commun,* 2019, 14, 1-6.

Berka-Zougali B, Ferhat MA, Hassani A, Chemat F, Allaf KS. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 4673-4695.

Bouaoudia-Madi N, Boulekbache-Makhlouf L, Kadri N, Dahmoune F, Remini H, Dairi S, Oukhmanou-Bensidhoum S, Madani K. Phytochemical analysis of *Myrtus communis* plant: Conventional versus microwave assisted-extraction procedures. *J Complement Integr Med* 2017, 14, 20160098.

Bouaoudia-Madi N, Boulekbache-Makhlouf L, Madani K, Silva AMS, Dairi S, Oukhmanou-Bensidhoum S, Cardoso SM. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. pericarp. *Antioxidants*, 2019, 8, 205.

Bouzabata A, Casanova J, Bighelli A, Cavaleiro C, Salgueiro L, Tomi F. The genus *Myrtus* L. in Algeria: Composition and biological aspects of essential oils from *M. communis* and *M. nivellei*: A review. *Chem Biodivers*, 2016, 13, 672-680.

Cruciani S, Santaniello S, Garroni G, Fadda A, Balzano F, Bellu E, Sarais G, Fais G, Mulas M, Maioli M. Myrtus polyphenols, from antioxidants to anti-inflammatory molecules: Exploring a network involving cytochromes P450 and vitamin D. *Molecules,* 2019, 24, 1515.

D'Urso G, Montoro P, Lai C, Piacente S, Sarais G. LC-ESI/LTQOrbitrap/MS based metabolomics in analysis of *Myrtus communis* leaves from Sardinia (Italy). *Ind Crop Prod,* 2018*,* 128, 354-362.

Dima C, Dima S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Curr Opin Food Sci*, 2005, 5, 29-35.

Domac R. Flora Hrvatske, Zagreb: Školska knjiga, 2002, str. 219.

Ebrahimi F, Mahmoudi J, Torbati M, Karimi P, Valizadeh H. Hemostatic activity of aqueous extract of *Myrtus communis* L. leaf in topical formulation: *In vivo* and *in vitro* evaluations. *J Ethnopharmacol,* 2019, 249, 112398.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 9. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2018, str. 285-286., 288., 1276., 1343-1344., 1384-1385.

Fang, J. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab Rev*, 2014, 46, 508-520.

Ghasemi E, Raofie F, Mashkouri-Najafi N. Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*, 2010, 126, 1449-1453.

Giampieri F, Cianciosi D, Forbes-Hernández TY. Myrtle (*Myrtus communis* L.) berries, seeds, leaves, and essential oils: New undiscovered sources of natural compounds with promising health benefits. *Food Front*, 2020, 1-20.

Hacıseferoğulları H, Özcan MM, Arslan D, Ünver A. Biochemical compositional and technological characterizations of black and white myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. *J Food Sci Technol*, 2012, 49, 82-88.

Harassi Y, Tilaoui M, Idir A, Frédéric J, Baudino S, Ajouaoi S, Mouse HA, Zyad A. Phytochemical analysis, cytotoxic and antioxidant activities of *Myrtus communis* essential oil from Morocco*. J Complement Integr Med,* 2019*,* 16, 58664168.

Hennia A, Miguel MG, Nemmiche S. Antioxidant activity of *Myrtus communis* L. and *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. extracts: A brief review. *Medicines*, 2018, 5, 89.

Hennia A, Nemmiche S, Dandlen S, Miguel MG. *Myrtus communis* essential oils: insecticidal, antioxidant and antimicrobial activities: a review. *J Essent Oil Res,* 2019, 31, 487-545.

Jerkovic I, Radonic A, Borcic I. Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils of Croatian *Myrtus communis* (L.) during a one-year vegetative cycle. *J Essent Oil Res*, 2002, 14, 266-270.

Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija, Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006, str. 51.

Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*, 2017, 61, 1-21.

Kovačić S, Nikolić T, Ruščić M, Milović M, Stamenković V, Mihelj D, Jasprica N, Bogdanović S, Topić J. Flora jadranske obale i otoka, Zagreb, Školska knjiga, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2008, str. 59-60.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*, 2013, 2013, ID 162750, 1-16.

Kuštrak D. Farmakognozija – Fitofarmacija, Zagreb: Golden marketing - Tehnička knjiga, 2005, str. 219-225.

Mahboubi M. Effectiveness of *Myrtus communis* in the treatment of hemorrhoids. *J Integr Med,* 2017, 15, 351-358.

Mir MA, Bashir N, Alfaify A, Oteef MDY. GC-MS analysis of *Myrtus communis* extract and its antibacterial activity against Gram-positive bacteria. *BMC Complement Med Ther,* 2020, 20, 1-9.

Myrtus communis - cvjetovi, https://en.wikipedia.org/wiki/Myrtus_communis, pristupljeno 20. 8. 2020.

Myrtus communis - plodovi, https://www.visitlosinj.hr/9-miomirisni-listopad--mirta-planika-maslacak-i-sipak.aspx, pristupljeno 20. 8. 2020.

Nicoletti R, Salvatore MM, Ferranti P, Andolfi A. Structures and bioactive properties of myrtucommulones and related acylphloroglucinols from Myrtaceae. *Molecules*, 2018, 23, 3370.

Özcan, MM, Juhaimi, FA, Ahmed IAM, Babiker EE, Ghafoor K. Antioxidant activity, fatty acid composition, phenolic compounds and mineral contents of stem, leave and fruits of two morphs of wild myrtle plants. *J Food Meas Charact*, 2020, 14, 1376-1382.

Özkan AMG, Güray CG. A mediterranean *Myrtus communis* L. (myrtle). U: Plants and Culture: Seeds of the Cultural Heritage of Europe. Morel JP, Mercuri AM, urednici. Bari, Edipuglia, 2009, str. 159-168.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5, 1-15.

Peredo AVG de, Vázquez-Espinosa M, Espada-Bellido E, Ferreiro-González M, Amores-Arrocha A, Palma, M, Barbero GF, Jiménez-Cantizano A. Alternative ultrasound-assisted method for the extraction of the bioactive compounds present in myrtle (*Myrtus communis* L.). *Molecules,* 2019, 24, 882.

Pereira P, Cebola MJ, Oliveira MC, Bernardo Gil MG. Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds of *Myrtus communis* L. extract obtained by ultrasound-assisted extraction. *J Food Sci Technol*, 2017, 54, 4362-4369.

Pereira P, Cebola MJ, Oliveira MC, Bernardo-Gil MG. Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. *J Supercrit Fluid*, 2016, 113, 1-9.

Pisseri F, Bertoli A, Pistelli L. Essential oils in medicine: principles of therapy. *Parassitologia,* 2008, 50, 89-91.

Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Frag J*, 2013, 28, 269-279.

Santos EL, Maia BH, Ferriani AP, Teixeira SD. Flavonoids: Classification, biosynthesis and chemical ecology. U: Flavonoids - from biosynthesis to human health. Justino GC urednik, London, InTech, 2017, str. 3-16.

Siracusa L, Napoli E, Tuttolomondo T, Licata M, La Bella S, Gennaro MC, Leto C, Sarno M, Sperlinga E, Ruberto G. A two years bio-agronomic and chemotaxonomic evaluation of wild Sicilian myrtle (*Myrtus communis* L.) berries and leaves. *Chem Biodiversity,* 2019, 16, e1800575.

Sisay M, Gashaw T. Ethnobotanical, ethnopharmacological, and phytochemical studies of *Myrtus communis* Linn: A popular herb in Unani system of medicine. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 2017, 22, 1035-1043.

Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *Brit J Pharmacol*, 2017, 174, 1244-1262.

Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evid-Based Compl Alt Med*, 2015, 2015.

Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid-Based Compl Alt Med,* 2016, 2016.

Taamalli A, Iswaldi I, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández Gutiérrez A, Zarrouk M. UPLC–QTOF/MS for a rapid characterisation of phenolic compounds from leaves of *Myrtus communis* L. *Phytochem Anal,* 2014, 25, 89-96.

Tumen I, Senol FS, Orhan IE. Inhibitory potential of the leaves and berries of *Myrtus communis* L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions. *Int J Food Sci Nutr,* 2012, 63, 387-392.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europaea, Vol 3., Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 303.

Vladimir-Knežević S, Blaženković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: Phytochemicals as nutraceuticals - global approaches to their role in nutrition and health. Venketeshwer Rao A, urednik, Rijeka, InTech, 2012, str. 155-180.

Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas, 2. izd., Berlin-Heidelberg: Springer, 2009, str. 149-152., 195-197., 281-289., 359-364.

Wannes WA, Mhamdi B, Marzouk B. Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chem*, 2009, 112, 621-626.

Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48, 1362-137.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*, 2018, 13, 20.

7. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav etanolnih i vodenih ekstrakata te eteričnih ulja plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis* L. Primjenom tankoslojne kromatografijom dokazana je prisutnost flavonoida i antocijana u ekstraktima te terpena u eteričnim uljima. Spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih polifenola i različitih skupina polifenolnih sastavnica u etanolnim (70 % *V*/*V*) i vodenim ekstraktima plodova i listova mirte dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom. Dobiveni rezultati su pokazali da je etanol (70 % *V*/*V*) u usporedbi s vodom bolje ekstrakcijsko otapalo za izolaciju flavonoida, trjeslovina i antocijana iz biljnog materijala. U etanolnom ekstraktu listova je određen najveći udio polifenola (18,9 %) te ukupnih trjeslovina (14,1 %) i flavonoida (3,4 %). Visoki udio ukupnih polifenola i trjeslovina (17,8 % i 13,4 %) određen je također u vodenom ekstraktu listova. Etanolni ekstrakt plodova je bio bogat izvor antocijana (4,8 %) i kondenziranih trjeslovina (2,9 %). Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja plodova i listova mirte izoliranih hidrodestilacijom provedena je u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa (GC-MS). Ukupno je identificirano 34 različita spoja koji su činili 97 % ulja. U oba eterična ulja dominirali su monoterpeni (80,6 % i 92,8 %). Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja plodova su bile mirtenil-acetat (27,5 %), 1,8-cineol (11,8 %) i geranil-acetat (10,1 %) dok je u eteričnom ulju listova najviše bilo 1,8-cineola (48,6 %) i α-pinena (12,3 %).

In this diploma thesis, a study of the phytochemical composition of the ethanolic and water extracts, as well as essential oils of *Myrtus communis* L. berries and leaves was conducted. The presence of flavonoids and anthocyanins in the extracts and terpenes in the essential oils was detected by thin-layer chromatography. The contents of total polyphenols and different polyphenolic components in the ethanolic (70 % *V*/*V*) and water extracts of myrtle berries and leaves obtained by ultrasonic extraction was determined spectrophotometrically. The obtained results showed that ethanol (70 % *V*/*V*) is a better extraction solvent than water for the isolation of the flavonoids, tannins and anthocyanins from the plant material. The highest amount of total polyphenols (18.9 %), tannins (14.1 %) and flavonoids (3.4 %) was detected in the ethanolic extract of myrtle leaves. High contents of total polyphenols and tannins (17.8 % and 13.4 %) were also determined in the leaf water extract. The ethanolic extract of the berries was a rich source of anthocyanins (4.8 %) and condensed tannins (2.9 %). A qualitative and quantitative analysis of essential oils of myrtle berries and leaves isolated by hydrodistillation was carried out using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Thirty four different compounds were identified, which accounted for 97 % of the total oils. Both essential oils were characterized by a high percentage of the monoterpene fraction (80.6 % and 92.8 %). The most abundant compounds of the berries essential oil were myrtenyl acetate (27.5 %), 1,8-cineole (11.8 %) and geranyl acetate (10.1 %), while 1,8-cineole (48.6 %) and α-pinene (12.3 %) were the main constituents of the leaves essential oil.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

FITOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA PLODOVA I LISTOVA VRSTE *MYRTUS COMMUNIS* L.

Vlatka Bračić

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav etanolnih i vodenih ekstrakata te eteričnih ulja plodova i listova biljne vrste *Myrtus communis* L. Primjenom tankoslojne kromatografijom dokazana je prisutnost flavonoida i antocijana u ekstraktima te terpena u eteričnim uljima. Spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih polifenola i različitih skupina polifenolnih sastavnica u etanolnim (70 % *V*/*V*) i vodenim ekstraktima plodova i listova mirte dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom. Dobiveni rezultati su pokazali da je etanol (70 % *V*/*V*) u usporedbi s vodom bolje ekstrakcijsko otapalo za izolaciju flavonoida, trjeslovina i antocijana iz biljnog materijala. U etanolnom ekstraktu listova je određen najveći udio polifenola (18,9 %) te ukupnih trjeslovina (14,1 %) i flavonoida (3,4 %). Visoki udio ukupnih polifenola i trjeslovina (17,8 % i 13,4 %) određen je također u vodenom ekstraktu listova. Etanolni ekstrakt plodova je bio bogat izvor antocijana (4,8 %) i kondenziranih trjeslovina (2,9 %). Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja plodova i listova mirte izoliranih hidrodestilacijom provedena je u vezanom sustavu plinski kromatograf-spektrometar masa (GC-MS). Ukupno je identificirano 34 različita spoja koji su činili 97 % ulja. U oba eterična ulja dominirali su monoterpeni (80,6 % i 92,8 %). Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja plodova su bile mirtenil-acetat (27,5 %), 1,8-cineol (11,8 %) i geranil-acetat (10,1 %) dok je u eteričnom ulju listova najviše bilo 1,8-cineola (48,6 %) i α-pinena (12,3 %).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 16 grafičkih prikaza, 7 tablica i 57 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Myrtus communis,* flavonoidi, trjeslovine, antocijani, eterično ulje

Mentor: **Dr. sc. Marija Kindl**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Kindl**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Bival Štefan, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Željka Vanić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

PHYTOCHEMICAL CHARACTERISATION OF FRUITS AND LEAVES OF *MYRTUS COMMUNIS* L.

Vlatka Bračić

SUMMARY

In this diploma thesis, a study of the phytochemical composition of the ethanolic and water extracts, as well as essential oils of *Myrtus communis* L. berries and leaves was conducted. The presence of flavonoids and anthocyanins in the extracts and terpenes in the essential oils was detected by thin-layer chromatography. The contents of total polyphenols and different polyphenolic components in the ethanolic (70 % *V/V*) and water extracts of myrtle berries and leaves obtained by ultrasonic extraction was determined spectrophotometrically. The obtained results showed that ethanol (70 % *V/V*) is a better extraction solvent than water for the isolation of the flavonoids, tannins and anthocyanins from the plant material. The highest amount of total polyphenols (18.9 %), tannins (14.1 %) and flavonoids (3.4 %) was detected in the ethanolic extract of myrtle leaves. High contents of total polyphenols and tannins (17.8 % and 13.4 %) were also determined in the leaf water extract. The ethanolic extract of the berries was a rich source of anthocyanins (4.8 %) and condensed tannins (2.9 %). A qualitative and quantitative analysis of essential oils of myrtle berries and leaves isolated by hydrodistillation was carried out using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Thirty four different compounds were identified, which accounted for 97 % of the total oils. Both essential oils were characterized by a high percentage of the monoterpene fraction (80.6 % and 92.8 %). The most abundant compounds of the berries essential oil were myrtenyl acetate (27.5 %), 1,8-cineole (11.8 %) and geranyl acetate (10.1 %), while 1,8-cineole (48.6 %) and α-pinene (12.3 %) were the main constituents of the leaves essential oil.

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

Thesis includes: 50 pages, 16 figures, 7 tables and 57 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Myrtus communis,* flavonoids, tannins, anthocyanins, essential oil

Mentor: **Marija Kindl**, **Ph.D.** *Postdoctorand,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Kindl**, **Ph.D.** *Postdoctorand,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Bival Štefan, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Željka Vanić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.