

# Ukupni polifenoli i antioksidativna aktivnost dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

---

Pilić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:686414>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Ivona Pilić**

**Ukupni polifenoli i antioksidativna aktivnost  
dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti  
crijeva**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Daniele Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije.

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije na stručnom vodstvu, podršci i strpljenju prilikom pisanja diplomskog rada.*

*Hvala i cijelom Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova na mogućnosti izrade eksperimentalnog rada.*

*Također, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na ogromnoj podršci i ljubavi koju su mi pružali tijekom cijelog mog obrazovanja.*

Rad je dijelom financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekt: *Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva*

[HRZZ-UIP-2017-05-3949].



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1.POLIFENOLI.....	2
1.1.1.  Kemijska struktura polifenola.....	2
1.2.UPALNE BOLESTI CRIJEVA.....	4
1.2.1.  Kurkumin u upalnim bolestima crijeva.....	5
1.2.2.  Andrografolidi.....	6
1.2.3.  Bosvelične kiseline.....	6
1.3.ANTIOKSIDANSI.....	7
1.3.1.  Podjela antioksidansa.....	7
1.3.2.  Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti.....	8
1.3.2.1.DPPH.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1.MATERIJALI.....	13
3.1.1.  Uzorci.....	13
3.1.2.  Kemikalije.....	13
3.1.3.  Radni instrumenti.....	13
3.1.4.  Pribor.....	13
3.1.5.  Programski paketi.....	14
3.2.METODE.....	17
3.2.1.  Priprema standardnih otopina.....	17
3.2.2.  Ekstrakcija polifenola.....	17
3.2.3.  Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola.....	17
3.2.4.  Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom.....	18
3.2.5.  Određivanje gubitka sušenjem analizatorom vlage.....	18
3.2.6.  Statistička analiza.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
4.1.SADRŽAJ VLAGE.....	21
4.2.SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI.....	21
4.3.ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DODATAKA PREHRANI.....	23
5. ZAKLJUČAK.....	27
6. LITERATURA.....	29

7. SAŽETAK/SUMMARY .....32

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

## **1. UVOD**

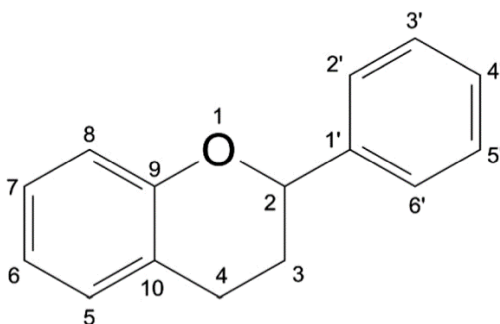
## 1.1.POLIFENOLI

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji su od iznimne važnosti zbog povoljnog učinka na ljudsko zdravlje poput antioksidativnog i protuupalnog učinka. Izvori polifenola su voće, povrće, orašasti plodovi, sjemenke, čaj, kava, crveno vino, tamna čokolada te korijenje, kora i lišće različitih biljaka (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

### 1.1.1. Kemijska struktura polifenola

U svojoj kemijskoj strukturi, polifenoli sadrže jedan ili više aromatskih prstenova na koje su vezane hidroksilne skupine (Brglez Mojzer i sur., 2016). Svrstani su u različite skupine ovisno o broju fenolnih prstenova koje sadrže te prisutnosti strukturnih elemenata koji povezuju te prstenove. Prema tome, dijele se na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004).

Flavonoidi se mogu naći u obliku aglikona i glikozida, a svima im je zajednička osnovna struktura difenilpropana u kojoj su dva fenolna prstena, prstenovi A i B, obično povezani heterocikličkim prstenom C što vidimo na Slici 1. Atom kisika u prstenu C je označen kao prva pozicija, a preostali atomi ugljika su numerirani od C2 do C10, dok su u prstenu B ugljikovi atomi numerirani od C1' do C6'. Heterociklički prsten je obično piran. Na temelju različite oksidacije središnjeg piranskog prstena i prisutnosti hidroksilnih skupina, flavonoidi se dijele na: flavonole, flavone, flavanone, flavane, izoflavone i antocijanidine (Singla i sur., 2019).



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida (preuzeto i prilagođeno prema Singla i sur., 2019)



Flavoni u svojoj strukturi imaju karbonilnu grupu na položaju C4, prsten B je vezan za heterociklički prsten u položaju C2, a između atoma C2 i C3 se nalazi dvostruka veza. Najvažniji flavoni su luteolin i apigenin, a mogu se naći u povrću kao što su peršin i celer (Singla i sur., 2019).

Flavonoli su 3-hidroksi derivati flavanona te se razlikuju od flavona po prisutnosti hidroksilne grupe na položaju C3. Najpoznatiji flavonoli su kemferol kojeg posebice ima u zelenom lisnatom povrću te kvercetin koji se u visokoj koncentraciji nalazi u luku (Singla i sur., 2019).

Za razliku od flavonola i flavona, flavanoni imaju zasićeni heterociklički prsten bez hidroksilne skupine na položaju C3 te često na položaju C7 imaju vezan disaharid. Flavanone u visokim koncentracijama nalazimo u citrusima kao što su naranča (npr. hesperidin) i limun (npr. eriodiktiol) (Singla i sur., 2019).

Flavanoli sadrže zasićeni heterociklički prsten te hidroksilnu grupu na položaju C3. U hrani postoje isključivo u obliku aglikona, a mogu se pronaći u obliku monomera, kao što su katehini i epikatehini te u obliku polimera, kao što su tanini. Tanini su dobro topljivi u vodi te imaju relativno visoku molekulsku masu. Mogu se pronaći u kompleksu s alkaloidima, polisaharidima te proteinima pa se dijele na hidrolizirajuće i kondenzirane tanine. Kondenzirani tanini su poznati i kao proantocijanidini zbog njihove sposobnosti prelaska u antocijanidine pod oksidativnim uvjetima. To su polimeri katehina, epikatehina i leukoantocijanidina te su najprisutniji polifenoli u drvenastim biljkama (Singla i sur., 2019).

Za razliku od ostalih flavonoida, antocijanidini imaju dvije dvostruke veze u heterocikličkom prstenu. Antocijanini su glikozilirani oblik antocijanidina. Broj vezanih šećera i hidroksilnih skupina pridonose raznolikosti antocijanina. Vezani šećeri su uglavnom monosaharidi, npr. glukoza, galaktoza i arabinoza. Glikozilirani antocijanini su vodotopljivi pigmenti prisutni u šarenom cvijeću i voću (Singla i sur., 2019).

U polifenole ubrajamo i neflavonoide kojima je osnova strukture jedan aromatski prsten, a to su fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Singla i sur., 2019).

Fenolne kiseline su najbrojnije među neflavonoidima, uglavnom se nalaze konjugirane s drugim polifenolima, glukozom, kininskom kiselinom ili strukturnim komponentama biljke. Dvije su glavne skupine fenolnih kiselina: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline, kao što su galna, *p*-hidroksibenzojeva i vanilinska kiselina, se mogu naći kao slobodne kiseline ili kao glikozidi, odnosno esteri. Hidroksicimetne kiseline u

svojoj strukturi imaju bočni lanac od tri ugljikova atoma, a najraširenije su kavena, ferulična te *p*-kumarinska kiselina (Singla i sur., 2019).

Sljedeća, relativno mala skupina neflavonoida, su stilbeni koje karakteriziraju dva fenila povezana metilenskom skupinom s dva ugljika. Stilbeni se uglavnom nalaze u glikoziliranom obliku, a jedan od najpoznatijih je resveratrol koji se nalazi grožđu, kikirikiju te bobičastom voću. Lignani su neflavonoidi s dvije fenilpropanske jedinice, u hrani se uglavnom nalaze u slobodnom obliku, a mogu se naći u mahunarkama, sjemenkama te biljnom ulju (Singla i sur., 2019).

## **1.2. UPALNE BOLESTI CRIJEVA**

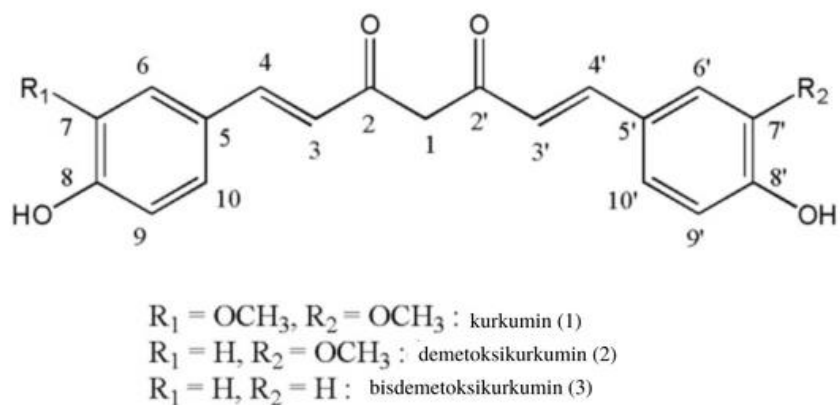
Upalne bolesti crijeva, Chronova bolest i ulcerozni kolitis, su kronične relapsirajuće bolesti koje pogađaju milijune ljudi diljem svijeta te narušavaju njihov svakodnevni život. Chronova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava od usta do anusa, ali najčešće ileum i cekum. Upalne promjene mogu biti u diskontinuitetu te upala zahvaća sve slojeve sluznice. Kod ulceroznog kolitisa je upala ograničena samo na sluznicu kolona i ne prodire toliko duboko u sluznicu crijeva. Uobičajeni simptomi su: nadutost, grčevi, bolovi u truhu, dijareja te gubitak tjelesne mase.

Etiologija upalnih bolesti crijeva je kompleksna, dolazi do prekomjerne aktivacije imunskog sustava i nepodnošenja endogene mikroflore što dovodi do oštećenja funkcije epitelnih stanica i aktivacije intestinalnog imunskog sustava. Izravnom interakcijom antigena (hrana, bakterije, virusi) sa stanicama imunskog sustava dolazi do aktivacije pomagačkih Th1 stanica koje se dodatno aktiviraju makrofagima te dolazi do lučenja proupalnih medijatora kao što su citokini, metaboliti arahidonske kiseline te faktori rasta. Upalni citokini (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2) i tvari koje posreduju kemotaksiju (IL-8, LTB-4) povećavaju migraciju makrofaga i neutrofila na mjesto upale te dolazi do pojačanja upalnog odgovora i ozljede tkiva.

Pacijenti s aktivnom upalnom bolešću crijeva su obično liječeni aminosalicilatima kao što je sulfasalazin, često uz dodatak kortikosteroida. Kako se proteklih godina otkrilo da su citokini ključne molekule zaslužne za pogoršanje i produženje upalnog stanja, tako je otkrivena i anti-citokinska terapija. Primjer takve terapije je anti-TNF protutijelo infliximab. Unatoč uspješnom liječenju Chronove bolesti infliximabom, postoji zabrinutost zbog nuspojava kao što su ozbiljne bakterijske infekcije te kožne reakcije (Hanai i Sugimoto, 2009).

### 1.2.1. Kurkumin u upalnim bolestima crijeva

Prema dostupnim literaturnim podacima kurkumin je učinkovit u smanjenju stvaranja proupalnih citokina na razini gena. Budući da je to prirodna tvar koja se godinama koristi u tradicionalnoj medicini, smatra se da bi terapija upalnih bolesti crijeva uz kurkumin mogla biti sigurnija i učinkovitija. Kurkumin je glavna komponenta kurkuminoida, prirodnih fenolnih spojeva koji se nalaze u rizomima kurkume (*Curcuma longa* Linn), a toj skupini spojeva pripadaju još demetoksikurkumin te bisdemetoksikurkumin čije su strukture prikazane na Slici 2. Kurkuminoidi pokazuju antioksidativni, protupalni, antikancerogeni, hipoglikemijski te hipokolesterolemijski učinak.



Slika 2. Struktura kurkuminoida (preuzeto i prilagođeno prema Burapan i sur., 2020)

Za upalne bolesti crijeva najvažniji je protuupalni učinak kurkumina koji se ostvaruje inhibicijom NF- $\kappa$ B, transkripcijskog faktora čija aktivacija dovodi do pojačane transkripcije gena za proupalne citokine. Zbog toga bi NF- $\kappa$ B trebao biti glavna meta lijekova u liječenju upalnih bolesti crijeva. Nadalje, kurkumin inhibira i ostale medijatore koji sudjeluju u upalnom odgovoru kao što su ciklooksigenaze 1 i 2 (COX-1 i COX-2), lipooksigenaze (LOX), faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS) i dr. Zbog takvog mehanizma djelovanja, kurkumin ima potencijal kao novi lijek u liječenju upalnih bolesti crijeva. Kao dokaz za to, važna je pilot studija koju je proveo Holt sa suradnicama. U studiji je sudjelovalo 5 pacijenata oboljelo od Chronove bolesti i 5 pacijenata s ulceroznim kolitisom. Cilj je bio ispitati učinak dodatka kurkumina redovnoj terapiji tako da dovodi do smanjenja upale, simptoma bolesti te doze lijekova redovne terapije. Svakom

pacijentu je dano 360 mg kurkumina oralno tri puta na dan tijekom prvog mjeseca, a potom četiri puta na dan iduća dva mjeseca. Od 10 pacijenata, kod njih 9 je došlo do imunološkog i simptomatskog poboljšanja, a kod 4 od 5 pacijenata s ulceroznim kolitisom je ili smanjena ili uklonjena redovna terapija (Holt i sur., 2005)

U liječenju oboljelih vrlo su važni postupci uz koje se mogu izbjeći relapsi bolesti jer se na taj način smanjuje smrtnost povezana s relapsima, a posljedično se smanjuju i medicinski troškovi. Stoga je važno randomizirano, dvostruko slijepo multicentrično ispitivanje koje je proveo Hanai sa suradnicima. U toj je studiji, koja je trajala 6 mjeseci, sudjelovalo 89 pacijenata s ulceroznim kolitisom u remisiji od čega je njih 45 dobivalo 1 g kurkumina dva puta na dan uz sulfasalazin ili mesalazin kao redovnu terapiju, a ostali pacijenti (n=44) su dobivali placebo umjesto kurkumina. Sedam pacijenata je bilo isključeno iz ispitivanja, stoga su rezultati pokazali slijedeće: od 43 pacijenata koji su dobivali kurkumin, 2 je doživjelo relaps, a od 39 pacijenata koji su dobivali placebo, 8 je doživjelo relaps. U idućih 6 mjeseci ispitanici nisu više dobivali kurkumin pa se kod 8 dodatnih pacijenata, koji su bili u grupi koja je dobivala kurkumin, javio relaps dok se u placebo grupi još u 6 dodatnih slučajeva javio relaps. Zaključak je da kurkumin pomaže u smanjivanju simptoma aktivne bolesti i održavanju remisije (Hanai i Sugimoto, 2009).

### **1.2.2. Andrografolidi**

Biljka justicija, *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wall. Ex Nees, *Anthaceae*, se dugo koristi u azijskoj tradicionalnoj medicini, a njezini listovi sadrže brojne bioaktivne tvari kao što su diterpenskilaktoni (deoksiandrografolid, andrografolid, neoandrografolid i 14-deoksi-11, 12-didehidroandrografolid), diterpenski glukozi i flavonoidi. Glavna aktivna tvar, andrografolid, pokazuje antioksidativno, antivirusno, antitrombotsko, hepatoprotektivno te protuupalno djelovanje. Zbog takvih učinaka, andrografolid se može koristiti u liječenju upalnih bolesti crijeva (Mussard i sur., 2019; Wang i sur., 2021).

### **1.2.3. Bosvelične kiseline**

Bosvelične kiseline su pentacikličke triterpenske kiseline koje se mogu naći u smoli indijskog tamjanovca (*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr., *Burseraceae*). Neke od njih su  $\alpha$ - i  $\beta$ -bosvelične kiseline (BA), acilirane  $\alpha$ - i  $\beta$ -bosvelične kiseline (ABA), 11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina (KBA) i 3-O-acetil-11-keto- $\beta$ -bosvelična kiselina (AKBA). Mete njihovog djelovanja su molekule koje su odgovorne za upalne procese, primjerice: lipooksigenaze, transkripcijski

faktor NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ . Zbog toga su se pokazale kao učinkovite ljekovite tvari u brojnim kroničnim bolestima pa tako i u upalnim bolestima crijeva (Roy i sur., 2019).

### 1.3. ANTIOKSIDANSI

Organske molekule koje se nalaze u kisikom bogatoj atmosferi, podložne su procesu autooksidacije zbog prisutnosti slobodnih radikala. Dakle, autooksidacija je inicirana prisutnošću radikala ( $X^{\bullet}$ ) koji reagira sa supstratom (RH) uzimajući vodik pri čemu nastaje alkilni radikal ( $R^{\bullet}$ ). Alkilni radikal zatim reagira s kisikom te nastaje peroksilni radikal ( $ROO^{\bullet}$ ) koji napada drugu molekulu supstrata dajući hidroperoksid ROOH i još jednu molekulu radikala čime se uspostavlja lančana reakcija. Lančana reakcija se ponavlja kroz više ciklusa (propagacija) prije nego što se dva radikala susretnu i ugase (terminacija). Molekule koje podliježu autooksidaciji su uglavnom zasićeni i nezasićeni ugljikovodici, u biološkim sustavima to su uglavnom lipidi, proteini te ugljikohidrati. Stoga su važni antioksidansi, tvari koje, kad se dodaju oksidirajućoj molekuli u maloj količini, mogu zaštititi takve molekule na način da odgađaju, usporavaju ili inhibiraju njihovu autooksidaciju (Amorati i Valgimigli, 2015).

#### 1.3.1. Podjela antioksidansa

Prirodni fenolni spojevi iz biljaka posjeduju antioksidativnu aktivnost što je potvrđeno u brojnim *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima. Antioksidanse možemo podijeliti na primarne i sekundarne. Fenolni spojevi kao primarni antioksidansi aktivno inhibiraju oksidacijske reakcije predajom jednog vodika (engl. *hydrogen-atom transfer*, HAT) ili jednog elektrona (engl. *single-electron transfer*, SAT), a ta se dva procesa mogu odvijati i zajedno (engl. *sequential proton-loss electron transfer*, SPLET ili *proton-coupled electron transfer*, PCET). Kao sekundarni antioksidansi, fenolni spojevi ne djeluju direktno na oksidativne vrste, već reagiraju s pro-oksidansima ili su u stanju hvatati kisik (Amarowicz i Pegg, 2019).

### 1.3.2. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

Od druge polovice 20. stoljeća raste interes za antioksidansima zbog spoznaje o važnosti radikalima posredovanih reakcija u biologiji, uloge vitamina E i C te ostalih dijetetskih antioksidansa u zaštiti biomolekula te zbog pojave teorija koje dovode u vezu razne bolesti i oksidativni stres. Zbog toga su razvijene brojne metode za određivanje antioksidativne aktivnosti, a relativno jednostavne za izvođenje su one koje koriste zamke slobodnih radikala (Amorati i Valgimigli, 2015).

Kod ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina)] metode je stabilni slobodni radikal (ABTS<sup>+</sup>) pripremljen uz pomoć kalijevog presulfata, a nastala otopina je plavo-zelene boje. Obezbojenjem nastale otopine se prati antioksidativna aktivnost flavonoida i drugih polifenola pri čemu oni djeluju kao elektron donori. ABTS metoda je, isto kao i DPPH metoda, jednostavna za korištenje, ima visoku osjetljivost te omogućuje brzu analizu antioksidativne aktivnosti velikog broja uzoraka (Ak i Gulcin, 2008).

ORAC (*eng. Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda kao generator peroksilnih radikala koristi AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorid], a inhibicija aktivnosti slobodnih radikala, koja se odvija HAT reakcijom antioksidansa, se mjeri korištenjem fluorescentnih spojeva kao što su B-fikoeritrin, R-fikoeritrin ili fluorescein (Plank i sur., 2011).

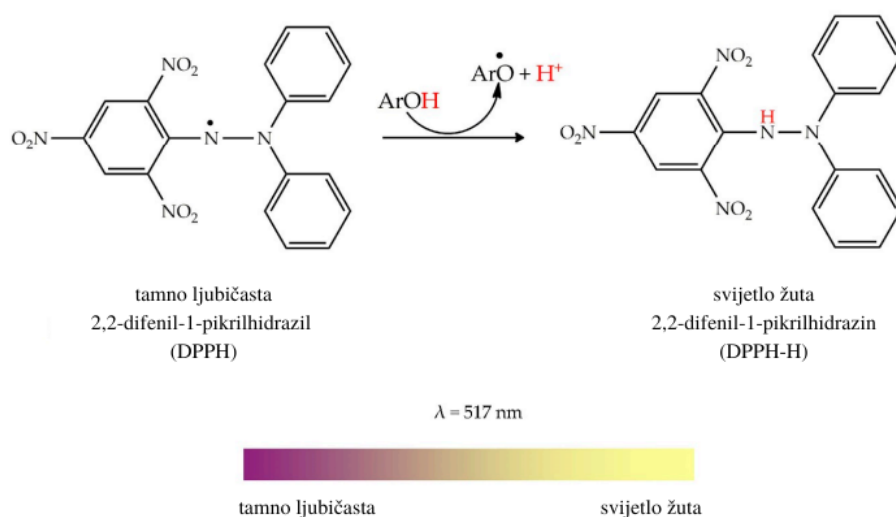
FRAP (*eng. Ferric reducing antioxidant power*) metoda pokazuje antioksidativnu aktivnost određene komponente redukcijom kompleksa Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (željezo[III]-2,4,6-tripiridil-S-triazin) u Fe<sup>2+</sup>-TPTZ što se odvija SET mehanizmom. Rezultat reakcije je intenzivna plava boja (Amarowicz i Pegg, 2019).

CUPRAC (*eng. Cupric reducing antioxidant capacity*) metoda uključuje redukciju bakrenih iona Cu<sup>2+</sup> u prisutnosti neokuproina (NC) pri čemu nastaje plavo obojani kompleks Cu(I)-NC. Redoks reakcije s bakrom su brže od onih sa željezom (Amarowicz i Pegg, 2019).

Metoda s β-karotenom i linolnom kiselinom se odvija u emulziji gdje slobodni radikali linolne kiseline napadaju visoko nezasićene molekule β-karotena pri čemu nestaje karakteristična narančasta boja emulzije. Fenolni antioksidansi mogu spriječiti uništavanje β-karotena neutralizacijom slobodnih radikala linolne kiseline. Postupak se prati spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije uzorka na 470 nm (Amarowicz i Pegg, 2019).

### 1.3.2.1. DPPH

DPPH spektrofotometrijska metoda se često koristi za procjenu učinkovitosti različitih antioksidativnih tvari pri uklanjanju slobodnih radikala. Kao reagens se koristi slobodni stabilni radikal 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) ljubičaste boje. Antioksidansi reduciraju DPPH radikal tako što DPPH<sup>\*</sup> prihvaća elektron ili vodik pri čemu nastaje stabilni reducirani oblik molekule DPPH ili DPPH-H te žuto obojenje otopine. DPPH radikal apsorbira na 517 nm, ali kad je vodikov atom ili elektron prenesen na neparni elektron DPPH radikala, apsorbancija na 517 nm se proporcionalno smanjuje kako se povećava količina neradikalnog oblika DPPH-H (Ak i Gulcin, 2008). HAT mehanizam reakcije je prikazan na Slici 3.



Slika 3. HAT reakcija DPPH radikala s antioksidansom (preuzeto i prilagođeno prema Bibi Sadeer i sur., 2020)

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**



Na tržištu se pojavljuje sve veći broj dodataka prehrani koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva, a sadrže biljne droge: kurkumu, justiciju i indijski tamjanovac. Navedene biljne droge predstavljaju važan izvor polifenola, a te biološki aktivne tvari smanjuju upalne procese koji su izraženi u upalnim bolestima crijeva te tako pridonose poboljšanju prilikom akutne faze bolesti i održavanju remisije. Iz tih razloga cilj ovog diplomskog rada je bio:

- (i) odrediti sadržaj ukupnih polifenola i procijeniti kvalitetu ispitivanih dodataka prehrani koji sadrže kurkumu, justiciju i indijski tamjanovac,
- (ii) odrediti antioksidativnu aktivnost istih,
- (iii) korelirati ukupni sadržaj polifenola u analiziranim dodacima prehrani i njihovu antioksidativnu aktivnost i utvrditi njihovu moguću povezanost te
- (iv) usporediti ukupni sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost prikupljenih dodataka prehrani s dostupnim literaturnim podacima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. MATERIJALI**

#### **3.1.1. Uzorci**

Za ispitivanje sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti u uzorcima koji sadrže: indijski tamjanovac, justiciju i/ili kurkumu kao biljne droge prikupljeno je 14 uzoraka. Kao zemlja porijekla navedeno je 6 država, osim za jedan uzorak kod kojeg nije navedena zemlja porijekla. Uzorci su prikupljeni u trgovinama zdravom prehranom ili putem internet trgovine, a njihov popis i opis prikazan je u Tablici 1. Prema postupcima pripreme, prikupljeni uzorci su podijeljeni kao suhi ekstrakt, biljna droga te usitnjena biljna droga.

#### **3.1.2. Kemikalije**

- Folin-Ciocalteu reagens (Carlo Erba Reagents, Njemačka)
- Galna kiselina, certificirani referentni materijal, TraceCERT (FlukaAnalytical, Švicarska)
- Metanol (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Natrijev karbonat (BDH PROLABO, Ujedinjena Kraljevina)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH, slobodni radikal, 95% (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, Trolox (Sigma-Aldrich, Švicarska)

#### **3.1.3. Radni instrumenti**

- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)
- UV-VIS spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka)
- Analizator vlage KERN DBS60-3 (Kern&Sohn, Balingen, Germany)

#### **3.1.4. Pribor**

- Automatske jednokratne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Centrifuga IKA MINI G S000 (Ika, Njemačka)
- Grijalica/mješalica Ika C-MAG HS 7 (Ika-Werke GMBH&CO KG, Njemačka)
- Kvarcna kiveta za UV-VIS spektrofotometar volumena 3,5 mL i duljine optičkog puta 10 mm (PerkinElmer, Waltham, SAD)
- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Tresilica LLG-uniTEXER 1, EU-plug (LLG Labware, Njemačka)

- Aluminijska posudica za vaganje na analizatoru vlage (Kern&Sohn, Balingen, Njemačka)

### **3.1.5. Programski paketi**

- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD)
- ChemSketch (ACD Inc, SAD)

Tablica 1. Popis uzoraka

<b>Redni broj</b>	<b>Naziv proizvoda</b>	<b>Vrsta uzorka</b>	<b>Dozirni oblik</b>	<b>Zemlja porijekla</b>	<b>Način nabave</b>	<b>Opis uzorka</b>
1	Maple Life Sciences Curcumin + Boswellia + Piperine powder	suhi ekstrakt	rinfuza	Indija	internetska trgovina	kurkumin (200 mg, standardiziran na 95 % kurkuminoida), ekstrakt indijskog tamjanovca (192 mg, standardiziran na 65 % bosveličnih kiselina), ekstrakt crnog papra (8 mg, standardiziran na 95 % piperina)
2	Maple Life Sciences - Piperine/ black pepper extract powder	suhi ekstrakt	rinfuza	Indija	internetska trgovina	standardiziran na min. 95 % piperina
3	Bio & Bio Superfoods Kurkuma Prah	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom hranom	organski uzgojena kurkuma
4	Lebensbaum Kurkuma (Gelbwurz)	usitnjena biljna droga	rinfuza	Njemačka	trgovina zdravom hranom	100 % organski uzgojena kurkuma
5	Harissa Kurkuma prah bio	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom hranom	usitnjeni podanak kurkume
6	Harissa Kurkuma prah	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom hranom	usitnjeni podanak kurkume
7	Kotany Kurkuma mljevena	usitnjena biljna droga	rinfuza	Austrija	trgovina zdravom hranom	usitnjena kurkuma
8	Only Nature kurkuma prah	usitnjena biljna droga	rinfuza	Hrvatska	trgovina zdravom hranom	usitnjena kurkuma

9	Maple Life Sciences Boswellia serata 400 mg	suhi ekstrakt	rinfuza	Indija	internetska trgovina	minimalno 60 % bosveličnih kiselina
10	You Herb It Indian Frankincense Resin Tears	biljna droga	sirovi materijal	Grčka	internetska trgovina	smola indijskog tamjanovca
11	Supplyist Frankincense Resin – Boswellia Tears Gum – Olibanum Aromatic Incense	biljna droga	rinfuza	Turska	internetska trgovina	smola indijskog tamjanovca
12	Sapiens Store Boswellia Resin	biljna droga	rinfuza	nije navedeno	internetska trgovina	smola indijskog tamjanovca
13	Maple Life Sciences – organic Andrographis Paniculata Leaves Powder	usitnjena biljna droga	rinfuza	Indija	internetska trgovina	justicija
14	Herba Diet – Organic Andrographis Paniculata Leaf Powder	usitnjena biljna droga	rinfuza	Indija	internetska trgovina	justicija

## **3.2. METODE**

Ukupni polifenoli u dodacima prehrani za liječenje upalne bolesti crijeva određeni su primjenom UV-VIS spektrofotometrije i Folin-Ciocalteu reagensa. Analiti su iz uzorka ekstrahirani primjenom ekstrakcije čvrsto-tekuće. Nakon postupka ekstrakcije i određivanja sadržaja ukupnih polifenola, ispitana je antioksidativna aktivnost analiziranih dodataka prehrani primjenom DPPH metode.

### **3.2.1. Priprema standardnih otopina**

Standardna otopina galne kiseline pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase spoja u 80%-tnom metanolu (80:20, vol/vol) (koncentracija 2 mg/mL).

Nakon toga prikladnim razrjeđivanjem pripremljen je niz radnih otopina za izradu kalibracijske krivulje galne kiseline, a koncentracije su iznosile 20, 40, 60, 80 i 120 µg/mL.

Folin-Ciocalteu reagens pripravljen je razrjeđivanjem s ultračistom vodom u omjeru 1:10 neposredno prije uporabe.

Natrijev karbonat pripravljen je kao 10%-tna otopina u ultračistoj vodi.

Radne otopine za izradu Trolox-a, pripravljene su otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u 80%-tnom metanolu (80:20, vol/vol) (koncentracija 1 mmol/L). Koncentracije osam radnih otopina Trolox-a iznosile su redom 0,005, 0,010, 0,015, 0,020, 0,025, 0,030, 0,035 i 0,040 mmol/L.

DPPH otopina pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase krute tvari u metanolu korištenjem tamne odmjerne tikvice klase A (c=1 mmol/L).

### **3.2.2. Ekstrakcija polifenola**

U Falcon epruvetu od 15 mL odvagana je prikladna masa uzorka ( $25 \pm 2$ ) te dodano 10 mL smjese metanol: ultračista voda (80:20, vol/vol). Potom su uzorci postavljeni u ultrazvučnu kupelj Elmasonic X-tra (Elma, Singen, Njemačka) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, centrifugiranjem (Hermle Z 306, Wehingen, Njemačka) na 3000 g 10 minuta pri 25 °C dobivena je bistra otopina. Prije same analize, supernatant je filtriran kroz Chromafil membranski filter veličine pora 0,45 µm (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

### **3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola**

Koncentracija ukupnih polifenola u dodacima prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva određena je Folin-Ciocalteuovom kolorimetrijskom metodom. Ukratko, u odmjernu tikvicu klase A (5 mL) odpipetira se određeni volumen (0,1 – 1,0 mL) prethodno pripremljenog

metanolnog ekstrakta te razrijedi ultračistom vodom do 1,5 mL. Zatim se u istu odmjernu tikvicu otpipetira 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa, malo promućka, a nakon 3 min doda 1,5 mL 10%-tne otopine natrijeva karbonata. Tako dobivena smjesa se dobro promućka i nadopuni ultračistom vodom do oznake te ostavi na tamno mjesto. Nakon inkubacije od 2 sata pri sobnoj temperaturi, apsorbancija uzorka mjeri se pri valnoj duljini 725 nm. Slijepa proba se izradi prema propisu, pri čemu se umjesto metanolnog ekstrakta odpipetira isti volumen 80%-tnog metanola (80:20, vol/vol).

Količina ukupnih polifenola izrazi se kao mg ekvivalenta galne kiseline po g uzorka. Određivanje je provedeno u triplicatu.

#### **3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom**

Sposobnost dodataka prehrani za upalne bolesti crijeva u „hvatanju“ stabilnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) procijenjena je metodom Singleton i sur. (1999), s malim modifikacijama. Ukratko, u odmjernu tikvicu klase A (5 mL) odpipetira se određeni volumen (0,1 – 4,5 mL) metanolnog ekstrakta (80% metanol, 80:20, vol/vol), zatim dodati 0,5 ml DPPH otopine (1 mM) te dopuni do oznake. Smjesa se promiješa 15 s i ostavi na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta, apsorbancija otopine očitana je spektrofotometrijski pri  $\lambda_{max}=517$  nm uz 0,5 mL metanola i do 5 mL 80%-tnog metanola (80:20, vol/vol) kao slijepu probu.

Antioksidativna aktivnost određenja je iz kalibracijske krivulje standarda Trolox-a, a rezultati izraženi kao mmol ekvivalenta Trolox-a/g uzorka.

#### **3.2.5. Određivanje gubitka sušenjem analizatorom vlage**

U ispitivanim uzorcima provedeno je određivanje vlage prema propisu Američke Farmakopeje. Ispitivana tvar se ravnomjerno i u što tanjem sloju rasporedi na aluminijsku posudicu te se odvaži oko 1,000 g tvari na vagi koja je integrirana u analizator vlage. Zatvori se poklopac, a halogeni grijač zagrijava i suši uzorak na temperaturi od 105 °C. Integrirana vaga cijelo vrijeme bilježi masu uzorka. U trenutku kad uzorak počne pokazivati stalnu masu, uređaj se automatski ugasi te se izračuna i prikaže udio gubitka mase sušenjem. Mjerenja su provedena u triplicatu.

#### **3.2.6. Statistička analiza**

Obradom dobivenih podataka za sve je varijable provedena analiza normalnosti raspodjele. Varijable s normalnom raspodjelom prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Kako bi se ispitala razina povezanosti između pojedinih varijabli, korišten je



Pearsonov koeficijent korelacije. P-vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom, a p-vrijednost manja od 0,01 visoko značajnom. Za obradu svih podataka korišten je statistički paket STATISTICA v. 12.1 od StatSoft® (Tulsa, OK, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

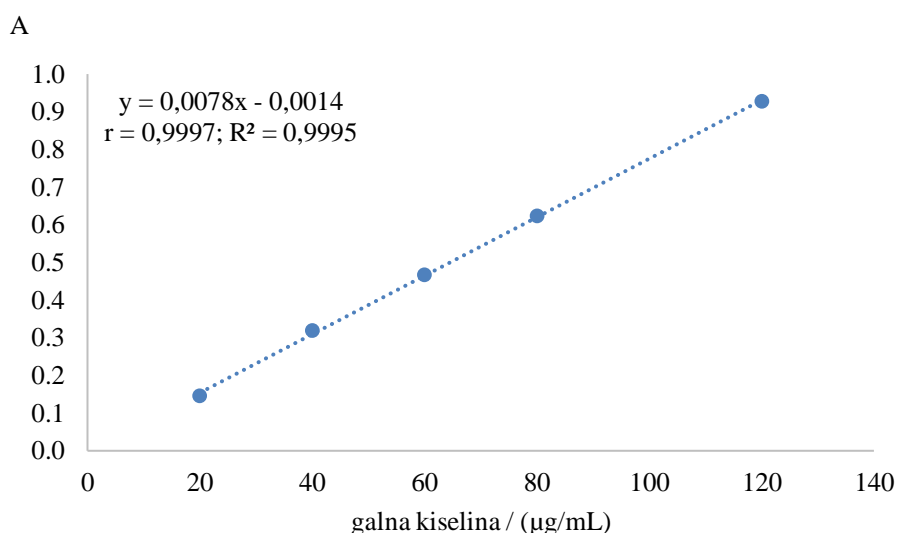
#### 4.1. SADRŽAJ VLAGE

Gubitak sušenjem u ispitivanim uzorcima određen je termogravimetrijskom metodom, a dobiveni rezultati kretali su se u rasponu od 1,75 % (uzorak 1) do 8,65 % (uzorak 4) (SD: 0,06 (uzorak 9 i 14) do 1,35 % (uzorak 12)).

Multipretarat kurkume, indijskog tamjanovca i crnog papra imao je najmanji udio vlage (1,75 %). Kada se promatraju svi monopreparati, najviše vrijednosti (srednja vrijednost: 8,02 %) uočene su kod preparata kurkume, dok je niži sadržaj vlage utvrđen kod preparata justicije (dva uzorka: 7,63 % i 6,13 %), papra (jedan uzorak: 5,15 %) te najniže vrijednosti su dobivene za monopreparate indijskog tamjanovca (srednja vrijednosti: 2,82 %). Sadržaj vlage određen u prikupljenim uzorcima korišten je za izražavanje vrijednosti na suhu tvar.

#### 4.2. SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI

Analizirani su dodaci prehrani koji sadrže kurkumu, justiciju i indijski tamjanovac, a polifenolne sastavnice ekstrahirane su smjesom metanol: ultračista voda (80:20, vol/vol). Potom je ukupni sadržaj polifenola određen na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka uporabom kalibracijske krivulje standarda galne kiseline. Rezultati su izraženi kao mg galne kiseline po g suhe tvari uzorka. Kalibracijska krivulja, prikazana na Slici 4, izrađena je pomoću otopina: galna kiselina (2 mg/mL) u 80%-tnom metanolu, 10%-tna vodena otopina natrijevog karbonata i razrijeđeni Folin-Ciocalteu reagens.



Slika 4. Kalibracijska krivulja standarda galne kiseline za određivanje ukupnih polifenola predloženom metodom

Funkcionalnost ispitivanih dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva procijenjena je s obzirom na ukupan sadržaj polifenola. U uzorcima dodataka prehrani, kojima je određen ukupni sadržaj polifenola, dobiveni rezultati su izraženi kao ekvivalent galne kiseline (GAE). Rezultati su se kretali u intervalu od 5,56 (uzorak 9) do 409,42 (uzorak 1) mg GAE /g suhe tvari što je prikazano u Tablici 2. Ukupni sadržaj polifenola uzorka 1 značajno je viši nego u ostalim uzorcima što je razumljivo budući da taj uzorak sadrži biološki aktivne sastavnice više biljnih droga (kurkumin, ekstrakt indijskog tamjanovca i crnog papra), dok su ostali analizirani uzorci klasificirani kao monopreparati.

Tablica 2. Ukupni sadržaj polifenola u ispitivanim dodacima prehrani

Uzorak	Vrsta preparata / biljna droga	Ukupni sadržaj polifenola (mg GAE / g suhe tvari)	RSD <sup>1</sup> (%)
1	multipleparat: kurkuma, indijski tamjanovac, crni papar	409,42	0,82
2	monopreparat / crni papar	20,91	0,78
3	monopreparat / kurkuma	80,62	0,70
4	monopreparat / kurkuma	82,32	0,18
5	monopreparat / kurkuma	85,08	0,37
6	monopreparat / kurkuma	75,07	0,65
7	monopreparat / kurkuma	70,04	0,57
8	monopreparat / kurkuma	66,41	0,42
9	monopreparat / indijski tamjanovac	5,56	0,16
10	monopreparat / indijski tamjanovac	11,35	0,81
11	monopreparat / indijski tamjanovac	10,41	1,31
12	monopreparat / indijski tamjanovac	10,59	0,97
13	monopreparat / justicija	22,67	1,02
14	monopreparat / justicija	30,02	0,65

RSD<sup>1</sup>- Relativna standardna devijacija

Pregledom dostupne znanstvene i stručne literature, utvrđen je nedostatak podataka o ukupnom sadržaju polifenola u dodacima prehrani koji sadrže kurkumu, indijski tamjanovac te justiciju. Kada se pogleda Tablica 2. sadržaj ukupnih polifenola u šest monopreparata kurkume bio je u rasponu od 66,41 (uzorak 8) do 85,08 (uzorak 5) mg GAE / g suhe tvari, a srednja vrijednost svih uzoraka iznosila je 76,59 mg GAE / g suhe tvari.

Rezultati dobiveni u ovom radu mogu se usporediti s rezultatima Tanvir i sur. (2017) koji su određivali ukupni sadržaj polifenola u etanolnim ekstraktima *Curcume longae* ( $6,15 \pm 0,255$  g GAE/ 100g do  $8,97 \pm 0,146$  g GAE/ 100 g).

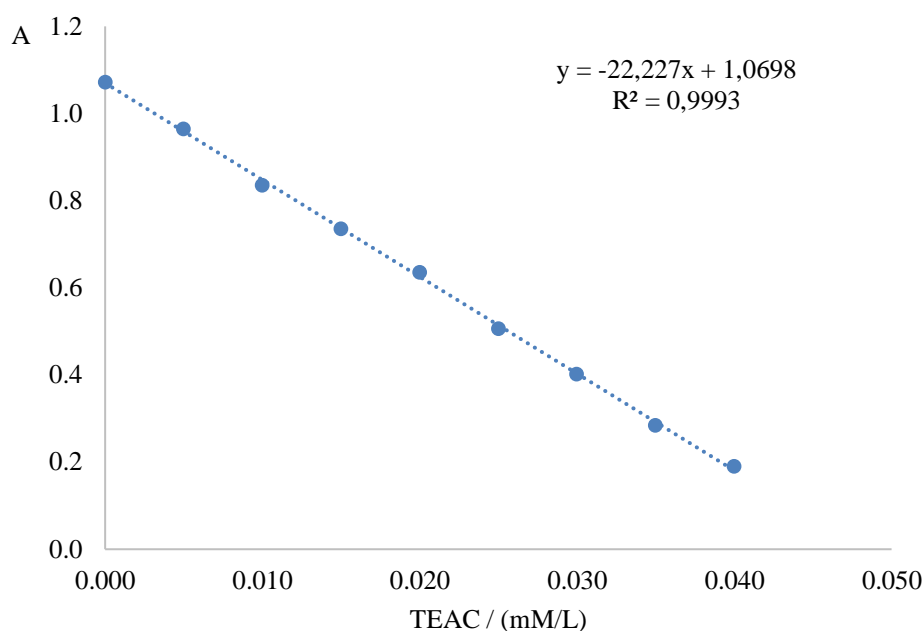
Gomaa i sur. (2019) su u svom radu određivali ukupni sadržaj polifenola u etanolnom ekstraktu smole indijskog tamjanovca (*Boswellia serrata*), a dobivene vrijednosti ( $25,84 \pm 2,59$  µg GAE/mg) su više od onih dobivenih u ovom radu (srednja vrijednost četiri uzorka: 9,48 mg GAE/g suhe tvari. Sadržaj polifenola u dodacima prehrani klasificirani kao monopreparati smole indijskog tamjanovca imali su niži sadržaj ovih biološki aktivnih tvari te uži raspon (od 5,56 (uzorak 9) do 11,35 (uzorak 10)) nego monopreparati kurkume.

Nadalje, Natania i Haniel (2020) su u svom radu ispitali ukupni sadržaj polifenola u ekstraktima justicije (*Andrographis paniculata*) i dobiveni rezultati su se kretali od  $118.73 \pm 10.25$  do  $159.40 \pm 6.10$  mg GAE/ g ekstrakta što su znatno više vrijednosti od dobivenih za dva uzorka u ovom radu: 22,674 mg GAE/g suhe tvari (uzorak 13) i 30,020 (uzorak 14) mg GAE/g suhe tvari.

#### **4.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DODATAKA PREHRANI**

Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određena je DPPH metodom. Ukratko, metoda se temelji na činjenici da se kao reagens koristi slobodni radikal ljubičaste boje DPPH<sup>•</sup>. Antioksidansi iz uzorka dodatka prehrani (polifenoli) reduciraju taj radikal donirajući vodik pri čemu nastaje stabilni reducirani oblik molekule DPPH-H žute boje. Pri tome se mjeri apsorbancija na 517 nm, a smanjenje izmjerenih vrijednosti apsorbancija je proporcionalno količini antioksidansa u ispitivanim dodacima prehrani.

Korištenjem kalibracijske krivulje standarda Trolox-a, određena je ukupna antioksidativna aktivnost dodataka prehrani. Za izradu kalibracijske krivulje korištene su radne otopine Trolox-a rastućih koncentracija od 0,005 do 0,040 mM. Na Slici 5. prikazana je kalibracijska krivulja te koeficijent korelacije ( $r = -0,9997$ ) koji upućuje na zadovoljavajuću linearnost same metode.



Slika 5. Kalibracijska krivulja standarda Trolox-a dobivena spektrofotometrijskom metodom za određivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH metoda)

Određena je antioksidativne aktivnosti 14 dodataka prehrani kojima je prethodno određen ukupni sadržaj polifenola što je opisano u poglavlju 4.2. Dobiveni rezultati ukazuju na varijabilnost antioksidativne aktivnosti pojedinih uzoraka ovisno o ukupnom sadržaju polifenola, a izraženi su kao ekvivalenti Troloxa-a (TEAC). Dobiveni rezultati kretali su se od 0,932 (uzorak 9) do 110,11 (uzorak 1) mM TEAC/g suhe tvari uzorka (Tablica 3).

Usporedbu rezultata ovog rada te rada drugih autora u kojima je korištena DPPH metoda teško je izvršiti zbog razlike u pripremi uzoraka, primjerice zbog primjene različitih ekstrakcijskih otapala, te načinu izražavanja rezultata. Za izražavanje rezultata antioksidativne aktivnosti, autori su uglavnom rezultate prikazivali u obliku  $IC_{50}$  što se definira kao koncentracija tvari s antioksidativnim djelovanjem potrebna za 50%-tno smanjenje početne vrijednosti DPPH slobodnog radikala.

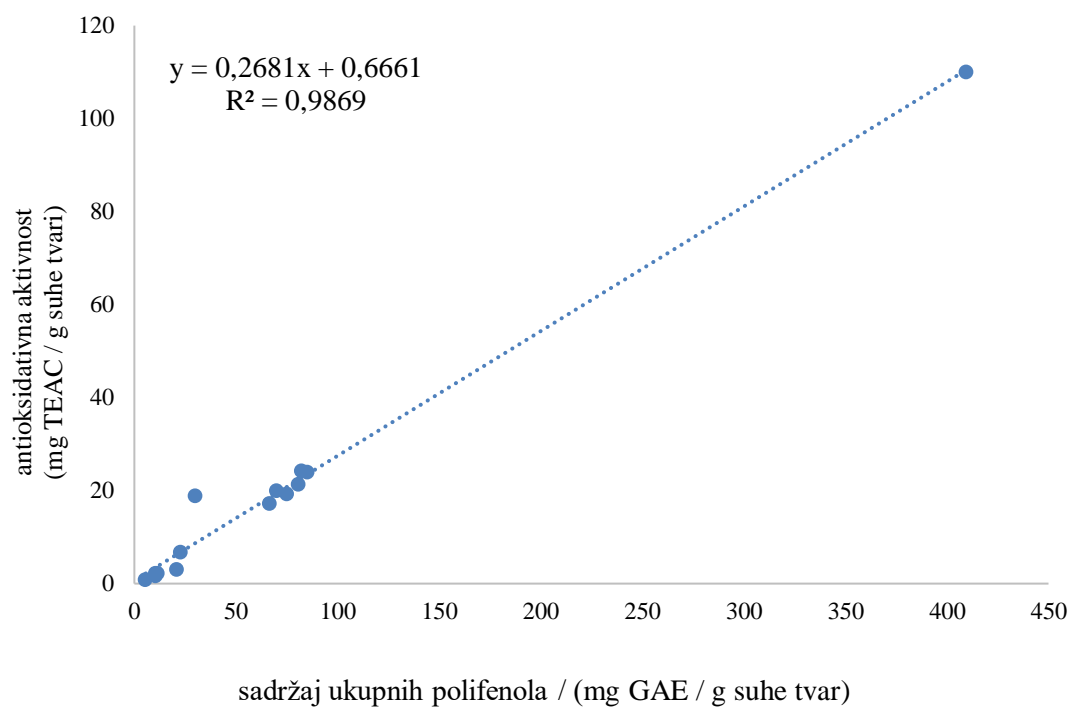
Beghelli i sur. (2017) su ispitivali antioksidativnu aktivnost ekstrakta indijskog tamjanovca (*Boswillia serrata*) DPPH metodom te, osim što su rezultate izrazili pomoću  $IC_{50}$ , izrazili su ih i kao ekvivalente Trolox-a za sedam ekstrakata, a te vrijednosti se kreću od 1,85 - 31,8  $\mu\text{mol TE/g}$ .

Tablica 3. Antioksidativna aktivnost dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Uzorak	Vrsta preparata / biljna droga	Antioksidativna aktivnost (mg TEAC / g suhe tvari)	RSD <sup>1</sup> (%)
1	multi-preparat: kurkuma, ekstrakt indijskog tamjanovca, ekstrakt crnog papra	110,11	0,38
2	monopreparat / crni papar	3,118	0,15
3	monopreparat / kurkuma	21,41	0,71
4	monopreparat / kurkuma	24,22	0,48
5	monopreparat / kurkuma	24,01	0,09
6	monopreparat / kurkuma	19,27	1,66
7	monopreparat / kurkuma	20,06	0,80
8	monopreparat / kurkuma	17,29	0,40
9	monopreparat / smola indijskog tamjanovca	0,932	1,47
10	monopreparat / smola indijskog tamjanovca	2,247	0,35
11	monopreparat / smola indijskog tamjanovca	1,637	0,60
12	monopreparat / smola indijskog tamjanovca	2,197	0,16
13	monopreparat justicija	6,780	0,02
14	monopreparat justicija	18,92	0,16

RSD<sup>1</sup>- Relativna standardna devijacija

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu, može se vidjeti da se u dodacima prehrani koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva nalazi znatna količina polifenola, a antioksidativna aktivnost je proporcionalna sadržaju ovih sekundarnih metabolita ( $r=0,9934$ ) (Slika 6).



Slika 6. Graf korelacije ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti u dodacima prehrani koji sadrže kurkumu, justiciju i indijski tamjanovac



## **5. ZAKLJUČAK**

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

1. Analizirani dodaci prehrani koji sadrže kurkumu, justiciju i indijski tamjanovac mogu su se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica.
2. Sadržaj polifenola značajno je bio veći u jednom multipreparatu tri biljne vrste: kurkuma, indijski tamjanovac i crni papar nego u ostalim monopreparatima.
3. Sadržaj ovih biološki aktivnih tvari u monopreparatima kurkume bio je veći nego kod ostalih analiziranih monopreparata justicije, indijskog tamjanovca i crnog papra.
4. Antioksidativna aktivnost ispitivanih dodataka prehrani je u skladu sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica.
5. Korištene spektrofotometrijske metode su učinkovite te prikladne za rutinske analize dodataka prehrani.
6. Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti i pojedinih sastavnica polifenola primjenom drugih metoda.

## **6. LITERATURA**

Ak T, Gülçin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem-Biol Interact*, 2008, 174 (1), 27-37.

Amarowicz R, Pegg RB. Natural antioxidants of plant origin. *Adv Food Nutr Res*, 2019, 90, 1-81.

Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Res*, 2015, 49 (5), 633-649.

Beghelli D, Isani G, Roncada P, Andreani G, Bistoni O, Bertocchi M, Lupidi G, Alunno A. Antioxidant and ex vivo immune system regulatory properties of *Boswellia serrata* extracts. *Oxid Med Cell Longevity*, 2017, 2017:7468064.

Bibi Sadeer N, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The versatility of antioxidant assays in food science and safety — Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 2020, 9 (8), 709.

Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 2016, 21 (7), 901.

Burapan S, Kim M, Paisooksantivatana Y, Eser BE, Han J. Thai curcuma species: antioxidant and bioactive compounds. *Foods*, 2020, 9 (9), 1219.

Gomaa AA, Makboul RM, Al-Mokhtar MA, Nicola MA. Polyphenol-rich *Boswellia serrata* gum prevents cognitive impairment and insulin resistance of diabetic rats through inhibition of GSK3 $\beta$  activity, oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109,281-292.

Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (3), 686.

Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des*, 2009, 15 (18), 2087-2094.

Holt PR, Katz S, Kirshoff R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. *Dig Dis Sci*, 2005, 50 (11), 2191-2193.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(5), 727-747.

Mussard E, Cesaro A, Lespessailles E, Legrain B, Berteina-Raboin S, Toumi H. Andrographolide, a natural antioxidant: an update. *Antioxidants*, 2019, 8(12), 571.

Natania, K. and Haniel, K. Bitterness reduction of Green Chiretta (*Andrographis paniculata*) leaves and its functionality. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*, 2021.

Roy NK, Parama D, Banik K, Bordoloi D, Devi AK, Thakur KK, Padmavathi G, Shakibaei M, Fan L, Sethi G, Kunnumakkara AB. An update on pharmacological potential of boswellic acids against chronic diseases. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (17), 4101.

Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, Haddad MA, Al-Hiary M. Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *J AOAC Int*, 2019, 102 (5), 1397-1400.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent, *Meth Enzymol*, 1999, 299, 152–178.

Tanvir, EM, Hossen M, Hossain M, Afroz R, Gan SH, Khalil M, Karim N. Antioxidant properties of popular turmeric (*Curcuma longa*) varieties from Bangladesh. *J Food Qual*, 2017.

Wang DW, Xiang YJ, Wei ZL, Yao H, Shen T. Andrographolide and its derivatives are effective compounds for gastrointestinal protection: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25 (5), 2367-2382.

## **6. SAŽETAK/SUMMARY**

Upalne bolesti crijeva, Chronova bolest i ulcerozni kolitis, su kronične relapsirajuće bolesti koje pogađaju milijune ljudi diljem svijeta te narušavaju njihov svakodnevni život. Budući da polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka, imaju antioksidativni i protuupalni učinak, cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva obzirom na sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima određen je spektrofotometrijskom metodom korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, dok je antioksidativna aktivnost procijenjena DPPH testom. Sadržaj polifenola značajno je bio veći u jednom multipreparatu tri biljne vrste: kurkuma, indijski tamjanovac i crni papar. Nadalje, sadržaj ovih biološki aktivnih tvari u monopreparatima kurkume bio veći nego kod ostalih analiziranih monopreparata. Dobiveni rezultati upućuju na iznimnu kvalitetu dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva te se analizirani uzorci mogu smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica, dok je antioksidativna aktivnost ispitivanih dodataka prehrani u skladu sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica.

Inflammatory bowel diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic relapsing diseases affecting millions worldwide and disrupting their daily lives. Since polyphenols, the secondary metabolites of plants, have an antioxidant and anti-inflammatory effect, the aim of this work was to evaluate the quality of dietary supplements for the treatment of inflammatory bowel diseases with regard to the content of polyphenols and to determine their antioxidant activity. The content of total polyphenols in the analyzed samples was determined by the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent, while the antioxidant activity was assessed by the DPPH test. The content of polyphenols was significantly higher in a multi-botanical preparation of three plant species: turmeric, Indian frankincense and black pepper. Furthermore, the content of these biologically active substances in turmeric monopreparations was higher than in other analyzed monopreparations. The obtained results point to the exceptional quality of dietary supplements for the treatment of inflammatory bowel diseases, and the studied samples can be considered a good source of polyphenolic components, while the antioxidant activity of the tested dietary supplements is in accordance with the content of these biologically active components.



**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Ukupni polifenoli i antioksidativna aktivnost dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva

Ivona Pilić

#### SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva, Chronova bolest i ulcerozni kolitis, su kronične relapsirajuće bolesti koje pogađaju milijune ljudi diljem svijeta te narušavaju njihov svakodnevni život. Budući da polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka, imaju antioksidativni i protuupalni učinak, cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva obzirom na sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima određen je spektrofotometrijskom metodom korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, dok je antioksidativna aktivnost procijenjena DPPH testom. Sadržaj polifenola značajno je bio veći u jednom multipreparatu tri biljne vrste: kurkuma, indijski tamjanovac i crni papar. Nadalje, sadržaj ovih biološki aktivnih tvari u monopreparatima kurkume bio veći nego kod ostalih analiziranih monopreparata. Dobiveni rezultati upućuju na iznimnu kvalitetu dodataka prehrani za liječenje upalnih bolesti crijeva te se analizirani uzorci mogu smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica, dok je antioksidativna aktivnost ispitivanih dodataka prehrani u skladu sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 6 grafičkih prikaza, 3 tablica i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: polifenoli, DPPH, dodaci prehrani, upalne bolesti crijeva, kurkuma, justicija, indijski tamjanovac

Mentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*  
**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*  
**Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, *asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Total polyphenols and antioxidant activity of dietary supplements for the treatment of inflammatory bowel diseases

Ivona Pilić

#### SUMMARY

Inflammatory bowel diseases, Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic relapsing diseases affecting millions worldwide and disrupting their daily lives. Since polyphenols, the secondary metabolites of plants, have an antioxidant and anti-inflammatory effect, the aim of this work was to evaluate the quality of dietary supplements for the treatment of inflammatory bowel diseases with regard to the content of polyphenols and to determine their antioxidant activity. The content of total polyphenols in the analyzed samples was determined by the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent, while the antioxidant activity was assessed by the DPPH test. The content of polyphenols was significantly higher in a multi-botanical preparation of three plant species: turmeric, Indian frankincense and black pepper. Furthermore, the content of these biologically active substances in turmeric monopreparations was higher than in other analyzed monopreparations. The obtained results point to the exceptional quality of dietary supplements for the treatment of inflammatory bowel diseases, and the studied samples can be considered a good source of polyphenolic components, while the antioxidant activity of the tested dietary supplements is in accordance with the content of these biologically active components.

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

Thesis includes: 34 pages, 6 figures, 3 tables and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Polyphenols, DPPH, dietary supplements, inflammatory bowel diseases, Turmeric, Green chiretta, Indian frankincense

Mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** *Assistant* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2022.