

# Sastav aminokiselina u listu borovnice, korijenu vodopije i listu crnog duda (Myrtilli folium, Cichorii radix et Mori nigrae folium)

---

Petlevski, Roberta; Hadžija, Mirko; Slijepčević, Milivoj; Juretić, Dubravka

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2007, 63, 77 - 84**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:186618>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Sastav aminokiselina u listu borovnice, korijenu vodopije i listu crnog duda (Myrtilli folium, Cichorii radix et Mori nigrae folium)

ROBERTA PETLEVSKI<sup>1</sup>, MIRKO HADŽIJA<sup>2</sup>, MILIVOJ SLIJEPCJEVIĆ<sup>2</sup>, DUBRAVKA JURETIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku-biokemiju i hematologiju, 10000 Zagreb,

<sup>2</sup>Institut »Ruđer Bošković«, Zavod za molekularnu medicinu, 10000 Zagreb.

## Amino acids in Bilberry leaf, Chicory root and Black mulberry leaf (Myrtilli folium, Cichorii radix et Mori nigrae folium)

*S u m m a r y* – In the ethanol extract of the Bilberry leaf-Myrtilli folium (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) following amino acids were identified: Glutamine (Gln), Threonine (Thr), Glutamic acid (Glu), Tyrosine (Tyr) and Valine (Val). In the ethanol extract of the Chicory root-Cichorii radix (*Cichorium intybus* L., Asteraceae) following amino acids were identified: Serine (Ser), Threonine (Thr), Proline (Pro), Valine (Val) and in the ethanol extract of the Black mulberry leaf-Mori nigrae folium (*Morus nigra* L., Moraceae) following amino acids were identified: Lysine (Lys), Serine (Ser), Threonine (Thr), Glutamic acid (Glu), Proline (Pro), Valine (Val), Phenylalanine (Phe) and Leucine (Leu). Investigation of the composition amino acids was carried with thin layer chromatography method (TLC).  $R_f$  values of the identified amino acid were compared with the  $R_f$  values of amino acids in the standard solutions.

(<sup>1</sup>Department of Medical Biochemistry and Haematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia and <sup>2</sup>Department of Molecular medicine, Institute »Ruđer Bošković«, Zagreb, Croatia).

## UVOD

### Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae)

*Botanički podaci.* Listovi borovnice su oko 2,5 cm dugi, okruglasto jajoliki, sitno nazubljeni, pri vrhu zašiljeni i s kratkom peteljkom.

**Kemijski sastav.** U listovima borovnice dokazani su kateholni tanini (0.8–6.7%), leu-koantocijani, flavonoidi (glavni glikozid je kvercetin), fenol – karboksilne kiseline i irido-idi. Arbutin i hidrokinon prisutni su samo u tragovima. Glukokinin, neomirtilin, je me-toksilirani glukozid galne kiseline. Sadržaj mangana i kroma je također visok. Mala količina kinozilidinskih alkaloida: mirtina i epimirtina nađena je u listovima. (1).

**Djelovanje i primjena.** U literaturi postoje podaci koji potvrđuju da su za hipoglikemijski učinak biljne droge *Myrtilli folium* – list borovnice odgovorni antocijanozidi: mirtilin i neomirtilin te flavonol miricetin. U radu Bertuglia i sur. 1995. opisan je pozitivan učinak antocijanozida na mikrovaskularna oštećenja kroz poboljšanu kapilarnu perfuziju (2). Ong i Khoo su 1996. godine opisali inzulinomimetički učinak flavonola miricetina na li-pogenezu i transport glukoze u adipocitima štakora. Miricetin ne utječe na tirozin – kinaznu aktivnost inzulinskog receptora niti na njegovu autofosforilaciju, no stimulira ulaz glukoze u adipocite (povišena  $V_{max}$ ;  $K_m$  nije signifikantno promijenjena). Imunoblot analizom pokazalo se da u stanicama nije došlo do translokacije glukoznog transportera GLUT 4. Dakle, miricetin stimulira ulaz glukoze u adipocite bez potpune funkcije inzulinskog recep-tora te ima velik terapijski potencijal u tretmanu šećerne bolesti tipa 2 (3). Autori Cig-narella i sur. 1996. opisuju učinak ekstrakta *Myrtilli folium* na sniženje sadržaja lipida na modelu dislipidemije u štakora. Nakon tretmana sadržaj plazmatskih triglicerida pao je za 39% od početne vrijednosti (4). Učinak ekstrakata lista i ploda *Vaccinium myrtillus* također prevenira foto-induciranu oksidaciju LDL-a. Dolazi do smanjenja koncentracije oksisterola i to potvrđuje učinak ekstrakta lista i ploda na aterosklerozi (5). Martinaragon i sur. su 1998. napravili studiju antioksidativnog djelovanja ekstrakta antocijanozida iz *Vaccinium myrtillus* i utvrdili da ekstrakt antocijanozida inhibira lipidnu peroksidaciju ( $IC_{50} = 50.28 \mu\text{g/mL}$ ) i uklanja superoksid anion ( $IC_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$ ). Sposobnost uklanjanja hidroksilnih radikala opažena je kod koncentracije od  $50 \mu\text{g/mL}$  (6). U radu Valento-ve i sur. 2007. opisan je citoprotektivni učinak ekstrakta ploda *Vaccinium myrtillus* na ok-sidativni stres u hepatocitima štakora te autori zaključuju o povoljnom učinku istog kod kroničnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom kakva je npr. šećerna bolest (7).



Slika 1. List borovnice (*Myrtilli folium*)

## Vodopija (*Cichorium intybus* L., Asteraceae)

*Rasprostranjenost.* Kao autohtona vrsta samo u Europi, sjevernoj Africi i dijelu Azije. Tijekom stoljeća raširila se gotovo na sve kontinente.

*Kemijski sastav.* Korijen vodopije sadrži u jesen visoki sadržaj inulina (polifruktozan), pentozana, cikorija kiselinu, monokaveoil-vinsku kiselinu, slobodne aminokiseline, soli kalija, kalcija, mangana, fosfora, natrija, magnezija (1).

*Djelovanje i primjena.* Korijen vodopije koristi se kao koleretik, diuretik, za poboljšanje apetita. Autori Zafar i sur. su 1998. godine opisali antihepatotoksičnu aktivnost ekstrakta korijena *Cichorium intybus*. Hepatotoksičnost je inducirana ugljiktetrakloridom koji je u jetri izazvao signifikantno povišenje katalitičke koncentracije enzima: AST, ALT te bilirubina; zatim je izazvao pad koncentracije proteina (albumina). Nakon tretmana životinja s ekstraktom korijena *Cichorium intybus* došlo je do signifikantnog pada katalitičke koncentracije tih enzima u jetri te bilirubina i do povećanja koncentracije proteina (albumina) u krvi (8). O antihepatotoksičnoj aktivnosti ekstrakta korijena *Cichorium intybus* pisali su i autori Gadgoli i sur. 1997. godine (9).



Slika 2. Korijen vodopije (*Cichorii radix*)

## Crni dud (*Morus nigra* L., Moraceae)

*Botanički podaci.* Listovi su jajoliki i zašiljeni, nazubljena ruba, na naličju dlakavi, naizmjenično su smješteni, a lisna peteljka je duga i do 3 cm.

*Kemijski sastav.* List crnog duda sadrži flavonole, treslovinc, voćne kiseline, vitamin C (1).

*Djelovanje i primjena.* U literaturi su često opisane druge vrste iz roda *Morus* kao hipoglikemici. Iz korijena kore *Morus alba* L. autori Kim i sur. su 1999. godine izolirali i opisali glikoprotein molekulske mase oko 20 kDa. Taj novi glikoprotein je nazvan moran



Slika 3. List crnog duda (*Mori nigrae folium*)

20 kDa. Opisani protein snižuje razinu glukoze u streptozotocin induciranom hiperglikemijskom modelu u miševa i također povećava transport glukoze *in vitro* u masnim stanicama epididimusa. Analiziran je aminokiselinski sastav proteina i utvrđeno je da sadrži 20% serina i cisteina kao i inzulin (10).

## MATERIJALI

### A) Biljni materijal

Materijal za ispitivanje sastojao se od sasušenog i usitnjenog lista borovnice (*Myrtilli folium*), korijena vodopije (*Cichorii radix*) i lista crnog duda (*Mori nigrae folium*) sabranih u srpnju 1999. godine u okolici Zagreba, a identifikacija biljnog materijala provedena je ispitivanjem vanjske građe skupljenih uzoraka 11a,b).

### B) Etanolni ekstrakti ispitivanih droga

Za pripremu etanolnog ekstrakta navedenih droga primjenjena je metoda maceracije. Biljni materijal je osušen i usitnjen. Po 7 g svake droge potopljeno je u 100 mL 60% etanola i ostavljeno 10 dana (uz svakodnevno mućkanje) u tamnoj boci na sobnoj temperaturi i tlaku. Nakon 10 dana tako dobiveni ekstrakt je filtriran. Bistri filtrat služio je kao uzorak za kromatografsko ispitivanje.

### C) Standardi aminokiselina

Standard aminokiselina 1. sadrži aminokiseline: histidin (His), glutamin (Gln), glicin (Gly), treonin (Thr), alanin (Ala), valin (Val), leucin (Leu).



Standard aminokiselina 2. sadrži aminokiseline: lizin (Lys), serin (Ser), glutaminsku kiselinu (Glu), tirozin (Tyr) i fenilalanin (Phe).

Standard aminokiselina 3. sadrži aminokiseline: cistein (Cis), lizin (Lys), treonin (Thr), prolin (Pro), fenilalanin (Phe).

Standardi 1., 2. i 3. pripremljeni su tako da je po 10  $\mu\text{g}$  svake aminokiseline odvagano i otopljeno u 100 mL destilirane vode. Tako dobivene radne otopine su neposredno prije primjene razrijeđene u omjeru 1:2 s destiliranom vodom.

#### D) 0.5%-tna otopina ninhidrina

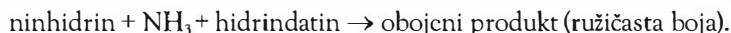
0.5 g ninhidrina p.a. je odvagano i otopljeno u smjesi jednakih dijelova acetona i propanola.

### METODE

Tankoslojnu kromatografiju (TLK) upotrijebili smo kao test za kvalitativno dokazivanje sastava aminokiselina u ispitivanim drogama.

Kao stacionarna faza rabljene su staklene ploče s tankim slojem celuloze (Merck), kao mobilna faza upotrijebljena je smjesa otapala: n-butanol : aceton : octena kiselina : voda (35 : 35 : 10 : 20 V/V/V/V). Na staklenu ploču nanoseno je po 2  $\mu\text{L}$  svake otopine radnog standarda i 10  $\mu\text{L}$  etanolnog ekstrakta svake ispitivane droge.

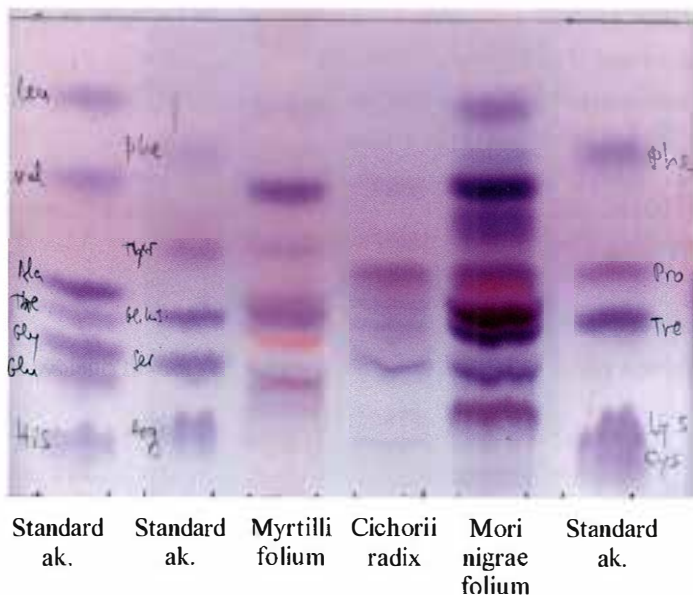
Nakon završetka separacije aminokiselina na TLK, vizualizacija razdvojenih aminokiselina provedena je otopinom ninhidrina i uspoređena sa standardima koji sadrže mješavinu aminokiselina. Nakon prskanja kromatograma otopinom ninhidrina ploča kromatograma zagrijana je na 80°C tijekom 10 minuta nakon čega se pojavljuju ružičasto obojene vrpce. U reakciji aminokiseline s ninhidrinom bitno je naglasiti da obojeni produkt sadrži samo atom  $\alpha$  dušika iz originalne molekule aminokiselina (12). Slijed reakcija je niže naveden:



### REZULTATI I RASPRAVA

Etanolni ekstrakt lista borovnice (*Myrtilli folium*), korijena vodopije (*Cichorii radix*) i lista crnog duda (*Mori nigrae folium*) ispitan je na sadržaj pojedinih aminokiselina tankoslojnom kromatografijom. Nakon vizualizacije kromatograma otopinom ninhidrina dobivene su ružičasto obojene vrpce aminokiselina.

Odjeljivanjem mobilnom fazom n-butanol:aceton:octena kiselina:voda (35:35:10:20 V/V/V/V) u etanolnom ekstraktu lista borovnice (*Myrtilli folium*) uočeno je 5 vrpce, etanolnom ekstraktu korijena vodopije (*Cichorii radix*) 4 vrpce, a u etanolnom ekstraktu lista crnog duda (*Mori nigrae folium*) 8 vrpce (Slika 4.). Pojedine  $R_f$  vrijednosti sastavnica ekstrakta i  $R_f$  vrijednosti poredbenih aminokiselina prikazane su u Tablici 1.



**Slika 4.** Kromatogram aminokiselina lista borovnice (Myrtilli folium), korijena vodopije (Cichorii radix) i lista crnog duda (Mori nigrae folium).

**Tablica 1.** R<sub>f</sub> vrijednosti poredbenih aminokiselina (standard aminokiselina) i R<sub>f</sub> vrijednosti aminokiselina u pojedinim ekstraktima droga

Aminokiselina	R <sub>f</sub> vrijednost poredbenih aminokiselina (standard aminokiselina)	R <sub>f</sub> vrijednost aminokiselina u ekstraktu lista borovnice (Myrtilli folium)	R <sub>f</sub> vrijednost aminokiselina u ekstraktu korijena vodopije (Cichorii radix)	R <sub>f</sub> vrijednost aminokiselina u ekstraktu lista crnog duda (Mori nigrae folium)
Cistein (Cis)	0.073	-	-	-
Histidin (His)	0.118	-	-	-
Lizin (Lys)	0.132	-	-	0.142
Glutamin (Gln)	0.250	0.243	-	-
Serin (Ser)	0.279	-	0.277	0.283
Glicin (Gly)	0.323	-	-	-
Treonin (Thr)	0.367	0.362	0.373	0.358
Gl.kiselina (Glu)	0.382	0.379	-	0.383
Alanin (Ala)	0.441	-	-	-
Prolin (Pro)	0.470	-	0.475	0.470
Tirozin (Tyr)	0.515	0.514	-	-
Valin (Val)	0.662	0.647	0.651	0.647
Fenilalanin (Phe)	0.720	-	-	0.720
Leucin (Leu)	0.838	-	-	0.823

Usporedbom  $R_f$  vrijednosti sastavnica ekstrakta s  $R_f$  vrijednostima poredbenih supstancija u listu borovnice (*Myrtilli folium*) vidljivo je da sadrži slijedeće aminokiseline: glutamin (Gln), treonin (Tre), glutaminsku kiselinu (Glu.), tirozin (Thy) i valin (Val). Usporedbom  $R_f$  vrijednosti sastavnica ekstrakta s  $R_f$  vrijednostima poredbenih supstancija u korijenu vodopije (*Cichorii radix*) kako se vidi iz Slike 4. i Tablice 1. prisutne su slijedom odozdo prema gore slijedeće aminokiseline: serin (Ser), treonin (Thr), prolin (Pro), valin (Val). Usporedbom  $R_f$  vrijednosti sastavnica ekstrakta s  $R_f$  vrijednostima poredbenih supstancija u listu crnog duda (*Mori nigrae folium*) vidljivo je da sadrži slijedeće aminokiseline: lizin (Lys), serin (Ser), treonin (Thr), glutaminsku kiselinu (Glu), prolin (Pro), valin (Val), fenilalanin (Phe) i leucin (Leu). Dobiveni rezultati pokazuju da se u listu i korijenu različitih biljaka nalaze različite aminokiseline.

## ZAKLJUČAK

Metodom tankoslojne kromatografije dokazano je da etanolni ekstrakt lista borovnice (*Myrtilli folium*) sadrži slijedeće aminokiseline: glutamin (Gln), treonin (Tre), glutaminsku kiselinu (Glu), tirozin (Thy) i valin (Val), u etanolnom ekstraktu korijena vodopije (*Cichorii radix*) tom je metodom dokazana prisutnost slijedećih aminokiselina: serin (Ser), treonin (Thr), prolin (Pro), valin (Val), a u etanolnom ekstraktu lista crnog duda (*Mori nigrae folium*) prisutne su aminokiseline: lizin (Lys), serin (Ser), treonin (Thr), glutaminsku kiselinu (Glu), prolin (Pro), valin (Val), fenilalanin (Phe) i leucin (Leu).  $R_f$  vrijednosti dobivenih aminokiselina u pojedinim drogama odgovaraju  $R_f$  vrijednostima poredbenih aminokiselina.

Dakle, iako je količina suhog biljnog materijala u početku pokusa bila identična za sve tri ispitivane droge (7 g/100 mL 60% EtOH), iz dobivenih se rezultata može zaključiti da glavne sastavnice tih droga imaju vrlo različite kemijske strukture.

## Literatura – References

1. M. Wichtl, *Myrtilli folium*, *Mori nigrae folium*. In: *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, Medpharm Scientific Publishers Stuttgart, 1994.
2. S. Bertuglia, S. Malandrino, A. Colantuoni, *Pharm Res.* 31 (1995) 183.
3. K. C. Ong, H. E. Khoo, *Biochem Pharm.* 1996, 423.
4. A. Cinarella, M. Nastasi, E. Cavalli, L. Puglisi, *Thromb Res.* 84 (1996) 311.
5. M. F. Rasetti, D. Caruso, G. Galli, E. Bosisio, *Phytomedicine.* 3 (4) (1997) 335.
6. S. Martinargon, B. Basabe, J. M. Benedi, A. M. Villar, *Phytother Res.* 12 (1) (1998) 104.
7. K. Valentova, J. Ulrichova, L. Cvak, V. Šimanek, *Food Chem.* 101 (2007) 912.
8. R. Zafar, S. Mujahid Ali, *J Ethnopharmacol.* 63 (3) (1998) 227.
9. C. Galdoli, S. H. Mishra, *J Ethnopharmacol.* 58 (1997) 131.
10. E. S. Kim, S. J. Park, E. J. Lee, B. K. Kim, H. Huh, B. J. Lee, *Arch Pharm Res.* 22 (1) (1999) 9.



11. a) T. G. Tutin, N. A. Burges, A. C. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb, Eds., *Flora Europea*, Volume 1, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press, Cambridge (1993) 73.
- b) T. G. Tutin, N. A. Burges, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb Eds., *Flora Europea*, Volume 4 Cambridge University Press, Cambridge (1976) 52.
12. E. Vivian, M. D. Shih, Thin-layer chromatography. In: *Laboratory Techniques for the Detection of Hereditary Metabolic Disorders*, CRC Press, 1979, 25.

Primljeno: 15. rujna 2006.