

# Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije berberina iz korijena žutike (*Berberis vulgaris* L.)

---

Dulić, Marina

Professional thesis / Završni specijalistički

2019

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:163:606744>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marina Dulić

OPTIMIZACIJA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE BERBERINA IZ KORIJENA ŽUTIKE  
(*Berberis vulgaris* L.)

Specijalistički rad

Zagreb, 2019

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marina Dulić

OPTIMIZACIJA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE BERBERINA IZ KORIJENA ŽUTIKE  
(*Berberis vulgaris* L.)

Specijalistički rad

Zagreb, 2019

Poslijediplomski specijalistički studij: Fitofarmacija s dijetoterapijom

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić

Specijalistički rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Farmaceutsko - biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

5. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ listova.

Istraživanje je provedeno na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić, na nesebično uloženom vremenu i brojnim stručnim savjetima.

Mojim roditeljima, bratu s obitelji i prijateljima za podršku tijekom specijalističkog studija.

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
<b>1.1. Žutika</b>	1
<b>1.2. Berberin</b>	3
<b>1.3. Oksidativni stres</b>	4
<b>1.4. Dizajn eksperimenata</b>	6
<b>1.5. Ekstrakcija bioaktivnih biljnih sastavnica</b>	7
1.6.1. Maceracija	7
1.6.2. Ultrazvučna ekstrakcija	8
<b>2. Cilj istraživanja</b>	10
<b>3. Materijali i metode</b>	11
3. 1. Biljni materijal i kemikalije	11
3.2. Ultrazvučna ekstrakcija	11
3.3. Određivanje berberina	12
3.4. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala	12
3.5. Eksperimentalni dizajn	13
3.6. Maceracija	14
3.7. Statistička analiza	14
<b>4. Rezultati i rasprava</b>	15
<b>4.1. Ultrazvučna ekstrakcija</b>	15
4.1.1. Procesni parametri	15
4.1.2. Koncentracija berberina	20
4.1.3. Antiradikalna aktivnost ekstrakta	22
4.1.4. Optimizacija ekstrakcije	23
<b>4.2. Koncentracija berberina u maceratima</b>	24
4.2.1. Ekstrakcija etanolom	24
4.2.2. Ekstrakcija vodom	25
4.2.3. Ekstrakcija glicerolom	26
4.2.4. Međusobna usporedba ekstrakcijskih otapala	26
<b>4.3. Antiradikalna aktivnost macerata</b>	28
4.3.1. Ekstrakcija etanolom	29
4.3.2. Ekstrakcija vodom	29
4.3.3. Ekstrakcija glicerolom	29
4.3.4. Međusobna usporedba ekstrakcijskih otapala	30
<b>5. Zaključak</b>	32
<b>6. Literatura</b>	33
<b>7. Životopis</b>	37
<b>Prilog 1: Popis publikacija</b>	

## Sažetak

### Uvod:

Žutika (*Berberis vulgaris* L., Berberidaceae) je biljna vrsta s dugom povijesti, koja se koristi u prehrambene i ljekovite potrebe u Europi, Aziji i Americi. Ima raznovrsne terapijske učinke, koji uglavnom potječu od izokinolinskih alkaloida, osobito berberina.

### Ciljevi:

Cilj ovog istraživanja bio je razviti metodu za ultrazvučnu ekstrakciju berberina iz kore korijena žutike. Za ekstrakciju je korišten glicerol, netoksično i biorazgradivo otapalo dostupno iz obnovljivih izvora.

### Materijali i metode:

Pokusi su planirani pomoću Box-Behnkenovog dizajna. Raspon projektnih parametara (nezavisne varijable) bio je: temperatura ( $X_1$ ) 20-80 °C, maseni udio glicerola ( $X_2$ ), 10-90 % i snaga ultrazvuka ( $X_3$ ), 144-720 W. Sadržaj berberina u ekstraktima određen je pomoću RP-HPLC-DAD metode, a sposobnost hvatanja slobodnih radikala (RSA) određena je spektrofotometrijski pomoću DPPH radikala (zavisne varijable). Za pronalaženje odnosa između zavisnih i nezavisnih varijabli korištena je metodologija površine odgovora.

### Rezultati i rasprava:

Odnosi između zavisnih i nezavisnih varijabli najbolje su odgovarali kvadratnom modelu. Odabrani kvadratni modeli su bili statistički visoko značajni ( $P > 0,01$ ), a njihova vrijednost  $r^2$  bila je iznad 0,93. Najznačajnije varijable za ekstrakciju su bile temperatura i koncentracija glicerola. One su značajno ( $P > 0,05$ ) utjecale na RSA u vidu linearnih i kvadratnih faktora. Osim toga, jačina ultrazvuka imala je statistički značajan ( $P < 0,05$ ) utjecaj na koncentraciju berberina kao kvadratni faktor, kao i u interakciji s temperaturom ekstrakcije. Rješenja kvadratnih jednadžbi pokazala su da su najbolji uvjeti za ekstrakciju berberina ( $X_1$ ,

X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>) temperatura ekstrakcije 80 °C, koncentracija glicerola 50 % i snaga ultrazvuka 144 W.

Najbolji RSA pokazali su ekstrakti priređeni pri 80 °C, koncentracija glicerola 40 % i snazi ultrazvuka od 720 W. Eksperimentalni podaci su potvrdili predviđanja s odstupanjem < 5%.

### **Zaključak:**

Rezultati pokazuju da je ultrazvučna ekstrakcija pomoću glicerola bila učinkovita i brza metoda za dobivanje ekstrakata sa značajnom koncentracijom berberina i antiradikalnom aktivnošću.

Ključne riječi: *Berberis vulgaris*, berberin, antiradikalna aktivnost, metodologija odgovora površina.



## *Abstract*

### **Introduction:**

Barberry (*Berberis vulgaris* L., Berberidaceae) is a well known medicinal plant with a long history of medicinal and nutritional use in Europe, Asia and America. It has various therapeutic effects, mostly related to its isoquinoline alkaloids, particularly berberine.

### **Objectives:**

The aim of this study was to examine the efficiency of ultrasound-assisted extraction of berberine from root bark of *Berberis vulgaris* using glycerol a non-toxic, biodegradable solvent available from renewable sources.

### **Materials and methods:**

Experiment was planned using Box-Behnken design. The range of design parameters (independent variables) was: temperature ( $X_1$ , 20-80°C), glycerol concentration (m/m) ( $X_2$ , 10-90%) and ultrasonication power ( $X_3$ , 144-720 W). Berberine content of the extracts was determined using RP-HPLC-DAD, while radical scavenging activity of the extracts (RSA) was determined spectrophotometrically, using DPPH free radical (dependent variables). Response-surface methodology was used to find the relationship between dependent and independent variables.

### **Results and discussion:**

The relationship between variables was best described by quadratic models. The selected quadratic models were highly significant ( $P > 0.01$ ) with  $r^2$  values over 0.93. The most important extraction variables were temperature and glycerol content. They significantly ( $P > 0.05$ ) influenced berberine concentration and RSA both as linear and quadratic terms. Furthermore, ultrasonication power had a significant ( $P < 0.05$ ) effect on berberine concentration as a quadratic term, as well as in interaction with the extraction temperature. The solutions to the quadratic equations have shown that the best conditions for berberine

extractions are (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>) are 80 °C, 50 % glycerol and 144 W, while the extracts showing best RSA were obtained using 80 °C, 40 % glycerol and 720 W. The experimental data has confirmed these findings with deviation <5%.

### **Conclusions:**

The results demonstrate that ultrasonication-assisted extraction using glycerol is a fast and efficient method for preparation of extracts with notable berberine concentration and radical scavenging activity.

Keywords:*Berberis vulgaris*, berberine, radical scavenging activity, response surface methodology.

## 1. Uvod

### 1.1. Žutika

Rod *Berberis* iz porodice Berberidaceae sastoji se od 450–500 vrsta koje su najvećim dijelom rasprostranjene u zemljama izvan Europe (napose u Aziji, objema Amerikama i u sjevernoj Africi). U flori Hrvatske su zabilježene samo dvije vrste: *Berberis vulgaris* L. (obična žutika) i, znatno manje rasprostranjena, *B. croatica* Horvat (sin. *B. aetnensis* (C. Presl.) Rouy et Fouc.). *B. vulgaris* L. (obična žutika) biljna je vrsta iz porodice Berberidaceae, široko korištena u narodnoj medicini. To je visoki listopadni grm koji je široko raspostranjen u svijetlim šumama, po rubovima šuma i šikarama. U Europi je pretežno vezana na razne oblike termofilne i heliofilne vegetacije nizinskih i brdskih predjela, najčešće u području naselja i poljoprivrednih kultura (1). Mlado drvo ima crvene grane koje kasnije odrvene i postanu sivkaste boje. Listovi su jajolikog oblika, naizmjenični i trepavičasto dlakavi smješteni u snopiće. Cvat čine viseći grozdovi dvospolnih cvjetova. Plodovi žutike su duguljaste crvene bobice koje dozrijevaju u kasno ljeto ili na jesen. Plodovi su bogati vitaminom C i jestivi, ali su izrazito kiseli (2).



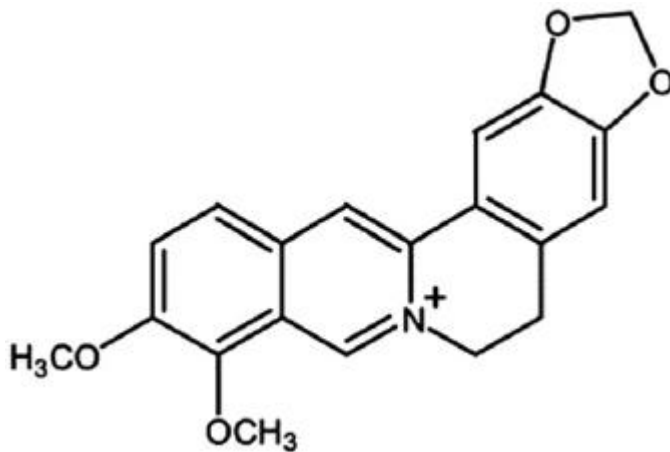
Slika 1. Obična žutika. (hr.wikipedia.org)

Biljne vrste roda *Berberis* su oduvijek zauzimale značajno mjesto u tradicionalnoj medicini brojnih naroda. *B. vulgaris* i druge vrste žutike su poznate u ajurvedskoj, iranskoj i kineskoj tradicionalnoj medicini, a još u starom Egiptu su plod žutike i sjemenke komorača koristili protiv zaraznih bolesti. Koriste se i protiv upala, zaraznih bolesti, dijabetesa, opstipacije i drugih bolesti. Najstariji dokazi o korištenju ploda žutike kao sredstva za pročišćavanje krvi zabilježeni su na glinenim pločicama u biblioteci asirskog cara Asurbanipala tijekom 650. godine prije Krista. U Aziji, široka upotreba stabljike, kore stabljike, korijena i kore korijena biljaka bogatih berberinom, ima više od 3000 godina povijesti. Štoviše, korišteni su kao sirovina ili kao važan sastojak u ayurvedskoj i tradicionalnoj kineskoj medicini. U Ayurvedi, vrste roda *Berberis* tradicionalno se koriste za liječenje širokog spektra infekcija uha, oka i usta, za zacjeljivanje rana, zaliječenje hemoroida, probavnih smetnji i dizenterija, ili za liječenje poremećaja maternice i vagine. Također se koriste kod pretilosti, te kao protuotrov za liječenje uboda škorpiona ili zmija. Ekstrakti i dekoti vrsta ovog roda tradicionalno se koriste kao antibakterijska, antivirusna i antifungalna sredstva te kao antiparazitski lijekovi (3). Koristili su se kod brojnih bolesti kao što su: dizenterija, kod jetrenih i žučnih oboljenja, malarije, reumatizma i kao opći eliksir (4,5).

Ljekovite droge koje se dobivaju od biljne vrste *B. vulgaris* su kora (*Berberidis cortex*), kora korijena (*Berberidis radice cortex*), korijen (*Berberidis radix*) kao i plodovi (*Berberidis fructus*). Plodovi se koriste za bolesti bubrega i urinarnog trakta, gastrointestinalnog trakta, jetrene bolesti, bronhitisa, bolesti slezene, grčeva i kao stimulans krvožilnog sustava. Korijen i stabljike biljke se uglavnom koriste protiv bolova u probavnom traktu, jetri, žučnoj vrećici, bubrezima i mokraćnom sustavu, kao i kod bolesti dišnih putova, srca i cirkulacijskog sustava (4). Osim toga, biljka se koristila i kao antiaritmik, sedativ, za zacjeljivanje unutarnjih ozljeda, kod upala grla i groznice (3). Smatra se da su za djelovanje *Berberis* vrsta odgovorni protoberberini i benzil-izokinolinski alkaloidi među kojima je najvažniji berberin.

## 1.2. Berberin

Berberin (Slika 2) po kemijskoj strukturi pripada skupini izokinolinskih alkaloida. Znanstvene studije, pokazale su da berberin i biljne droge koje ga sadržavaju imaju veliki fitoterapijski potencijal. Primjerice, berberin utječe na metabolizam glukoze i lipida. U *in vitro* uvjetima berberin pojačava inhibitorno djelovanje inzulina na glukoneogenezu u stanjima stresa (6,7). U kliničkoj studiji na osobama koje boluju od metaboličkog sindroma dokazano je da berberin snižava indeks tjelesne mase i smanjuje opseg struka. Također, kod osoba oboljelih od hiperkolesterolemije uočen je pad vrijednosti LDL-a (8).



Slika 2. Kemijska struktura berberina. ([www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))

Berberin ima izraženi učinak na kardiovaskularni sustav. Ejekcijska frakcija lijeve klijetke se nakon uzimanja 1,2 g berberina nakon 2 tjedna povećala kod svih pacijenata kojima je prethodno bila smanjena. Osim toga smanjena je učestalost i složenost preuranjenih ventrikularnih kontrakcija (9). Berberin je pokazao i kardioprotektivni učinak kod ishemije

utjecajem na aktivnost AMP-om aktivirane kinaze koja modulira metabolizam ugljikohidrata i lipida, funkciju staničnih organela (mitohondrije, endoplazmatski retikulum) i apoptozu. Berberin inducira i relaksaciju endotela povećavajući proizvodnju NO iz arginina djelovanjem na aktivnost eNOS (endotelna sintaza dušičnog oksida) koja se smatra ključnim elementom u procesu vazodilatacije. Učinak berberina na aterosklerozu može se objasniti njegovim utjecajem na metabolizam lipida (10) i glukoze (11). Imunomodulatorni učinak berberina dokazan je brojnim *in vivo* i kliničkim studijama. Berberin povećava razinu kortikosteroida u štakora s eksperimentalno izazvanim kolitisom. Stoga se smatra da se učinak berberina može pripisati i povećanju razine endogenih glukokortikoida (12). Brojna su istraživanja pokazala su hepatoprotektivni učinak berberina, a smatra se da je za taj učinak odgovoran njegov antioksidativni potencijal (13). Osim toga, smatra se i da su protuupalne i antioksidative značajke berberina od velike važnosti za njegov nefroprotektivni učinak (14).

### **1.3. Oksidativni stres**

Oksidacija je bitna mnogim živim organizmima za proizvodnju energije, kao gorivo za biološke procese. Međutim, ROS koji nastaju tijekom metabolizma, mogu doprinijeti patogenezi mnogih bolesti kao što su dijabetes (15), rak (16) i kardiovaskularne bolesti (17). Oksidativni stres se javlja zbog poremećaja ravnoteže između djelovanja endogenog antioksidativnog sustava i produkcije reaktivnih kisikovih vrsta (reactive oxygen species, ROS). Najznačajniji ROS su superoksid anion ( $O_2^-$ ), hidroksil radikal ( $\bullet OH$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). To su endogeni radikali ili reaktivne molekule koji prirodno nastaju u metaboličkim

procesima. Osim njih postoje i egzogeni izvori slobodnih radikala kao što su dim cigarete, ioni teških metala ili izloženost ozonu (15).

Ciljna mjesta djelovanja ROS su lipidi, proteini i DNA. ROS induciraju lipidnu peroksidaciju što dovodi do oštećenja lipidnih barijera i povećane permeabilnosti tkiva. Mogu uzrokovati degradaciju proteina oksidacijom aminokiselina zbog čega su podložnije djelovanju proteaza. Tome su najpodložnije aminokiseline metionin i cistein. DNA mogu oštetiti na nekoliko načina, od pucanja uzvojnice DNA, promjene kemijske strukture šećerne komponente ili baza do mutacija, delecija, translokacija. Takva oštećenja imaju značajnu ulogu u karcinogenezi, starenju, autoimunim bolestima te kardiovaskularnim oboljenjima (15).

Neki prirodni spojevi, mogu djelovati kao antioksidansi koji su učinkoviti u zaštiti ljudskog tijela od oštećenja uzrokovanih ROS (16,17). Važnost prirodnih antioksidansa u hrani i ljekovitom bilju danas je prepoznata, što se osobito odnosi na njihovu ulogu u prevenciji degenerativnih bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti (18). Berberis vrste su aktivne u mnogim testovima koji se koriste za evaluaciju antioksidativnog djelovanja. Plodovi žutike pokazali su antioksidativno i antitumorsko djelovanje na stanicama ljudskog karcinoma jetre (HepG2) (19). Osim toga, ekstrakt lišća iz *B. vulgaris* subsp. *seroi* bio je učinkovit raznim testovima koji se koriste za vrjednovanje antioksidativne aktivnosti: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) testa sprječavanju izbjeljivanja oksihemoglobina, sprječavanje lipidne peroksidacije i zaštitu od oštećenja DNA. Znanstvenici su dokazali da je ekstrakt ploda manje aktivan (20). *B. aristata* DC. se u Ayurvedskoj medicini koristi kao emenagog i sredstvo u liječenju žutice i proširenja slezene, te je u jednom istraživanju pokazao dobar učinak na DPPH slobodne radikale, a djelovao je i kao učinkovit inhibitor polifenol oksidaze (21).

#### ***1.4. Dizajn eksperimenata***

Ekperimentalni dizajn se koristi s ciljem dobivanja produkta ili uvjeta provedbe procesa željenih karakteristika. U tom procesu teži se razumjeti utjecaj faktora i/ili modelirati vezu između njih po mogućnosti uz što manji broj eksperimenata. Ovo zahtjeva pravilno i učinkovito mapiranje eksperimentalnog prostora. U mnogim slučajevima ovi ciljevi su kombinirani (22). U slučaju ekstrakcije, učinkovitim postupkom smatra se onaj u kojem se dobije ekstrakt s visokom koncentracijom ciljnih spojeva uz minimalnu razgradnju što osigurava visoku biološku aktivnost. U idealnom slučaju, to bi trebalo biti ostvareno korištenjem ekološki prihvatljive tehnologije i niske cijene sirovina i otapala (23). To se može postići finim podešavanjem eksperimentalnih uvjeta, što zahtijeva veliki broj eksperimenata koje treba napraviti.

Metodologija površine odgovora (RSM) je skup matematičkih i statističkih tehnika za modeliranje i optimizaciju složenih procesa. To omogućuje stvaranje empirijskog modela razvojem odgovarajućeg funkcionalnog odnosa između odgovora, interesa i niza povezanih ulaznih varijabli. Korištenjem RSM učinkovito se smanjuje broj eksperimentalnih ispitivanja potrebnih za procjenu više parametara i njihove interakcije. RSM se široko koristi za optimizaciju ekstrakcije polifenola (24,25), alkaloida (26) i drugih bioloških aktivnih tvari iz biljnog materijala. Primjeri uključuju i korištenje RSM za optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije fenolnih antioksidansa, kao što su antocijani (27), fenolne kiseline i flavonoidi (25).



### ***1.5. Metode ekstrakcije bioaktivnih biljnih sastavnica***

Svaki postupak ekstrakcije ima za cilj osigurati najveće količine ciljane bioaktivne sastavnice u ekstraktu i uz minimalnu kontaminaciju drugim, neželjenim, spojevima. U tu svrhu se koriste brojni ekstrakcijski postupci. Najčešće su to ekstrakcije u sustavu kruto/tekuće. Pri tom postoje brojne varijable o kojima treba voditi računa poput vrste ekstrakcije, značajki biljni materijal (npr. veličina čestica), otapala, pH, temperature, vremena ekstrakcije i u određenim slučajevima dodatak enzima (28).

#### ***1.5.1. Maceracija***

Maceracija je metoda iscrpljivanja aktivnih tvari iz biljnih droga. To je jednokratna ekstrakcija gdje se propisano usitnjena droga prelije ekstrakcijskim sredstvom te čuva u dobro zatvorenoj posudi, zaštićenoj od sunčeve svjetlosti onoliko dana koliko je propisano. Nakon toga se filtrira i dobiveni filtrat čini macerat. Maceracija je prikladna metoda ekstrakcije za slabo topljive, termolabilne tvari te tvari sklone bubrenju (29). Odabir otapala je ključan za učinkovitost ovog tipa ekstrakcije. Na brzinu i učinkovitost maceracije značajno utječe i stupanj usitjenosti čestica. Komadi droge ne bi trebali biti preveliki, jer u protivnom otapalo neće moći prodrijeti u najdublje stanice. Isto tako droga se ne smije reducirati na prah jer bi to dovelo do gubitka hlapivih aktivnih sastavnica (primjerice eteričnih ulja) koji se nalaze u biljci, a otežala bi se i filtracija biljnog materijala nakon završetka maceracije. Sama maceracija je relativno dugotrajan postupak, ali se može ubrzati zagrijavanjem. Taj postupak se naziva digestija. Njezin nedostatak je u tome što je dio bioaktivnih biljnih tvari toplinski nestabilan te se tijekom proizvodnje ekstrakata može razgraditi ili potpuno izgubiti. Prinos maceracije može se povećati uporabom nove količine otapala na jednom iscrpljenom biljnom materijalu kako bi se isti što bolje iskoristio (30–32).

Iako je maceracija ekonomična metoda, to je još uvijek dugotrajan proces s malom selektivnošću i velikom potrošnjom otapala. U novije vrijeme znanstvenici koriste različite suvremene metode ekstrakcije koje se odlikuju većom brzinom i učinkovitošću ekstrakcije poput ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakcije mikrovalovime, ekstrakcije visokotlačnim reaktorima ili ekstrakcije superkritičnim ugljičnim dioksidom. Ipak, zbog svoje jednostavnosti, ekonomičnosti te činjenice da za nju nije potrebna sofisticirana oprema, maceracija i dalje zauzima važno mjesto u suvremenoj proizvodnji pripravaka od ljekovitog bilja (30–32).

### *1.5.2. Ultrazvučna ekstrakcija*

Ultrazvučna ekstrakcija je povoljan, brz, jednostavan i učinkovit način ekstrakcije, koji se najčešće koristi za sustave kruto/tekuće. U toj metodi ultrazvuk izaziva mehaničke vibracije u biljnom materijalu. Prijenos mehaničkih valova kroz tekućinu uzrokuje titranje molekula oko njihovog ravnotežnog položaja. U biljnom materijalu to može dovesti do poremećaja u staničnim stijenkama, smanjenja veličine čestica i bolje propusnosti stanične membrane. Sve to povećava pristup otapala ciljnim spojevima što rezultira poboljšanom učinkovitošću ekstrakcije (33). Ultrazvučnu ekstrakciju karakterizira relativno visoka ponovljivost, kratko vrijeme ekstrakcije, niska potrošnja otapala, kao i niske temperature ekstrakcije i mala potrošnja energije. Navedene karakteristike čine ju prikladnom za izoliranje široke lepeze bioaktivnih prirodnih spojeva, uključujući osjetljive kemijske spojeve, kao što su alkaloidi (27). Na taj način se u vrlo kratkom vremenu mogu dobiti visokovrijedni ekstrakti djelatnih tvari. Način izvedbe je, slično kao kod maceracije, da se usitnjena biljna droga prelije ekstrakcijskim sredstvom. Zatim se stavi u ultrazvučnu kupelj, ili kupelj s ultrazvučnom sondom tijekom propisanog vremena i pri propisanoj temperaturi, te na kraju profiltrira (29).

Uvjeti ultrazvučne ekstrakcije mogu znatno utjecati na prinos i sastav pripremljenog ekstrakta, pogotovo ako su ciljni spojevi osjetljivi na oksidaciju i druge vrste degradacije. Među

brojnim faktorima koji mogu utjecati na učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije, izbor otapala je vjerojatno najvažniji. Polarnost otapala, njegova viskoznost, tlak para i napetost površine su ključni faktori koji utječu na učinkovitost kavitacije. Zbog svoje široke dostupnosti i netoksičnosti, voda je daleko najprikkladnije otapalo za ekstrakciju bioaktivnih molekula ljekovitog bilja. Vodu slijedi glicerol, koji je pristupačno i prirodno otapalo koje se može dobiti iz obnovljivih izvora (34). Druga važna ekstrakcijska varijabla je temperatura. Visoka temperatura može poboljšati proces ekstrakcije smanjivanjem viskoziteta otapala i povećanjem kinetičke energije molekula u otopini. Ipak, visoke temperature mogu uzrokovati degradaciju izdvojenih fenola i drugih osjetljivih spojeva. Varijacije spomenutih parametara neizbježno se odražavaju ne samo na sastav, već i na biološku aktivnost biljnog ekstrakta. Stoga uvjeti ekstrakcije moraju biti pažljivo odabrani kako bi se osigurao ekstrakt s željenim značajkama (23).

## 2. Cilj istraživanja

Kora korijena žutike sadrži bioaktivni alkaloid berberin. Etanol je jedno od najčešće korištenih otapala za ekstrakciju ljekovitog bilja. Iako učinkovito otapa veliki broj aktivnih biljnih sastavnica, problem pri upotrebi etanola je u njegovoj relativnoj toksičnosti te neprikladnosti za primjenu kod djece ili kod određenih religijskih skupina. Za razliku od toga, glicerol je netoksično i biorazgradivo otapalo, koje se može dobiti iz obnovljivih izvora i sve se više koristi u industriji dodataka prehrani. Ekstrakcija glicerolom omogućila bi razvoj ljekovitih pripravaka od kore žutike koja ne sadržavaju etanol. Stoga je cilj ovog rada istražiti utjecaj ekstrakcijskih uvjeta: temperature, koncentracije glicerola i snage ultrazvuka, na sadržaj berberina, kao i antiradikalnu aktivnost ekstrakta *B. vulgaris* korištenjem RSM.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Biljni materijal i kemikalije

Kora korijena žutike bila je donacija tvrtke Suban (Hrvatska). Prije ekstrakcije, biljni materijal je usitnjen i prosijan kroz sito veličine 850  $\mu\text{m}$ . Za ispitivanje korištene su sljedeće kemikalije: 96% etanol, glicerol (Kemig, Hrvatska), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), berberin klorid ( $\geq 98\%$ ), trietilamin te butilhidroksianisol (BHA,  $\geq 98,5\%$ ) (Sigma-Aldrich, US). Acetonitril je bio stupnja čistoće za HPLC. Sve ostale kemikalije i otapala bile su *p a.* stupnja čistoće.

#### 3.2. Ultrazvučna ekstrakcija

U Erlenmeyerovoj tikvici od 50 mL, suspendiran je praškasti biljni materijal (0,2 g) u 10 mL odgovarajućeg otapala. Ekstrakcije su bile provedene u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin SONOREX® Digital 10 P NZ 156 BP, Njemačka) pri prikladnoj snazi ultrazvuka. Ekstrakcijski uvjeti bili su odabrani u skladu s Box-Behnken dizajnom (Tablica 1 i 2). Nakon ekstrakcije, smjesa je profiltrirana. Svi ekstrakti, do korištenja bili su pohranjeni tamnom mjestu na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tablica 1. Neovisne varijable i njihove vrijednosti u Box-Behnken-ovom dizajnu.

Neovisne varijable	Kod	Razine		
		-1	0	1
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	X <sub>1</sub>	20	50	80
Udio glicerola (% , m/m)	X <sub>2</sub>	10	50	90
Snaga ultrazvuka (%)*	X <sub>3</sub>	20	60	100

\* - u odnosu na maksimalnu snagu od 720 W

### 3.3. Određivanje berberina

Berberin je kvantificiran korištenjem HPLC uređaja (Agilent 1200 serija, Agilent Technologies, USA), koji je bio opremljen s diode array detektorom (DAD) i Zorbax Eclipse XDB C18 kolonom (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4,6 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Volumen injiciranja bio je 20  $\mu\text{L}$ . Prije injektiranja otopine standarda (otopina berberina koncentracije 0,2 mg/mL) i ekstrakti su bili profiltrirani kroz filter 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE. Mobilna faza bila je otopina 0,02 mol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4$  s 25% acetonitrila kojoj je dodan trietilamin (TEA) do pH 4,82. Protok je bio 1,0 mL/min. Pikovi su bili promatrani i kvantificirani na 254 nm. Identifikacija se temeljila na usporedbi vremena zadržavanja i spektra pika u kromatogramu uzorka i kromatogramu standarda. Berberin je određen pomoću odgovarajuće kalibracijske krivulje koja se sastojala od površine ispod krivulje (AUC) pika berberina (y, arbitrarne jedinice) u odnosu na težinu berberina u uzorku (x,  $\mu\text{g}$ ). Granica detekcije (LOD), granica kvantifikacije (LOQ) te kalibracijska krivulja su bile 0,0186  $\mu\text{g}$ , 0,0564  $\mu\text{g}$  odnosno

$$y = 2834,4x + 22,08 \quad (r^2 = 0,9999) \quad (1)$$

### 3.4. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala (RSA) određena je korištenjem DPPH slobodnog radikala (35). Metanolna otopina DPPH (70  $\mu\text{L}$ , 0,2 mg/mL) dodana je u 130  $\mu\text{L}$  metanolne otopine ekstrakta (uzorka) ili metanola (negativna kontrola). Smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Nakon 30 minuta, očitana je absorbancija na 545 nm na Stat Fax 3200 (Awareness Technologies, SAD) čitaču mikrotitarskih pločica. BHA je korištena kao pozitivna kontrola. RSA za DPPH slobodni radikal je izračunata prema jednadžbi 2.

$$RSA = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100 \quad (2)$$

gdje je  $A_{\text{control}}$  absorbancija negativne kontrole (npr., čista otopina DPPH bez ispitivanog spoja), a  $A_{\text{sample}}$  je absorbancija DPPH otopine sa ekstraktom. RSA je izračunata kao koncentracija ekstrakta koji uklanja 50 % slobodnih radikala DPPH prisutnih u otopini (RSA IC<sub>50</sub>) i izražena je kao mg ekvivalenta biljne tvari u mL ekstrakta (mg HME/mL) (Tablica 2).

### 3.5. Eksperimentalni dizajn

Za regresijsku analizu i optimizaciju korišten je program Design Expert 8.0.6 (Stat-Ease, Minneapolis USA). Za određivanje najbolje kombinacije nezavisnih ekstrakcijskih varijabli za odabrane ovisne varijable (responses), upotrijebljen je Box-Behnken dizajn (BBD). Kodirane su vrijednosti za parametre dizajna (zavisne varijable): temperatura ( $X_1$ ), koncentracija glicerola (m/m) ( $X_2$ ) i snaga ultrazvuka ( $X_3$ ) prikazane su u Tablici 1. Koncentracija Berberina ( $Y_1$ ) i RSA IC<sub>50</sub> ( $Y_2$ ) odabrane su kao odgovori (Tablica 2). Eksperimentalni podaci su ukopljani u kvadratni polinomni model prema kvadratnoj jednadžbi 3:

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^k A_i X_i + \sum_{i=1}^k A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k A_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

gdje je  $Y$  zavisna varijabla;  $A_0$ ,  $A_i$ ,  $A_{ii}$  i  $A_{ij}$  su regresijski koeficijenti za odsječak, linearni i kvadratni factor te interakciju;  $X_i$  i  $X_j$  su nezavisne varijable.

### *3.6. Maceracija*

Za maceraciju je odvojeno po 0,2 g kore korijena žutike i preneseno u Erlenmayerove tikvice sa ubrušenim grlom. U svakoj tikvici droga je prelivena sa 10 mL različitog otapala: voda (W), 96 % etanol (96E) ili 50 % glicerol (50G). Tikvice su nakon toga zatvorene čepom i parafinom te stavljene na tamno mjesto. Maceracija se provodila 24 h (1D) odnosno 72 h (3D). Osim toga, kako bi se usporedila učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije i maceracije napravljen je i ekstrakt pri uvjetima optimizirane ultrazvučne ekstrakcije (-opt). Nakon ekstrakcije je sadržaj tikvica filtriran kroz filter papir. Uzorci su pohranjeni na 4 °C. Tekst u zagradama označava sufikse i prefikse korištene dalje u radu.

### *3.7. Statistička analiza*

Svaki uzorak je rađen u triplikatu. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Za usporedbu je korištena ANOVA s post-hoc Tukey testom. Vrijednosti  $P < 0,05$  smatrane su statistički značajnima.



## **4. Rezultati i rasprava**

### **4.1. Ultrazvučna ekstrakcija**

#### *4.1.1. Procesni parametri*

Za učinkovitu ekstrakciju berberina iz kore korijena žutike u ovom radu je korištena ultrazvučna ekstrakcija. Eksperiment je izveden prema Box-Behnkenovom dizajnu koji se temelji na RSM-u. To je trodimenzionalni sferni i rotirajući dizajn, pogodan za opisivanje površine odgovora kvadratnih jednadžbi. Njegova racionalnost i izvrsni rezultati omogućuju jednostavnu optimizaciju kemijskih i fizikalnih procesa (36). Tri nezavisne varijable odabrane za optimizaciju su bile temperatura ekstrakcije ( $X_1$ ), koncentracija glicerola u vodi ( $X_2$ , % m/m) i snaga ultrazvuka ( $X_3$ ).

Budući je ovaj rad bio usmjeren na pripremu ekstrakata pogodnih za izradu kozmetike i dodataka prehrani, glicerol je odabran kao biokompatibilno i široko dostupano otapalo. Štoviše, glicerol se može smatrati "zelenim" otapalom zbog svoje biorazgradivosti i dostupnosti iz obnovljivih izvora (37). Da bi se dobio bolji pregled topljivosti berberina u postupku ekstrakcije, zavisne varijable ispitivane su u relativno širokom rasponu uvjeta. Ultrazvuk i temperatura mogu doprinijeti topljivosti organskih molekula uzrokujući bržu oscilaciju molekula otapala i time bržu interakciju s otopljenim tvarima. Međutim previsoka temperatura ili snaga ultrazvuka mogu povećati brzinu kemijske reakcije otapala s drugim otopljenim tvarima što može dovesti do njihove degradacije (38). Stoga je cilj ovog rada bio odrediti optimalnu kombinaciju ekstrakcijskih uvjeta kako bi se dobila maksimalna koncentracija berberina i maksimalna antiradikalna aktivnost kao odabrani odgovori. Tablica 2 prikazuje zavisne i nezavisne eksperimentalne varijable 17 ekstrakata priređenih prema Box-Behnken modelu.

Tablica 2. Box-Behnken dizajn i rezultati pokusa.

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Berberin (µg/mL)	RSA IC <sub>50</sub> (HME mg/mL)
1	20	10	60	57,11	2,204
2	50	50	60	75,06	2,069
3	50	10	20	84,58	2,667
4	50	50	60	69,00	1,914
5	50	50	60	83,33	1,799
6	80	90	60	89,79	1,564
7	50	90	20	68,53	2,498
8	50	90	100	59,98	2,254
9	20	50	20	69,27	1,979
10	50	50	60	84,28	1,6950
11	80	10	60	111,03	1,488
12	50	50	60	72,56	1,774
13	20	90	60	32,46	5,154
14	80	50	100	120,8	1,331
15	20	50	100	95,58	1,793
16	50	10	100	69,62	1,534
17	80	50	20	146,65	1,246

X<sub>1</sub> = temperatura (°C), X<sub>2</sub>= koncentracija glicerola (% m/m) i X<sub>3</sub>= snaga ultrazvuka (% od maksimalne snage od 720 W); RSA –antiradikalna aktivnost; HME –ekvivalenti biljnog materijala.

Primjenom višestruke regresijske analize i analizom varijance (ANOVA) za odabrane modele (Tablica 3) utvrđeno je da se odnos između varijabli odgovora i nezavisnih varijabli najbolje može izraziti kvadratnim polinomnim jednadžbama. *F*-vrijednost svih modela bila je veća od 12, dok su vrijednosti *P* bile niže od 0,0017. To znači da su oba modela bila značajna

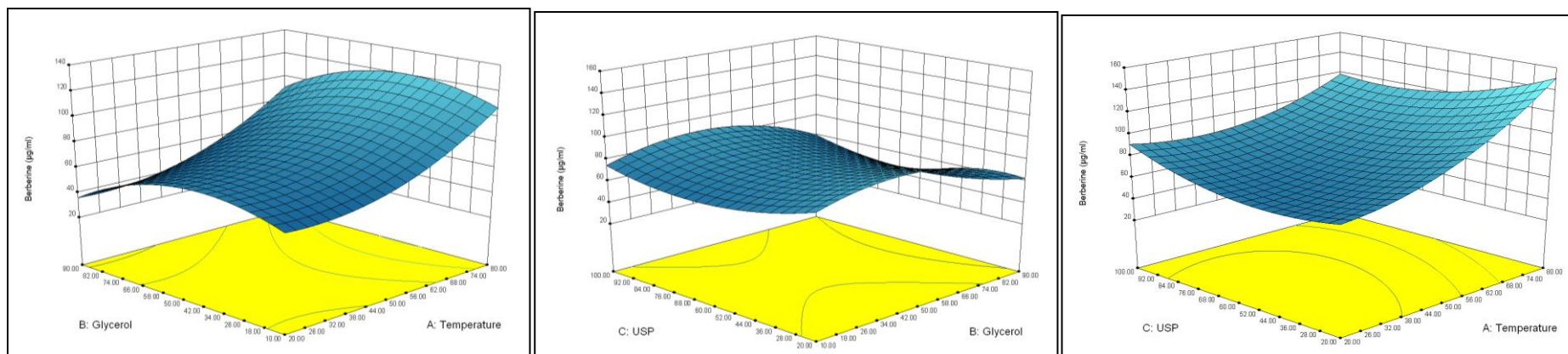
i da se mogu učinkovito koristiti za optimizaciju ekstrakcijskih varijabli. Vrijednost prikladnosti podidaranja (“lack of fit”) u oba modela nije bila je statistički značajna u odnosu na čistu pogrešku što ukazuje na to da je model pogodan i primjeren za opisivanje eksperimentalnih podataka. Koeficijenti determinacije bili su relativno visoki ( $r^2 > 0,93$ ) što pokazuje dobru predvidljivost rezultata odabranih modela.

Najjednostavniji i najintuitivniji način za promatranje učinaka bilo koje nezavisne varijable na odabrani odgovor je grafički prikaz površine odgovora. To se može učiniti tako da su dvije varijable prikazane na x i z osi u istraživanom eksperimentalnom rasponu, dok se treća varijabla drži fiksnom. Na taj način omogućuje se jednostavna vizualizacija utjecaja i interakcije parametara u dizajnu na odabrani odgovor. Slike 4 i 5 prikazuju površine odgovora koje pokazuju utjecaj ispitivanih ekstrakcijskih parametara na sadržaj berberina odnosno RSA IC<sub>50</sub>. Osim grafički, rezultati su prikazani i kao polinomne jednadžbe koje pružaju najtočniji opis odnosa između zavisnih i nezavisnih varijabli.

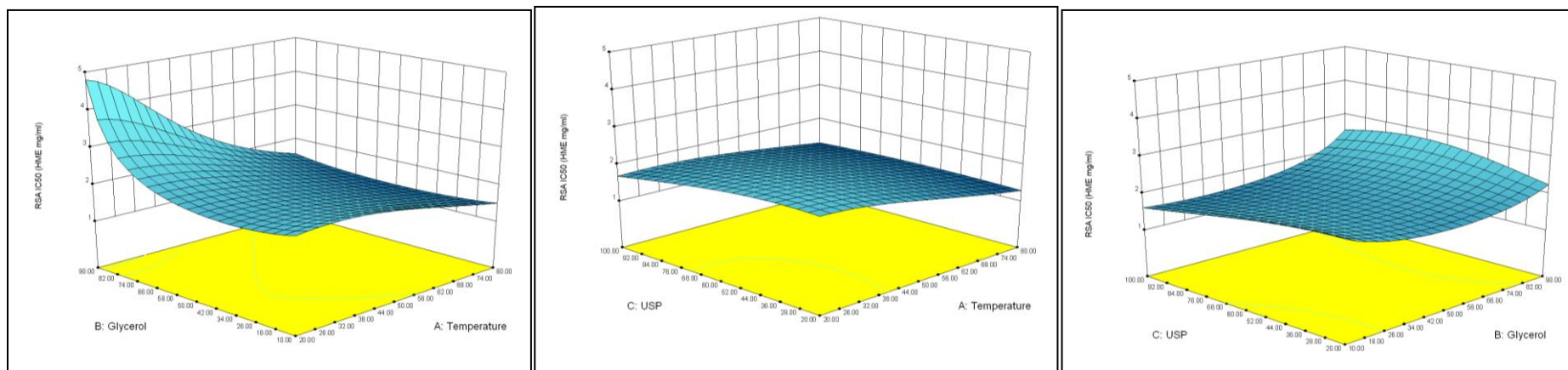
Tablica 3. Analiza varijance (ANOVA) za kvadratni model optimizacije ekstrakcijskih parametara.

Izvor	Ukupni fenoli ( $r^2 = 0.9720$ )					Antiradikalna aktivnost (IC <sub>50</sub> ) ( $r^2 = 0.9396$ )				
	SS	df	MS	F-vrijednost	P-vrijednost	SS	Df	MS	F-vrijednost	P-vrijednost
Model	10834,44	9	1203,83	26,957	0,0001	0,370	9	0,0411	12,108	0,0017
Prikladnost podudaranja	132,178	3	44,06	0,977	0,4870	0,016	3	0,0052	2,561	0,1928
Čista pogreška	180,436	4	45,11			0,008	4	0,0020		

SS = zbroj kvadrata; df = stupnjevi slobode; MS = aritmetična sredina kvadrata



Slika 4. Površine odgovora za prinos berberina (a-c) prilikom ekstrakcije kore korijena *B.vulgaris* a) utjecaj temperature i sadržaja glicerola uz 50 % snage ultrazvuka (USP); b) utjecaj temperature i USP uz koncentraciju glicerola 50 %; c) utjecaj koncentracije glicerola i USP pri 40 °C. Jedinice kao u Tablici 1.



Slika 5. Površine odgovora za aktivnost uklanjanja radikala (RSA  $IC_{50}$ ) a) utjecaj temperature i sadržaja glicerola uz 50 % snage ultrazvuka (USP); b) utjecaj temperature i USP uz koncentraciju glicerola 50 %; c) utjecaj koncentracije glicerola i USP pri 40 °C. Jedinice kao u Tablici 1.

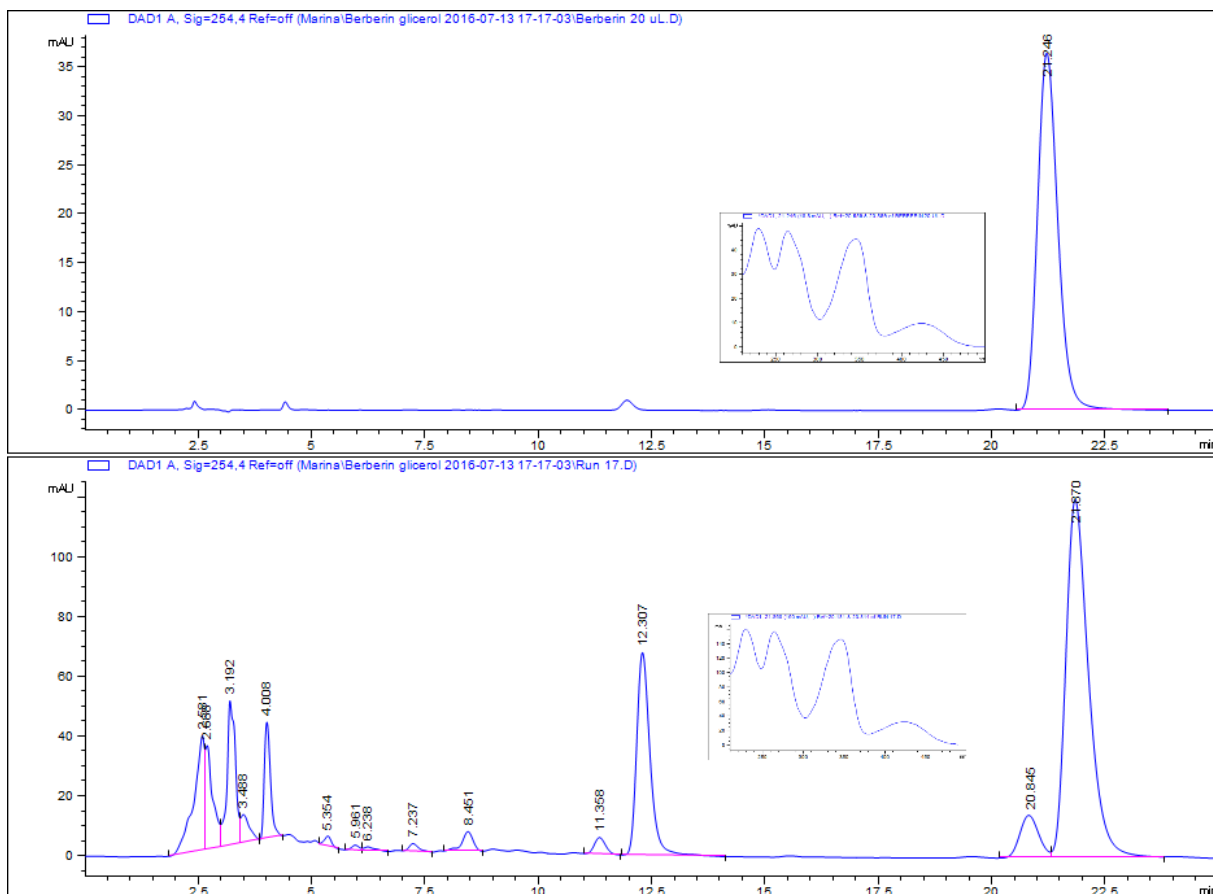
#### 4.1.2. Koncentracija berberina

Kora, stabljika i korijen žutike sadrže benzil-izokinolinske alkaloidne među kojima je najvažniji berberin (1). On pokazuje brojne farmakološke učinke, djeluje antiaritmično, hipolipemijski, hepatoprotektivno i neuroprotektivno (5,39,40), a djeluje i antibakterijski i antifugalno (4,41). Poboljšava izlučivanje inzulina kod zdravih i dijabetičnih osoba (42). Berberin je slabo toksičan prema zdravim humanim stanicama, ali potiskuje rast različitih tumorskih stanica (43,44).

U ovom radu za određivanje koncentracije berberina u ekstraktima korišten je HPLC. Usporedbom vremena retencije i UV-VIS spektara pikova (Slika 6) pokazano je da je berberin glavni maksimum u kromatogramima ekstrakata. Koncentracija berberina u ekstraktu izračunata je kao masa berberina ( $\mu\text{g}$ ) u 1 mL ekstrakta. Količina berberina u ekstraktima značajno je varirala (Tablica 2). Run 13 sadržavao je samo 32,46  $\mu\text{g} / \text{mL}$  berberina, dok je Run 17 sadržavao čak 146,65  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Konačna jednadžba (jednadžba 4) izražena je pomoću kodiranih faktora je (značajni faktori označeni su zvjezdicom):

$$\begin{aligned} \text{Berberin } (\mu\text{g/mL}) = & 16,5745 \times X_1^2(*) - 20,823 \times X_2^2(*) + 14,6545 \times X_3^2(*) + 26,73125 \times X_1(*) \\ & - 8,9475 \times X_2(*) - 2,88125 \times X_3 + 0,8525 \times X_1 \times X_2 - 13,04 \times X_1 \times X_3(*) + 1,6025 \times X_2 \times X_3 + 76,846 \end{aligned}$$

(4)



Slika 6. Kromatogram uzoraka ultrazvučne ekstrakcije (Run1-Run17) na 254 nm.

Rezultati su pokazali da je sadržaj berberina značajno ovisio o temperaturi i koncentraciji glicerola, u vidu linearnog i kvadratnog faktora. Grafički prikaz (Slika 4) otkriva da je povećanje temperature djelovalo povoljno na koncentraciju berberina. Osim toga, snaga ultrazvuka je utjecala na koncentraciju berberina kao kvadratna varijabla te u interakciji s temperaturom ekstrakcije. Kao što je prikazano na Slici 5, kombinacija niske snage ultrazvuka i visoke temperature bila je najpogodnija za učinkovitu ekstrakciju berberina. Kada se snaga ultrazvuka povećavala, prinos berberina se smanjivao. Poznato je da ultrazvuk može uzrokovati degradaciju osjetljivih prirodnih spojeva (30). Dakle, smanjenje koncentracije berberina može biti posljedica kemijske nestabilnosti berberina kada je izložen jakim ultrazvučnim valovima. Primjerice, do

degradacije je moglo doći zbog utjecaja hidroksilnih radikala (45) koji nastaju kao posljedica primjene ultrazvuka, naročito pri visokim temperaturama (46).

#### 4.1.3. Antiradikalna aktivnost ekstrakata

Istraživana je antiradikalna aktivnost ekstrakata pomoću DPPH slobodnih radikala mjerenjem smanjenja apsorbancije DPPH radikala u prisutnosti antioksidansa na 517 nm. To je relativno jednostavna metoda prikladna za određivanje antiradikalne aktivnosti velikog broja prirodnih ekstrakata u relativno kratkom vremenu, što ovaj model čini jednim od najčešće korištenih u literaturi (23,24,47,48). U prikazanom radu vrijednosti RSA IC<sub>50</sub> *B. vulgaris* ekstrakata kretale su se između 1,246 i HME 5,154 mg / g. Kao pozitivna kontrola u ovom radu korišten je BHA, kojem je izmjerena RSA IC<sub>50</sub> iznosila 5,9 ± 0,1 µg/mL. ANOVA je pokazala da se netransformirani rezultati ne mogu ukopiti niti u kvadratni niti linearni model. Ali, kad se za transformaciju rezultata koristila potencija -1,71 rezultati su se statistički značajno uklopili u kvadratnu jednadžbu koja je dalje korištena za interpretaciju rezultata. Odnos između RSA IC<sub>50</sub> i kodiranih nezavisnih varijabli prikazan je u jednadžbi (jednadžba 5) u nastavku (varijable signifikantne za model označene su zvjezdicom):

$$\begin{aligned} \text{RSA IC}_{50} (\text{mg HME} / \text{mL})^{-1,71} = & 0,091691853 \times X_1^2(*) - 0,121706844 \times X_2^2(*) + 0,05017686 \times X_3^2 \\ & + 0,159204081 \times X_1(*) - 0,056160391 \times X_2(*) + 0,039677217 \times X_3 + 0,03930055 \times X_1 \times X_2 - 0,032749 \\ & 798 \times X_1 \times X_3 - 0,063509532 \times X_2 \times X_3 + 0,353040205 \end{aligned} \quad (5)$$

Koncentracija glicerola i temperatura pri kojoj je izvedena ekstrakcija značajno su utjecale na radikalnu aktivnost. Obje su varijable bile značajne kao linearni te kao kvadratni faktori. Povećanje temperature uzrokovalo je smanjenje RSA IC<sub>50</sub> vrijednosti. Prema tome, veće temperature bile su prikladnije za ekstrakciju spojeva antiradikalnim značajkama (Slika



5). Osim toga, niža koncentracija glicerola pridonijela je dobivanju ekstrakata bolje antiradikalne aktivnosti što govori u prilog veće polarosti molekula s antiradikalnim značajkama u korijenu kore žutike.

#### 4.1.4. Optimizacija ekstrakcije

Cilj rada bio je dobiti ekstrakt *B. vulgaris* s najvećom koncentracijom berberina, kao i ekstrakt visoke antiradikalne aktivnosti unutar ispitivanog raspona ekstrakcijskih parametara. Na osnovu eksperimentalnih rezultata i statističke analize provedene su numeričke optimizacije kako bi se ustanovile optimalne razine nezavisnih varijabli. Određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije i predviđene vrijednosti odgovarajućih odgovora temeljilo se na funkciji poželjnosti (D), koja je bila jednaka 1 za berberin i 0,914 za RSA. U studiji, svaki od odabranih odgovora bio je najbolje optimiziran pod različitim uvjetima ekstrakcije (Tablica 2). Rješenje kvadratnih jednadžbi pokazalo je da su najbolji ekstrakcijski uvjeti ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) za ekstrakciju berberina bili pri temperaturi 80 °C, koncentraciji glicerola od 50 % i jačini ultrazvuka od 144 W, dok su ekstrakti koji pokazuju najbolju RSA dobiveni pri temperaturi od 80 °C, koncentraciji glicerola 40 % i jačini ultrazvuka od 720 W. Predviđeni rezultati dobro su se podudarali s eksperimentalnim, s malim odstupanjem, što ukazuje na prikladnost odabranih modela (Tablica 4).

Tablica 4. Predviđene i izmjerene vrijednosti optimalnog iznosa ovisnih varijabli.

Optimizirani odgovor	Cilj optimizacije	$X_1$ °C	$X_2$ %	$X_3$ W	Predviđeno	Određeno	Odstupanje (%)
Berberin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Maksimizirati	80	50	144	150,7	145,5	-3,45
RSA IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{L} / \text{mL}$ )	Minimizirati	80	30	720	1,26	1,31	3,82

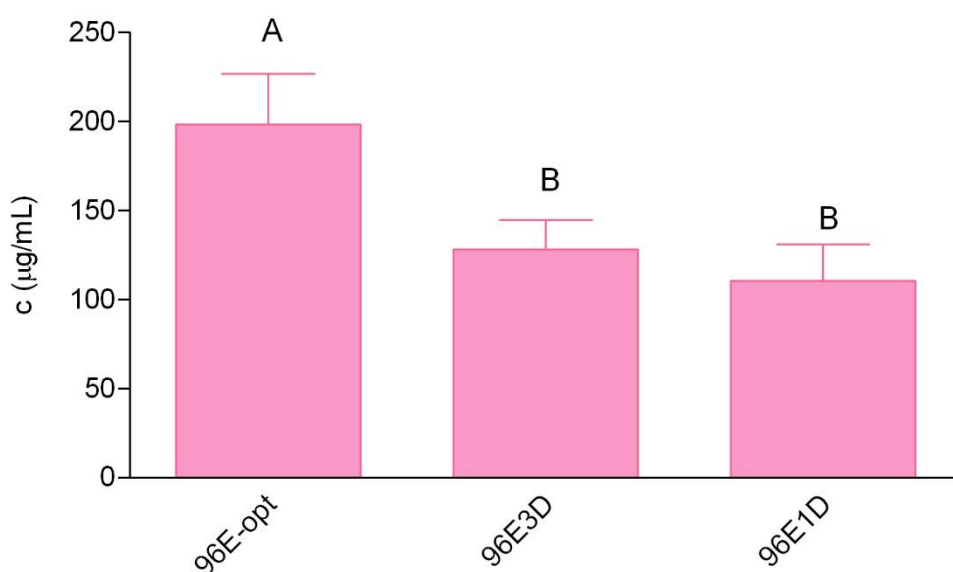
$X_1$  = temperatura,  $X_2$ = koncentracija glicerola (m/m) i  $X_3$ = snaga ultrazvuka.

## 4.2. Koncentracija berberina u maceratima

Kako bi se usporedila učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije glicerolom s maceracijom glicreolom, ali i maceracijom ostalim otapalima priređeni su jednodnevni i trodnevni macerati pomoću vode (W), 96 %-tnog etanola (96E) i 50%-tnog glicerola (50G) te uspoređeni s ekstraktima priređenim pomoću istog otapala ali pri optimiziranim uvjetima ekstrakcije (-opt). Rezultati su detaljno opisani dalje u tekstu.

### 4.2.1. Ekstrakcija etanolom

U radu je uspoređena učinkovitost jednodnevne i trodnevne maceracije 96 %-tnim etanolom. Osim toga ekstrakcija je bila provedena i u uvjetima pri kojima je priređen optimizirani ultrazvučni ekstrakt, odn. 80 °C tijekom 20 min uz 144 W snagu ultrazvuka.



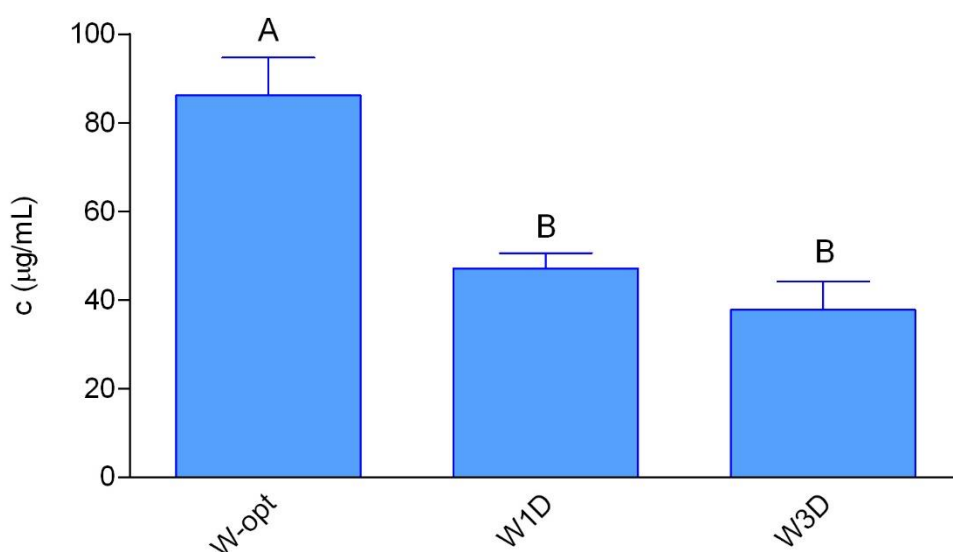
Slika 7. Koncentracija berberina u etanolnom maceratu.

Usporedbom različitog vremena trajanja maceracije uzoraka u 96 % etanolu uočeno je da je uzorak priređen uz pomoć ultrazvuka imao najveću koncentraciju berberina odnosno da se uporabom povišene temperature i ultrazvuka značajno povećao prinos ekstrakcije. Iz

rezultata također slijedi da produženo vrijeme maceracije ne bi značajno utjecalo na prinos jer razlika u koncentraciji berberina pri jednodnevnoj maceraciji i trodnevnoj maceraciji u 96 % etanolu nije bila statistički značajna, što je vidljivo na Slici 7.

#### 4.2.2. Ekstrakcija vodom

Koncentracija berberina u vodenim maceratima prikazana je na Slici 8.

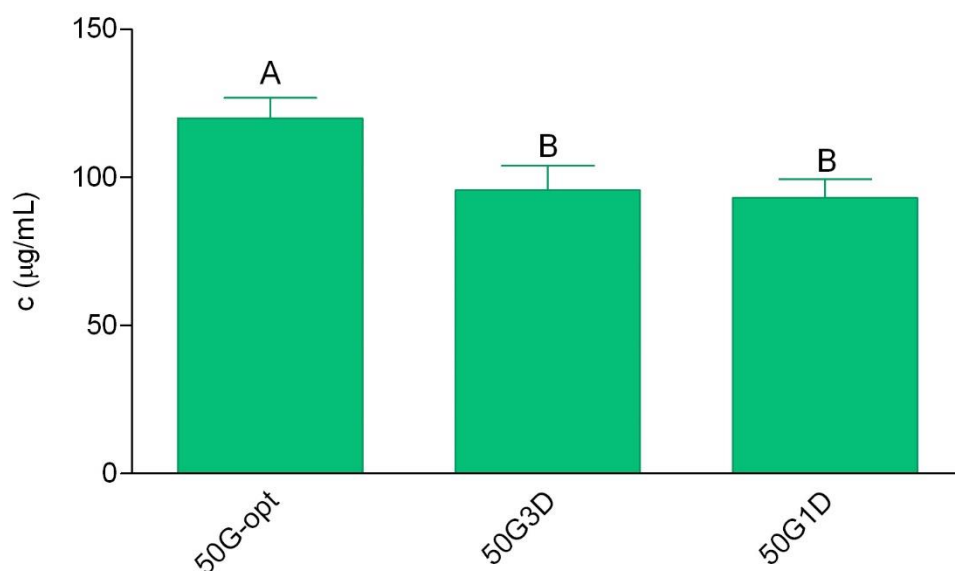


Slika 8. Koncentracija berberina u vodenoj maceraciji.

Usporedbom koncentracije berberina i duljine trajanja vodene maceracije uzoraka uočeno je da vodeni ekstrakt priređen uz pomoć ultrazvuka imao najveću koncentraciju berberina. Razlika između jednodnevne i trodnevne vodene maceracije nije bila statistički značajna. Kao i kod maceracije etanolom, može se zaključiti da su povišena temperatura i upotreba ultrazvuka više pridonosile učinkovitosti maceracije nego produženo vrijeme ekstrakcije.

#### 4.2.3. Ekstrakcija glicerolom

Usporedbom različitog vremena trajanja maceracije uzoraka maceriranih u 50 % otopini glicerola uočeno je da uzorak priređen pri 80 °C tijekom 20 min, ali bez primjene ultrazvuka ima najveću koncentraciju berberina (Slika 9).



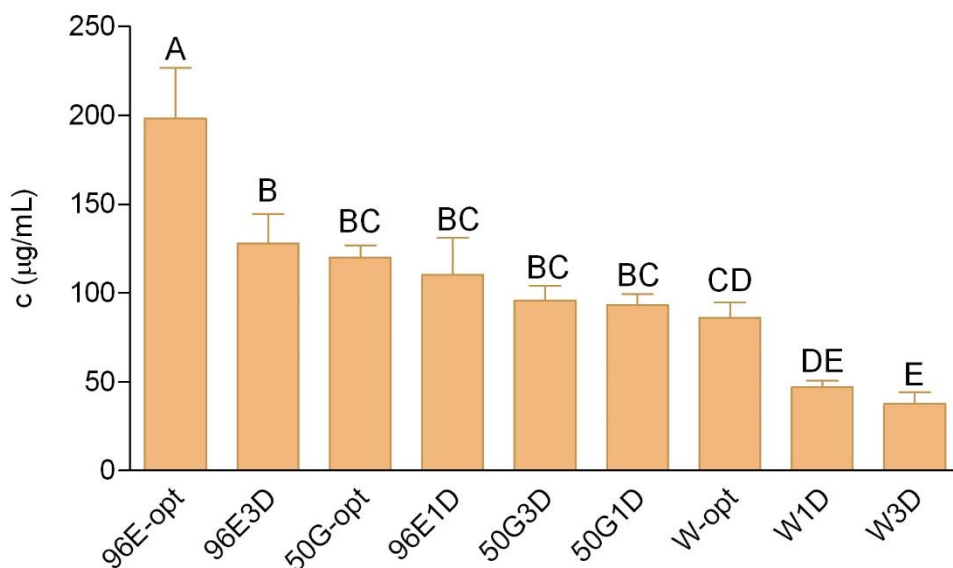
Slika 9. Koncentracija berberina u glicerolnom maceratu.

Razlika u koncentraciji berberina u jednodnevnoj maceraciji i trodnevnoj maceraciji nije bila statistički značajna. Iako su i u ovom slučaju na učinkovitost ekstrakcije povoljnije utjecali povišena temperatura i ultrazvuk nego vrijeme maceracije, taj utjecaj nije bio tako izražen kao kod etanola, odnosno vode.

#### 4.2.4. Međusobna usporedba ekstrakcijskih otapala

Usporedbom koncentracije berberina u uzorcima koji su macerirani u 96 % etanolu, 50 % glicerolu i vodi uočeno je da ekstrakcija 96 %-tnim etanolom uz uporabu ultrazvuka dovodi do najveće koncentracije tog alkaloida u ekstraktu (Slika 10). Općenito, 96 %-tni etanol je bio najučinkovitije ekstrakcijsko sredstvo. Ipak, važno je uočiti da je promjena uvjeta uzrokovala

da se količina berberina u glicerolnom ekstraktu statistički izjednači s jednodnevnom i trodnevnom maceracijom u etanolu odnosno da su uzorci macerirani u 96 % etanolu (jednodnevne i trodnevne maceracije) i ekstrakt priređen ultrazvučnom ekstrakcijom u 50 % glicerolu imali statistički jednaku koncentraciju berberina. Stoga se može zaključiti da je ultrazvukom potpomognuta glicerolna ekstrakcija učinkovita alternativa etanolnoj maceraciji koja je najčešće primjenjivana metoda ekstrakcije biljnih metabolita. Kako razlika u koncentraciji berberina između ultrazvučnog ekstrakta i macerata nije bila velika, ni macerati priređeni uporabom glicerola se u ovom dijelu statističke analize nisu značajno razlikovali od etanolnih macerata. Ovo je naročito zanimljivo jer je glicerol zeleno i sigurno otapalo koje ima GRAS certifikat (Generally Recognized as Safe) stoga ima značajne prednosti nad drugim organskim otapalima (49).



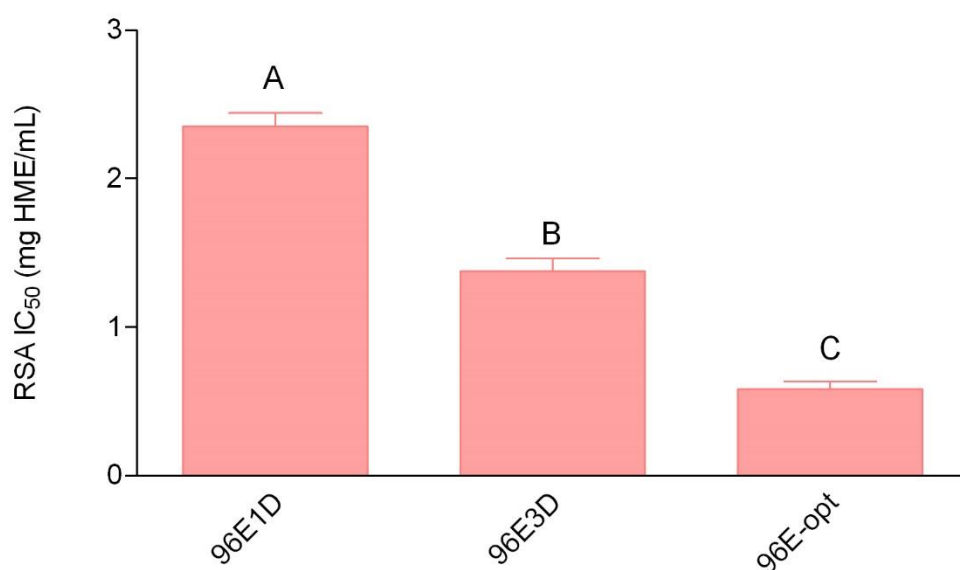
Slika 10. Koncentracija berberina u etanolnim, glicerolnim i vodenim maceratima.

Maceracija u vodi bila je najmanje učinkovita metoda ekstrakcije berberina (Slika 10) dok su se primjenom ultrazvuka dobili nešto bolji rezultati. Duže trajanje

maceracije nije donijelo statistički značajno povećanje koncentracije berberina, naprotiv, količina berberina u trodnevnom maceratu bila je manja nego u jednodnevnom. Moguće je da je dužim stajanjem u vodi došlo do razgradnje tog alkaloida.

### 4.3. Antiradikalna aktivnost macerata

#### 4.3.1. Ekstrakcija etanolom

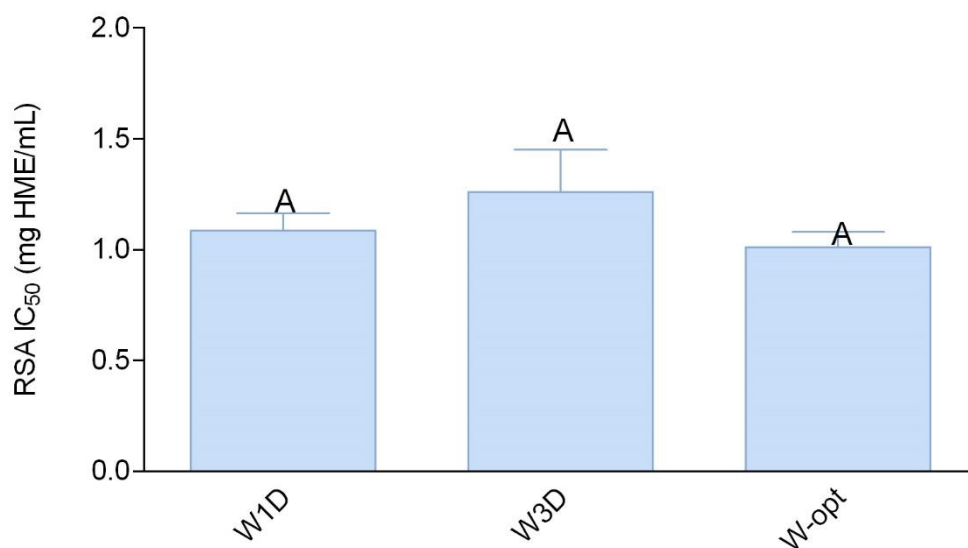


Slika 11. Antiradikalna aktivnost uzoraka u 96% etanolu.

Na Slici 11 je vidljivo da je antiradikalna aktivnost tri uzorka priređena pomoću 96 %-tog etanola (96 % etanol maceriran jedan dan, 96 % etanol maceriran tri dana te uzorak priređen pri optimalnim uvjetima ultrazvučne ekstrakcije u 96 % etanolu) bila statistički različita. Najbolju antiradikalnu aktivnost pokazao je ekstrakt priređen uz pomoć ultrazvuka i povišene temperature dok je ekstrakt priređen jednodnevnom maceracijom pokazao najslabiji učinak. Stoga možemo pretpostaviti da su tvari koje su odgovorne za aktivnost u etanolnim ekstraktima kemijski stabilne, čak i pri povišenoj temperaturi i uz ultrazvuk.

#### 4.3.2. Ekstrakcija vodom

Antiradikalna aktivnost uzoraka (jednodnevna maceracija u vodi, trodnevna maceracija u vodi i optimizirani uzorak) maceriranih u vodi bila je statistički jednaka što je vidljivo na Slici 12.

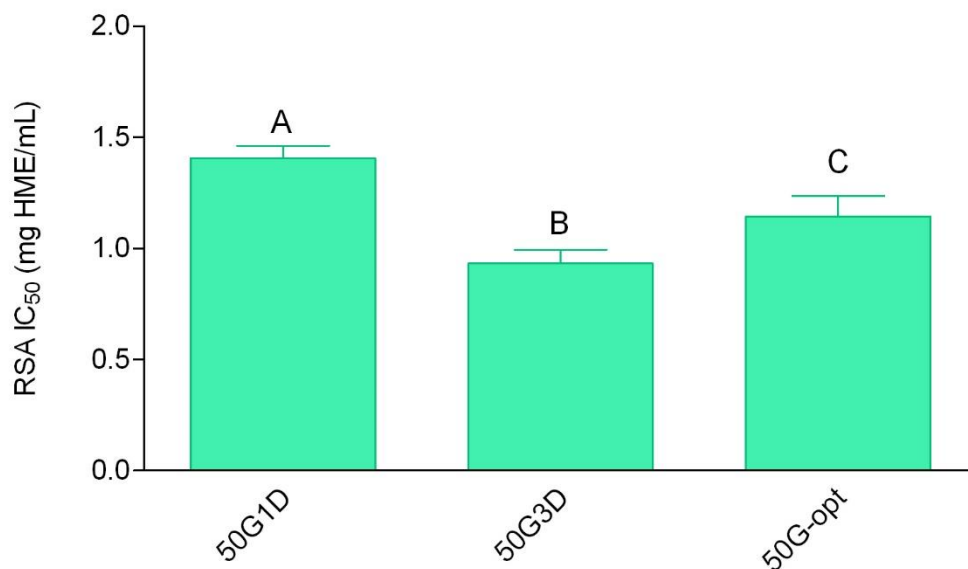


Slika 12. Antiradikalna aktivnost uzoraka u otapalu vodi.

Ukoliko se usporede Slika 12 i Slika 8 može se primijetiti da nema korelacije između antiradikalne aktivnosti i koncentracije berberina u ekstraktima. Iz toga proizlazi da su neke druge sastavnice odgovorne za učinak o čemu će biti riječi dalje u tekstu.

#### 4.3.3. Ekstrakcija glicerolom

Iz Slike 13 je razvidno da je antiradikalna aktivnost bila je statistički različita kod sva tri uzorka priređena pomoću glicerola (uzorak priređen jednodnevnom, trodnevnom maceracijom te uzorak priređen ultrazvučnom ekstrakcijom pri optimalnim uvjetima).



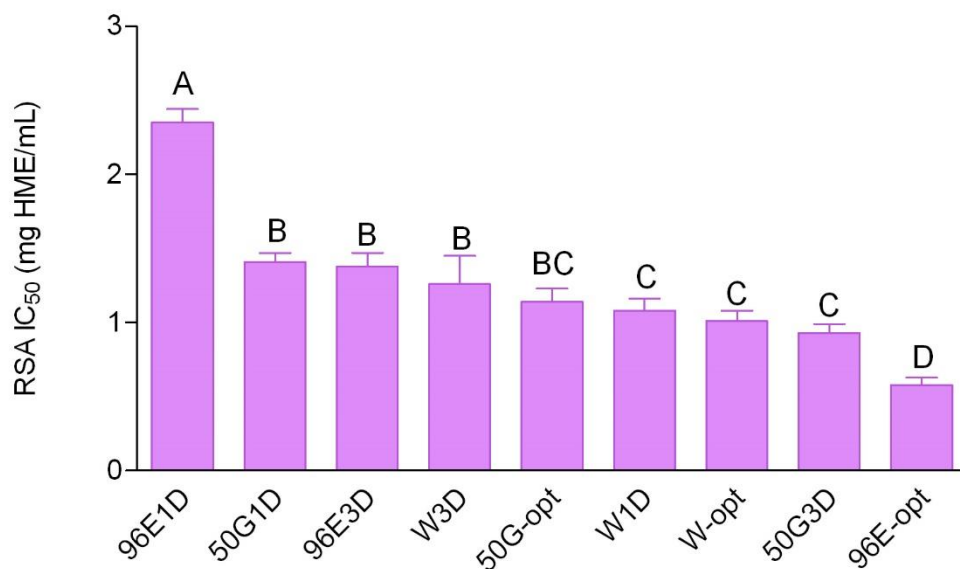
Slika 13. Antiradikalna aktivnost uzoraka u 50% glicerolu.

Slično kao i u slučaju vodene ekstrakcije, usporedbom Slike 13 i Slike 9 dolazi se do zaključka da količina berberina nije u direktnoj vezi s antiradikalnom aktivnošću ekstrakata. Primjerice ekstrakt priređen ultrazvučnom ekstrakcijom pri povišenoj temperaturi nije bio najučinkovitije antiradikalno sredstvo iako je sadržavao najveću količinu berberina. Nameće se zaključak da su druge sastavnice odgovorne za opaženi antiradikalni učinak o čemu će biti govora dalje u tekstu.

#### 4.3.4. Međusobna usporedba ekstrakcijskih otapala

Na Slici 14 može se primijetiti da je najveća antiradikalna aktivnost zabilježena kod uzorka koji je priređen ultrazvučnom ekstrakcijom u 96 % etanolu. Slabiju, ali međusobno statistički jednaku antiradikalnu aktivnost pokazali su i ekstrakti priređeni u vodi ili 50 % glicerolu uz pomoć ultrazvuka, te u 50 % glicerolu trodnevnom odnosno vodi jednodnevnom maceracijom. Najmanju antiradikalnu aktivnost je pokazao uzorak maceriran 24 h u 96 % etanolu.





Slika 14. Antiradikalna aktivnost ispitivanih uzoraka.

Važno je napomenuti da, iako berberin pokazuje određeni stupanj antiradikalne aktivnosti (50), analizom Slike 10 i Slike 14 može se zaključiti da antiradikalna aktivnost nije ovisila o koncentraciji berberina. Stoga možemo zaključiti da osim berberina i drugi biljni metaboliti utječu na antiradikalnu aktivnost priređenih ekstrakata. Primjerice, raniji radovi pokazuju da su fenoli (51) poput kanabisina G i (±)-lioniresinola (52) odgovorni za antiradikalnu aktivnost ekstrakata kore korijena žutike. Moguće je da i drugi prirodni metaboliti imaju udjela u opaženoj antiradikalnoj aktivnosti ekstrakata. Primjerice polisaharidi iz biljne vrste *B. dasystachya* su pokazali izvrstan antiradikalni učinak (53).

## 5. Zaključak

U ovom je istraživanju uspješno upotrijebljen Box-Behnkenov dizajn kako bi se optimizirali uvjeti ekstrakcije funkcionalnih komponenti kore korijena žutike (*Berberis vulgaris* L. Berberidaceae). Određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije (temperatura ekstrakcije, koncentracija glicerola i snaga ultrazvuka) za postizanje maksimalne koncentracije berberina i najbolje antiradikalne aktivnosti u testu s DPPH slobodnim radikalom. Rezultati su pokazali da su unutar istraživanih raspona sve neovisne varijable utjecale na sadržaj berberina, dok snaga ultrazvuka nije značajno utjecala na antiradikalnu aktivnost ekstrakata. Iako je etanol bio učinkovitije otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju berberina, ultrazvučna ekstrakcija uz pomoć 50% tnog glicerola je bila jednako učinkovita kao etanolna maceracija. Razlike u antiradikalnoj aktivnosti i sadržaju berberina priređenih ekstrakata ukazuju na to da se postavke ekstrakcije trebaju pažljivo odabrati prema željenim rezultatima.

## 6. Literatura:

1. Fran Kušan. Nova vrsta žutike (*Berberis*) u flori Hrvatske. *Acta Bot Croat.* 1969;28(1):423–36.
2. Abd El-Wahab AE, Ghareeb DA1, Sarhan EE, Abu-Serie MM, El Demellawy MA. In vitro biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:218.
3. Neag MA, Mocan A, Echeverría J, Pop RM, Bocsan CI, Crişan G, et al. Berberine: Botanical Occurrence, Traditional Uses, Extraction Methods, and Relevance in Cardiovascular, Metabolic, Hepatic, and Renal Disorders. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Aug 21;9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6111450/>
4. Kosalec I. Croatian barberry (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine - analysis and antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;25:145–50.
5. Zhu L, Gu P, Shen H. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats. *Int Immunopharmacol.* 2019;68:242–51.
6. Chen, Y., Wang, Y., Zhang, J., Sun, C. i Lopez, A. Berberine Improves Glucose Homeostasis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats in Association with Multiple Factors of Insulin Resistance. *Int Sch Res Netw Endocrinol.* 2011;1–8.
7. Wang, Z., Lu, F., Xu, L., Dong, H. Berberine reduces endoplasmic reticulum stress and improves insulin signal transduction in Hep G2 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31:578 – 584.
8. Yang, J., Yin, J., Gao, H., Xu, L., Wang, Y., Xu, L. i Li., M. Berberine Improves Insulin Sensitivity by Inhibiting Fat Store and Adjusting Adipokines Profile in Human Preadipocytes and Metabolic Syndrome Patients. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;1–9.
9. Zeng X, Zeng X. Relationship between the clinical effects of berberine on severe congestive heart failure and its concentration in plasma studied by HPLC. *Biomed Chromatogr.* 1999;13(7):442–4.
10. Cicero A, Ertek S. Berberine: Metabolic and cardiovascular effects in preclinical and clinical trials. *Nutr Diet Suppl.* 2009 Sep 1;1.
11. Yin J, Xing H, Ye J. Efficacy of Berberine in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolism.* 2008 May;57(5):712–7.
12. Minaiyan M, Ghannadi A, Mahzouni P, Jaffari-Shirazi E. Comparative Study of *Berberis vulgaris* Fruit Extract and Berberine Chloride Effects on Acetic Acid-Induced Colitis in Rats. *Iran J Pharm Res IJPR.* 2011;10(1):97–104.
13. Domitrović, Robert ; Jakovac, Hrvoje ; Blagojević, Gordana. Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- $\alpha$ , COX-2, and iNOS expression in CCl4-intoxicated mice. *Toxicology.* 2011;280:33–43.

14. DAI P, WANG J, LIN L, ZHANG Y, WANG Z. Renoprotective effects of berberine as adjuvant therapy for hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus: Evaluation via biochemical markers and color Doppler ultrasonography. *Exp Ther Med.* 2015 Sep;10(3):869–76.
15. Birben E1, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19.
16. Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *J Food Compos Anal.* 2006 Aug 1;19(5):405–19.
17. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2006 Jul 1;187(1):1–17.
18. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727–47.
19. Hanachi, P., Kua, S.H., Asmah, R., Motalleb, G. i Fauziah, O. Cytotoxic Effect of *Berberis vulgaris* Fruit extract on the Proliferation of Human Liver Cancer Cell Line (HepG2) and its Antioxidant Properties. *Int J Cancer Res.* 2006;2(1):1–9.
20. S. Schaffer, M. Understanding local Mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacol Res.* 2005;52:353–66.
21. Gacche RN, Gond DS, Dhole NA, Dawane BS. Coumarin Schiff-bases: as antioxidant and possibly anti-inflammatory agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2006;21(2):157–61.
22. Sertić A. METODE DIZAJNIRANJA EKSPERIMENTALNOG POSTUPKA. SVEUČILIŠTE U ZAGREBU FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE; 2015.
23. Izadiyn, Hemmateenejad. Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. *Food Chem.* 2016;(190):864–70.
24. Dahmoune, Nayak, Moussi, Remini, Madani. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem.* 2015;(166):585–95.
25. Liu, Wei, Liao. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. *Ind Crops Prod.* 2013;49:837–43.
26. Wu J, Yu D, Sun H, Zhang Y, Zhang W, Meng F, et al. Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of *Berberis amurensis* by response surface methodology. *Ind Crops Prod.* 2015 Jul 1;69:68–75.
27. Rodrigues, Fernandes, Sousa de Brito, Sousa, Narain. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. *Ind Crops Prod.* 2015;69:400–7.
28. Putnik P, Lorenzo JM, Barba FJ, Roohinejad S, Režek Jambrak A, Granato D, et al. Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods.* 2018 Jul;7(7):106.

29. Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb: Školska knjiga; 2003. 42-45 p.
30. Monika Blekić, , Anet Režek Jambrak, F. Chemat. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol*. 2011;3:32–47.
31. Cheikh Rouhou M, Abdelmoumen S, Thomas S, Attia H, Ghorbel D. Use of green chemistry methods in the extraction of dietary fibers from cactus rackets (*Opuntia ficus indica*): Structural and microstructural studies. *Int J Biol Macromol*. 2018 Sep 1;116:901–10.
32. Cruz PN, Fetzer DL, do Amaral W, de Andrade EF, Corazza ML, Masson ML. Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol solvent. *J Supercrit Fluids*. 2019 Apr 1;146:55–64.
33. Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chem Eng Process Process Intensif*. 2012 Mar 1;53:10–23.
34. Vo YH, Le TV, Nguyen HD, To TA, Ha HQ, Nguyen AT, et al. Synthesis of quinazolinones and benzazoles utilizing recyclable sulfated metal-organic framework-808 catalyst in glycerol as green solvent. *J Ind Eng Chem*. 2018 Aug 25;64:107–15.
35. Končić MZ, Barbarić M, Perković I, Zorc B. Antiradical, Chelating and Antioxidant Activities of Hydroxamic Acids and Hydroxyureas. *Molecules*. 2011;16(8):6232–42.
36. DongaX.-Q.XieabX.-L.WangacY.ZhanacY.-J.Yaoa. Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Bioprod Process*. 2009;87(2):139–44.
37. Wolfson A, Dlugy C, Shotland Y. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Env Chem Lett*. 2006;5:67–71.
38. Park KS, Kang KC, Kim JH, Adams DJ, Johng TN, Paik YK. Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosyntheses in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43(5):667–74.
39. de Oliveira JS, Abdalla FH, Dornelles GL, Palma TV, Signor C, da Silva Bernardi J, et al. Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236(2):641–55.
40. Yousefian M, Shakour N, Hosseinzadeh H, Hayes AW, Hadizadeh F, Karimi G. The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. *Phytomedicine*. 2019;55:200–13.
41. Pepeljnjak. The antimicrobial effect of berberin and preparation of tinctura berberidis. *Pharmazie*. 1992;47:307–8.
42. Yi et al. Strategy for encoding and comparison of gene expression signatures. *Genome Biol*. 2007;8(7).

43. Schmandke, H. Berberin, an isoquinolien alkaloid of barberry, lowers blood glucose and lipid concentrations | [Berberin, ein isochinolinalkaloid der berberitze, mit blutglukose- und -lipidsenkender wirkung]. *Ernahrungs Umsch.* 2007;54(10):570–3.
44. Hesari A, Ghasemi F, Cicero AFG, Mohajeri M, Rezaei O, Hayat SMG, et al. Berberine: A potential adjunct for the treatment of gastrointestinal cancers? *J Cell Biochem.* 2018;119(12):9655–63.
45. Marszalek M, Wolszczak M. Radiolysis of berberine or palmatine in aqueous solution. *Radiat Phys Chem.* 2011 Jan 1;80(1):94–9.
46. Suslick KS, Price GJ. Applications of ultrasound to materials chemistry. 1999. 295 p. (Annual Review of Materials Science; vol. 29).
47. Xynos N, Papaefstathiou G, Gikas E, Argyropoulou A, Aligiannis N, Skaltsounis A-L. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Sep Purif Technol.* 2014 Feb 10;122:323–30.
48. Kasote DM, Jayaprakasha GK, Patil BS. Leaf Disc Assays for Rapid Measurement of Antioxidant Activity. *Sci Rep.* 2019;9(1).
49. Rouhani M. Modeling and optimization of ultrasound-assisted green extraction and rapid HPTLC analysis of stevioside from *Stevia Rebaudiana*. *Ind Crops Prod.* 2019;132:226–35.
50. Shirwaikar A, Shirwaikar A, Rajendran K, Punitha ISR. In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(9):1906–10.
51. Zovko Končić M, Kremer D, Karlović K, Kosalec I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol.* 2010 Aug 1;48(8):2176–80.
52. Tomosaka H, Chin Y-W, Salim AA, Keller WJ, Chai H, Kinghorn AD. Antioxidant and cytoprotective compounds from *Berberis vulgaris* (barberry). *Phytother Res.* 2008;22(7):979–81.
53. Han L, Suo Y, Yang Y, Meng J, Hu N. Optimization, characterization, and biological activity of polysaccharides from *Berberis dasystachya* Maxim. *Int J Biol Macromol.* 2016;85:655–66.

## Prilog 1. Popis publikacija

### Znanstveni radovi

1. Janči, Tibor; Kanski, Danijel; Dulić, Marina; Marušić, Nives; Medić, Helga; Petrak, Tomislav; Vidaček, Sanja. PREHRAMBENA VRIJEDNOST KALIFORNIJSKE PASTRVE (*Oncorhynchus mykiss*) UZGOJENE U JADRANSKOM MORU // Ribarstvo : znanstveno-stručni časopis za ribarstvo, 70 (2013), 20-30.

2. Dulić, Marina; Ciganović, Petar; Vujić, Lovorka; Marijana Zovko Končić, Antidiabetic and Cosmeceutical Potential of Common Barbery (*Berberis vulgaris* L.) Root Bark Extracts Obtained by Optimization of 'Green' Ultrasound-Assisted Extraction , *Molecules*, 24 (2019), 19; 3613, 17 doi:10.3390/molecules24193613.

### Posterska priopćenja na znanstvenim skupovima

1. Dulić, Marina; Zovko Končić, Marijana. Multi-response optimization of ultrasound-assisted glycerol extraction of bioactive berberine from *Berberis vulgaris*. The International Bioscience Conference and the 6th International PSU – UNS Bioscience Conference IBSC, Novi Sad, Serbia, 2016, 217-217 (postersko priopćenje).

2. Ciganović, Petar; Jablan, Jasna; Momchev, Plamen; Jablonowska, Magda; Dulić, Marina; Jug, Mario; Tomczyk, Michal; Zovko Končić, Marijana. Glycerol extracts of *Glycyrrhiza glabra*, *Echinacea purpurea*, *Silybum marianum* and *Berberis vulgaris*: chemical characterisation and cosmeceutical potential // 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) Innsbruck, Austrija, 2019, 282-283.