

Polifenolne sastavnice i antioksidacijsko djelovanje droge *Myrtilli fructus siccus*

Martinko, Barbara

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:163:026980>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Barbara Martinko

**Polifenolne sastavnice i antioksidacijsko
djelovanje droge *Myrtilli fructus siccus***

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Blažeković.

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Biljani Blažeković na pomoći pri odabiru teme ovog diplomskog rada te na uloženom znanju i trudu tijekom njegove izrade.
Hvala asistenticama Zavoda za farmakognoziju na pomoći i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1) Botanički podaci o vrsti <i>Vaccinium myrtillus</i> L., Ericaceae	1
1.2) Fitokemijski sastav	2
1.3) Biološki, farmakološki i klinički učinci	3
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1) Biljni materijal i priprema ekstrakta	10
3.2) Aparatura i kemikalije	10
3.3) Određivanje gubitka sušenjem	11
3.4) Dokazivanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC)	12
3.4.1) Dokazivanje flavonoida i fenolnih kiselina	12
3.4.2) Dokazivanje antocijana	12
3.5) Određivanje sadržaja polifenolnih sastavnica	13
3.5.1) Određivanje fenolnih kiselina	13
3.5.2) Određivanje antocijana	13
3.5.3) Određivanje trjeslovina	14
3.5.4) Određivanje flavonoida	15
3.6) Istraživanje antioksidacijske aktivnosti vodeno-etanolnog ekstrakta droge <i>Myrtilli fructus siccus</i>	16
3.6.1) Određivanje sposobnosti hvatanja dušikovog (II) oksida (NO)	16
3.6.2) Određivanje sposobnosti hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala	16
3.7) Statistička analiza	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1) Gubitak sušenjem	18
4.2) Dokazivanje polifenolnih sastavnica droge <i>Myrtilli fructus siccus</i> metodom tankoslojne kromatografije (TLC)	18
4.2.1) Dokazivanje flavonoida i fenolnih kiselina	18
4.2.2) Dokazivanje antocijana	19
4.3) Sadržaj polifenolnih sastavnica u drogi <i>Myrtilli fructus siccus</i>	20
4.3.1) Fenolne kiseline	20
4.3.2) Antocijani	20
4.3.3) Trjeslovine	21
4.4.4) Flavonoidi	22
4.4) Antioksidacijska aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta droge <i>Myrtilli fructus siccus</i>	22
4.4.1) Sposobnost hvatanja radikala dušikovog (II) oksida (NO)	22
4.4.2) Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala	24

5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA	28
7. SAŽETAK/ SUMMARY	32
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

T. 2. N° 29.



Slika 1) Biljna vrsta *Vaccinium myrtillus* L. (Pierre-Joseph Redouté, licenca <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>, digitalno obrađena)

1. UVOD

1.1) Botanički podaci o vrsti *Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae

Borovnica (engl. *bilberry*, *European blueberry*, *whortleberry*) je patuljast, razgranat grm, visine do 50 cm. Pripada u porodicu vriješova. Pridjev *myrtillus* (lat.) znači „mala mirta“, što naglašava sličnost listova i plodova s biljkom mirtom (*Myrtus* spp.) (Upton, 2001). Rod *Vaccinium* sadrži preko 200 različitih vrsta, među kojima su *Vaccinium corymbosum* L. (kultivirana ili američka borovnica, blueberry), *Vaccinium macrocarpon* L. (brusnica) i dr. (Zoratti i sur., 2016). Grančice borovnice su zelene, oštro bridaste, a listovi jajoliki i na rubu fino pilasti, blijedozeleni, crvenkasto nahukani. Cvjetovi su zelenkastoružičasti, kuglastog oblika te se nalaze pojedinačno na kratkim peteljka u pazušcima listova. Biljka cvate u svibnju i lipnju, a plodovi, koji su male, plavkastocrne, sočne i okrugle bobice promjera 5-9 mm, dozrijevaju u srpnju i kolovožu (Domac, 2002).

Borovnica je široko rasprostranjena vrsta koja raste u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama te na vrištinama srednje i sjeverne Europe, sjeverne Azije i Sjeverne Amerike. U Hrvatskoj ju nalazimo uglavnom u planinskim predjelima (Kuštrak, 2005).



Slika 2) *Vaccinium myrtillus* L. (Thomas Mues, licenca <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/deed.en>)

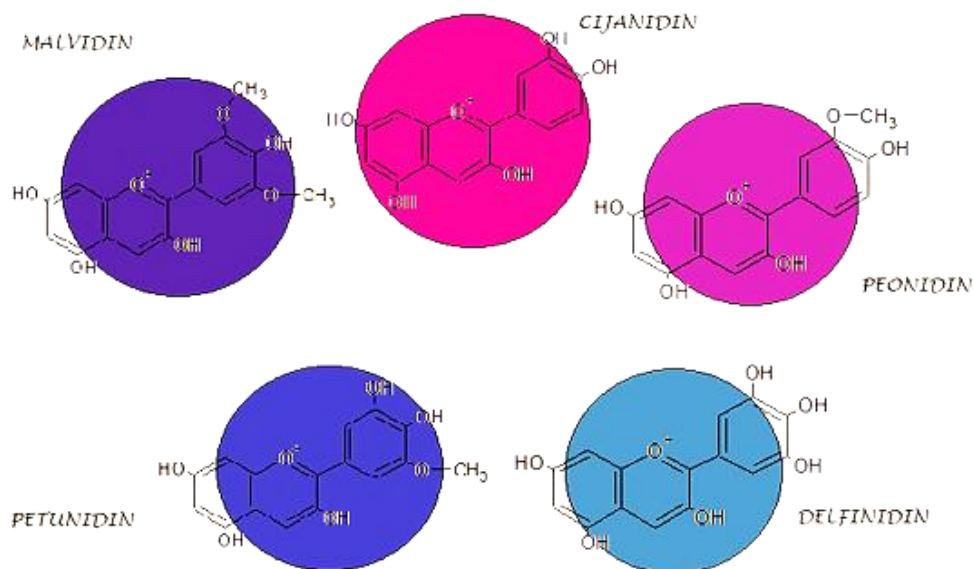
1.2) Fitokemijski sastav

U tradicionalnoj medicini koriste se listovi i plodovi borovnice. Osušeno lišće borovnice (*Myrtilli folium*) je oficinalna u Erg.B.6 (dodatak Njemačkoj farmakopeji iz 1953.) (Kuštrak, 2005). U Europskoj farmakopeji (Ph. Eur.) svoju monografiju imaju zreli, osušeni plodovi borovnice (*Myrtilli fructus siccus*), svježiji plodovi (*Myrtilli fructus recens*) te suhi ekstrakt dobiven iz svježeg ploda (prerađen i standardiziran) (Vanekova i Rollinger, 2022).

Prema literaturi listovi sadrže katehinske trjeslovine u količini 0,8 - 6,7 % , do 0,5 % arbutina te slobodni hidrokinon u tragovima. Osim toga, bogati su vitaminom C, manganom i kromom (Kuštrak, 2005).

Droga *Myrtilli fructus recens* definira se minimalnim udjelom antocijana od 0,3 %, izraženi kao cijanidin-3-glukozid klorid. Droga *Myrtilli fructus siccus* definira se minimalnim udjelom trjeslovina od 1 %, izraženih kao pirogalol u odnosu na početnu masu droge. Sadržaj trjeslovina u suhom plodu borovnice može biti do 4 %, uglavnom su prisutne katehinske trjeslovine. Zastupljeni su procijanidini B-tipa i do 0,5 % antocijana. Od flavonoida prisutni su hiperozid, izokvercitrin, kvercetin, astragalin. Ostali prisutni spojevi su asperulozid, derivati kavene i klorogenske kiseline, resveratrol, pektini, vitamin C, β -karoten. Antocijani u svježem plodu zastupljeni su pretežno u kožici (epidermisu) bobice. Također, prisutni su katehini, kvercetin, miricetin, fenolne kiseline, procijanidini A-tipa, trans-resveratrol. (ESCOP, 2014). Od minerala sadrže najviše kalij, fosfor i magnezij. Nutritivnu vrijednost svježih plodova čini 9,7 % ugljikohidrata, 0,6 % proteina, 0,4 % masti i do 3,5 % vlakana, a 87 % čini voda (Pires i sur., 2020). Najzastupljeniji antocijani daju prepoznatljivu boju plodovima, a to su glukozidi, galaktozidi i arabinozidi delfinidina, malvidina, cijanidina, peonidina i petunidina (Pires i sur., 2020).

Plodovi i cvjetići sadrže proantocijanidine, koji zagrijavanjem s razrijeđenim mineralnim kiselinama stvaraju obojene antocijanidine koji su manje stabilni od antocijana zbog čega pod utjecajem svjetlosti dolazi do izbjeljivanja boje (Kuštrak, 2005). Naime, antocijanidini posjeduju benzopiransku jezgru s fenilnom skupinom te takva struktura obiluje dvostrukim nezasićenim vezama koje su zaslužne za antioksidacijski učinak, ali i za nestabilnost molekule prilikom izlaganja kisiku, svjetlosti, povišenoj temperaturi, promjeni pH, različitim otapalima. Prisutnost šećerne skupine na položaju 3 piranskog prstena je najčešća modifikacija koja doprinosi stabilnosti antocijana i apsorpciji iz gastrointestinalnog trakta, ali može donekle umanjiti antioksidacijski učinak steričkim smetnjama (Olivas-Aguirre i sur., 2016).



Slika 3) Prikaz antocijanidina prisutnih u plodu borovnice. Različiti maksimumi apsorpcije između pojedinih spojeva javljaju se zbog različitih supstituenata benzenske jezgre (Olivas-Aguirre i sur., 2016).

1.3) Biološki, farmakološki i klinički učinci

Studije su pokazale da borovnica zahvaljujući svom sastavu, koji obiluje polifenolima, posjeduje antioksidacijska, protuupalna, antiproliferativna, kardioprotektivna, hipoglikemijska i antimikrobna svojstva. Također, učinkovita je u prevenciji debljine i očnih bolesti (Pires i sur., 2020) te ima vazoaktivna svojstva (Smeriglio i sur., 2018).

Listovi borovnice koriste se u pučkoj medicini kao lijek protiv proljeva, a poznata je njegova primjena u čajevima za sniženje razine šećera u krvi, zbog čega se još zovu „vegetativnim inzulinom“ (Kuštrak, 2005). Prema literaturi sadržaj antocijana je znatno niži u listovima nego u plodovima, ali su flavonoidi i druge fenolne sastavnice više zastupljene. Osim antidijabetičkog učinka, ističe se primjena listova kod urinarnih infekcija upravo zbog antimikrobnih i protuupalnih svojstava fenolnih sastavnica. Također je uočen snažan antimutageni učinak kod *Salmonella typhimurium* soja TA100 u Amesovom testu kojim se ispituje potencijal neke supstance u izazivanju mutacija. Takvo otkriće može značiti da listovi borovnice imaju protutumorski učinak (Ștefănescu i sur., 2020).

Plodovi borovnice primjenjivali su se još u antička vremena te kroz srednji vijek. Sok dobiven od svježih boba ima adstringentna svojstva te se koristio za ispiranje rana, kod hemeroida, neuredne stolice i nametnika u crijevima. Također, svježi plod se preporučuje kod bolesti jetre, žuči i akutnih ili kroničnih bolesti želuca (Kuštrak, 2005). Utvrđene su razlike u sastavu suhog i svježeg ploda borovnice. Zbog toga se droga *Myrtilli fructus recens* koristi u liječenju vaskularnih bolesti, poput varikoznih vena, periferne vaskularne insuficijencije, mikrocirkulacijskih poremećaja oka. *Myrtilli fructus siccus* koristi se u liječenju akutnog nespecifičnog proljeva, i najčešće se priprema kao dekoka ili macerat (ESCOP, 2014). Trjeslovine sa svojim fenolnim skupinama stvaraju stabilne vodikove veze s proteinima u mukozni crijeva te dolazi do taloženja proteina, što stvara zaštitni sloj na površini epitela i sprječava izlučivanje vode, zaustavljajući proljev (Cziple i sur., 2022). Kondenzirane i nekondenzirane trjeslovine posjeduju prebiotički učinak, jer pozitivno djeluju na rast bifidobakterija i laktobacila (Thumann i sur., 2019).

Smatra se da su za biološke učinke borovnice najzaslužniji antocijani, prirodni antioksidansi, kojih je u plodu identificirano 15 (Miyake i sur., 2012). Prehrana bogata antioksidansima može povećati ukupni antioksidacijski kapacitet ili promijeniti relativni odnos među pojedinim antioksidacijskim komponentama u tijelu (Rimpapa i sur., 2007). U studiji koju su proveli Miyake i sur. (2012) promatran je učinak borovničinog ekstrakta s visokim sadržajem antocijana (39 %) na uveitis induciran endotoksinom koji uzrokuje i upalu mrežnice na mišjem modelu. Prethodna istraživanja pokazala su učinkovitost antocijana borovnice u očuvanju noćnog vida te prevenciji katarakte, glaukoma i makularne degeneracije. Naime, plavo svjetlo koje se nalazi u vidljivom spektru elektromagnetskog (EM) zračenja ima energiju koja uzrokuje oštećenja mrežnice kroz generiranje slobodnih kisikovih radikala i aktivaciju proapoptičkih proteina. Antocijani borovnice neutraliziraju slobodne radikale, potiču sintezu rodopsina, poboljšavaju sposobnost prilagodbe oka na tamu i povećavaju dotok krvi do mrežnice. Pokazalo se da borovnica umanjuje umor oka kod osoba koje većinu vremena provode ispred monitora (Thorntwaite i sur., 2020). Rezultati studije Miyake i sur. (2012) potvrdili su smanjenje upale u tkivu oka i objasnili mehanizam antiradikalnog djelovanja. Pokazalo se da borovnica djeluje na očuvanje razine rodopsina i funkcije fotoreceptorskih stanica kroz smanjenje slobodnih kisikovih radikala i time smanjuje aktivaciju proupalnog transkripcijskog faktora NF- κ B. Zaključak su postigli tako da su izmjerili smanjenje ekspresije STAT3 signalnog puta i interleukina 6 (IL-6); proupalnog citokina. Također su napomenuli da ekstrakt borovnice inhibira angiotenzin-konvertirajući

enzim (ACE) u vaskularnim endotelim stanicama keliranjem cinka iz aktivnog mjesta. Angiotenzin II je pojačano prisutan za vrijeme upale mrežnice i sudjeluje u STAT3 signalnom putu te potiče unos željeza u lokalne stanice regulacijom ekspresije transportnih proteina, što u konačnici doprinosi pojačanom oksidacijskom stresu u stanicama i gubitkom rodopsina za vrijeme upale. Navedeni mehanizmi pokazuju da antocijani borovnice na više načina smanjuju upalu mrežnice i na taj način čuvaju vid.

Postoje dokazi da antocijani borovnice mogu ubrzati oporavak nakon tjelesne aktivnosti zahvaljujući protuupalnim svojstvima, kao i utjecati na vazoaktivna svojstva te na taj način povećati sposobnost izvođenja aerobnih vježbi. Randomizirana klinička studija koju su proveli Arevström i sur. (2019) pratila je učinke suplementacije praškasto usitnjenim suhim plodom borovnice na udaljenost hodanja i lipidni status kod osoba s preboljelim infarktom miokarda kroz 8 tjedana. Jedna skupina uzimala je svakodnevno po 40 g suhog ploda borovnice (ekvivalent 480 g svježih bobica) uz standardnu terapiju, dok je druga skupina bila kontrolna i primala samo standardnu terapiju. Mjerena je kardiovaskularna izdržljivost kroz 6-minutni test hodanja (6MWT) te hs-CRP (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*). Nisu uočene statistički značajne razlike u vrijednosti hs-CRP, ukupnog kolesterola i LDL-a između dvije skupine, ali skupina koja je primala suhi plod borovnice je postigla značajno bolje rezultate u 6MWT, uz manje razine oksidiranog LDL-a ex vivo. Autori studije potvrdili su da suhi plod borovnice ima klinički značajan učinak na oporavak osoba nakon preboljelog infarkta miokarda i istaknuli potrebu za opsežnijom, dvostruko slijepom kliničkom studijom koja bi potvrdila ovakve rezultate (Arevström i sur., 2019).

Drugi izvor navodi kardioprotektivan učinak ekstrakta borovnice u slučaju ishemijsko-reperfuzijske ozljede na životinjskom modelu i modulaciju ekspresije proupalnih molekula kod osoba s visokim rizikom smrti od kardiovaskularnog incidenta (Arora i sur., 2013). Reperfuzija tkiva nakon ishemije može uzrokovati daljnje oštećenje tkiva zbog povećane aktivnosti neutrofila, koji proizvode slobodne kisikove radikale (MSD priručnik dijagnostike i terapije: Šok, n.d.).

Antocijani mogu utjecati na poremećene razine lipida i glukoze u krvi, a to su glavni faktori rizika za pojavu debljine i šećerne bolesti tipa 2 (ŠBT2). Pokazalo se da ekstrakt ploda borovnice smanjuje razinu glukoze u krvi putem aktivacije protein kinaze aktivirane adenozin monofosfatom (AMPK) kod miševa sa ŠBT2. Aktivacija navedenog enzima u bijelim adipocitima i skeletnim mišićima rezultira povećanom ekspresijom GLUT4 transportera

glukoze i posljedično većim unosom glukoze u stanice, a s druge strane smanjena ekspresija fosfoenol-piruvat-karboksikinaze (PEPCK) i glukoza-6-fosfataze (G6Paze) u jetri smanjuje glukoneogenezu, zbog čega se manje glukoze oslobađa u krvotok. AMPK signalni put je jedan od ključnih u regulaciji stanične energije i potencijalna meta u prevenciji i liječenju pretilosti i šećerne bolesti (Li i sur., 2017). Hipoglikemijski učinak dokazan je na mišjem modelu za cijanidin-3-O-glukozid, koji je zastupljen u plodu borovnice. Mehanizam djelovanja je u smanjenju ekspresije RBP4 molekule (engl. *retinol-binding protein 4*) i posljedično povećanju osjetljivosti stanica na inzulin. Na istom modelu dokazan je učinak na prevenciju pretilosti i dislipidemije (Pires i sur., 2020). RBP4 se izlučuje iz jetre i masnog tkiva te je primijećena povezanost s njegovim povišenim razinama u krvi i pretilosti, odnosno inzulinskom rezistencijom. Delecija RBP4 gena kod miševa pokazala je povećanje inzulinske osjetljivosti. Longitudinalna studija koju su proveli Reinehr i sur. (2008) pokazala je povezanost RBP4, tjelesne mase i inzulinske rezistencije kod djece u analizama presječnih i longitudinalnih podataka.

Borovničin protuupalni učinak prepoznat je u liječenju bolesti sluznice, čemu u prilog govori formulacija razvijena za liječenje oralnog mukozitisa kod onkoloških pacijenata. O ovoj primjeni borovnice izvješćuju Morazzoni i sur. (2013). Mukozitis karakteriziraju upala, ulceracije, krvarenja i posljedično razvoj infekcije mukoznih membrana, koja kod onkoloških pacijenata uzrokuje sporiji oporavak i povišenu stopu smrtnosti. Formulacija koja sadrži ekstrakt suhog ploda borovnice zajedno s ekstraktima još dvije ljekovite biljne droge bogata je polifenolima, prvenstveno antocijanima, i pokazala je povoljan utjecaj na pacijente. Smatra se da borovnica ima zaštitni učinak na mukoza potičući proliferaciju fibroblasta, stimulirajući sintezu glikozaminoglikana i jačajući stijenke kapilara.

Antioksidacijska aktivnost biološki aktivnih spojeva borovnice može biti korisna kao pomoćna terapija u liječenju tumora, o čemu su izvijestili Thornthwaite i sur. (2020). Pokazalo se da suplementacija antocijanima za vrijeme liječenja doksorubicinom, cisplatinom ili radijacijskom terapijom može smanjiti toksičnost protutumorske terapije i povećati njenu učinkovitost.

Antiage pripravci koji uključuju biljne sastojke postaju vrlo popularni zbog široke dostupnosti biljnog materijala, sigurnosti i omjera cijene i učinka. Tako je i borovnica istraživana u svrhu usporavanja znakova starenja, koje se definira kao progresivan gubitak učinkovitosti fizioloških procesa. Promjene započinju na genetskoj i molekularnoj razini, no procesi nisu u

potpunosti razjašnjeni. Najšire prihvaćena teorija o starenju je teorija slobodnih radikala. Istraživani su ekstrakti listova i plodova borovnice te je utvrđeno da ekstrakt lista pojačava ekspresiju gena za glutamat dekarboksilazu u dermalnim fibroblastima, koja slabi starenjem, što rezultira rastom stanica, sintezom hijaluronske kiseline i glutationa. Također, pokazalo se da ima inhibitorni učinak na kolagenazu i elastazu, koji doprinose stvaranju bora i obješenosti kože, smanjuje razinu melanina u B16 stanicama melanoma i smanjuju izlučivanje histamina iz mastocita (Arora i sur., 2013).

Studije na životinjskom modelu pokazale su neuroprotektivan učinak ekstrakta ploda borovnice zahvaljujući antioksidacijskim svojstvima (Arora i sur., 2013). Oksidacijski stres je povezan s razvojem neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove (AD) i Parkinsonove bolesti (Thorntwaite i sur., 2020). U mehanizmu nastanka AD dolazi do nakupljanja toksičnog amiloid beta proteina ($A\beta$) i proteina tau. $A\beta$ nastaje proteolizom prekursora amiloidnog proteina (APP), transmembranskog proteina s kompleksnim metabolizmom. Smatra se da do promjena na mozgu i gubitka kognitivnih funkcija dolazi zbog poremećenog metabolizma APP ili eliminacije $A\beta$ (O'Brien i Wong, 2011). Pokazalo se da na mišjem modelu borovnica smanjuje razine C-terminalnog fragmenta APP u kori velikog mozga (Thorntwaite i sur., 2020).

Starenje kože se u velikoj mjeri može pripisati oštećenjima uzrokovanim UV zrakama koja nastaju kod dugotrajnog izlaganja suncu bez adekvatne zaštite. Takva oštećenja uzrokuju uglavnom UVA (400-315 nm) i UVB zrake (315-280 nm). UVA zrake prodiru duboko u dermis te generiraju slobodne kisikove radikale (ROS), oštećujući pritom lipide, proteine i polisaharide. Najopasnije oštećenje je na molekuli deoksiribonukleinske kiseline (DNA), koje stanicu može transformirati i izazvati apoptozu, ili ako je sposobnost obrane organizma nadjačana, uzrokovati karcinom kože. UVB zrake čine tek 5 % zračenja što ga primamo od sunca, ali ima direktan genotoksičan učinak jer uzrokuje pucanje DNA lanca i stvaranje adukata, a u višim dozama produkcija ROS je izraženija te također indirektno oštećuje DNA, lipide i proteine. Antioksidansima bogat ekstrakt borovnice bi mogao pružiti zaštitu od UV-induciranih oštećenja kože, što je bio cilj istraživanja koje su provele Calò i Marabini (2014). Linija stanica HaCat humanih keratinocita tretirana je ekstraktom borovnice kroz 1 sat i izložena UVA i UVB zračenju različitih doza. Praćena je vijabilnost stanica, genotoksičnost i oksidacijski stres kroz mjerenje ROS, malondialdehida (MDA), markera lipidne peroksidacije, fragmentacije DNA i apoptoze. Rezultati su potvrdili da borovnica može

smanjiti UVA i UVB zrakama inducirano oštećenje kroz neutralizaciju ROS i sprječavanje lipidne peroksidacije. Također, uočen je izraženiji zaštitni učinak prema UVB-induciranoj genotoksičnosti. Navedeni rezultati potvrđuju da je borovnica potencijalni sastojak u dermatološkim preparatima širokog spektra djelovanja za zaštitu od sunčevog zračenja (Calò i Marabini, 2014).

Unatoč brojnim dokazima koji govore o pozitivnim učincima ploda borovnice, pronađene su vrlo niske razine antocijana u krvnoj plazmi (Fang, 2015). Osim toga, antocijanidini pokazuju specifični organotropizam, nakupljajući se u plućima, bubrezima, jetri i testisima, dok njihova prisutnost u očima, mozgu, masnom tkivu, mišićima i srcu nije uočena (Smeriglio i sur., 2018). Vrlo mala količina antocijana se izlučuje nepromijenjena iz urina, što upućuje da niska bioraspoloživost antocijana ne potječe od slabe apsorpcije u probavnom sustavu, već od ekstenzivnog presistemskog metabolizma. Različiti antocijanidini daju različite metabolite, primjerice značajan metabolit cijanidina i peonidina je protokatehinska kiselina (PCA), za koju se smatra da ima protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. Također, glikozidi cijanidina i peonidina se metaboliziraju jedan u drugoga kroz reakcije metilacije / demetilacije. Pokazalo se da plodovi bogati ovim spojevima imaju izraženiji protuupalni učinak od plodova s pretežito glikozidima malvidina, petunidina i delfinidina. Borovnica znatno obiluje glikozidima cijanidina i peonidina, čak 37,1 % ukupnih antocijana (Fang, 2015). No, ostali antocijanidini također pokazuju protuupalni učinak, primjerice delfinidin inhibira ekspresiju ciklooksigenaze 2 (COX-2) u aktiviranim mišjim makrofagima (RAW264 stanicama). Isti izvor navodi kako dugotrajna suplementacija pročišćenim cijanidin- ili delfinidin-3-O-glukozidom smanjuje upalni odgovor kod osoba s hiperkolesterolemijom (Li i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vaccinium myrtillus L. (Ericaceae), borovnica, je samonikla biljka široko rasprostranjena u Hrvatskoj. Svježi i suhi plod borovnice oficinalne su ljekarničke droge s dugom tradicijom primjene u narodnoj medicini. Dosadašnje znanstvene studije ukazuju na to da je borovnica bogat izvor bioaktivnih sastavnica kojima se pripisuju različiti biološki učinci i potencijalno blagotvorno djelovanje na zdravlje. U okviru ovog diplomskog rada provedena su istraživanja borovničinog ploda sa sljedećim ciljevima:

- ❖ dokazati prisutnost fenolnih spojeva u suhom plodu borovnice i utvrditi karakteristične TLC profile
- ❖ odrediti sadržaj fenolnih sastavnica u suhom plodu borovnice i njegovom vodeno-etanolnom ekstraktu
- ❖ procijeniti antioksidacijsku aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta suhog ploda borovnice

Svrha provedenih farmakognoških istraživanja je dati prilog istraživanju bioaktivnih sastavnica i bioloških učinaka hrvatskog uzorka borovničinog ploda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1) Biljni materijal i priprema ekstrakta

U istraživanju korišteni su zreli plodovi borovnice (*Vaccinium myrtillus* L, Ericaceae), sabrani u okolini Samobora. Plodovi su osušeni i samljeveni u grubi prašak. Vodeno-etanolni ekstrakt pripremljen je ekstrakcijom 15 g praška droge sa 150 mL 70 % -tnog etanola (EtOH), na ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 20 min. Nakon filtriranja, biljni materijal je još jednom ekstrahiran sa 75 mL 70 % -tnog etanola na ultrazvučnoj kupelji tijekom 10 min. Filtrati su sjedinjeni i upareni do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača te je ekstrakt ostavljen u eksikatoru i izvagan. Iskorištenje ekstrakcije izračunato je prema formuli:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{m(\text{puna tikvica}) - m(\text{prazna tikvica})}{m(\text{droge})} * 100$$

Ekstrakt je sastrugan iz tikvice i prebačen u staklenu bočicu te čuvan u hladnjaku na 4 °C.

3.2) Aparatura i kemikalije

Korištena aparatura prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada:

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- automatske jednokanalne pipete podesivog volumena (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju silikagel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakuum uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar Helios γ (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

Reagensi, standardi i druge korištene kemikalije:

- askorbinska kiselina 99 % (Acros Organics, Geel, Belgija)
- natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- fosfatom-puferirana otopina soli (0, 01 M, pH 7,4) (PBS, eng. phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- etanol 96 % p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev nitroprusid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- 5 % fosforna kiselina (Carlo Erba, Milano, Italija)
- naftiletilendiamin hidroklorid (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- sulfanilamid (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- DPPH (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- aceton p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev klorid heksahidrat p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kloridna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrijev nitrit (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Scharlau, Barcelona, Španjolska)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- natrijev karbonat dekahidrat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- pirogalol 99 % (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)

3.3) Određivanje gubitka sušenjem

1,000 g praškasto usitnjene droge preneseno je u prethodno osušenu i izvaganu staklenu posudicu s poklopcem, izvagano te otklopljenu sušeno u sušioniku 2 sata na 105 °C. Nakon hlađenja u eksikatoru posudica s drogom je izvagana, te izračunat gubitak sušenjem prema navedenom izrazu (Vladimir- Knežević i sur., 2019).

$$Gubitak sušenjem (\%) = \frac{m(\text{prije sušenja}) - m(\text{nakon sušenja})}{m(\text{droga})} * 100$$

3.4) Dokazivanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

3.4.1) Dokazivanje flavonoida i fenolnih kiselina

Ispitivana otopina priredi se otapanjem 0,5 g etanolnog ekstrakta u 5 mL metanola uz blago zagrijavanje na vodenoj kupelji kroz 10 min, te filtrira.

Prva poredbena otopina sadrži flavonoide rutin, kvercitrin i izokvercitrin. Druga poredbena otopina sadrži fenolne kiseline klorogensku i kavenu kiselinu.

Nepokretnu fazu čini ploča Silikagel 60 F254, a pokretnu smjesa otapala etilacetat: mravlja iselina: voda 8:1:1 (V/V/V). Na startnu liniju linijski se nanosi 10 µL svake otopine, a kromatogram se razvija u visinu do 8 cm. Sušenje je na zraku, a detekcija se provodi prskanjem 1 % -tnom metanolnom otopinom β -aminoetilestera difenilboratne kiseline i 5 % -tnom metanolnom otopinom polietilenglikola (NST/PEG); na zraku osušena ploča promatra se pod UV lampom. Fluorescenciju promatramo na 365 nm, a gašenje fluorescencije na 254 nm. Na kromatogramu ispitivane otopine uoči se slijed i boja fluorescencije odijeljenih zona i uspoređi s kromatogramom poredbenih otopina. Izračunaju se R_f vrijednosti poredbenih tvari te rezultati usporede s podacima iz odgovarajuće monografije u svrhu identifikacije (Wagner i Bladt, 2001).

3.4.2) Dokazivanje antocijana

Korištena je ista ispitivana otopina kao u dijelu 3.4.1) Dokazivanje flavonoida i fenolnih kiselina, kao i nepokretna faza (Silikagel 60 F254). Pokretnu fazu čini otopina mravlje kiseline: vode: butanola 16:19:65 (V/V/V). Na startnu liniju nanosi se 10 µL ispitivane otopine i kromatogram razvija u visinu do 8 cm. Ploča se osuši na zraku i obojane zone antocijana detektiraju vizualno na danjem svjetlu. Izračunaju se R_f vrijednosti pojedinih zona i usporede s R_f vrijednostima standarda iz literature kako bi se približno odredile vrste antocijana u ispitivanoj otopini (EDQM; 2020).

3.5) Određivanje sadržaja polifenolnih sastavnica

3.5.1) Određivanje fenolnih kiselina

0,200 g praškasto usitnjene droge /ekstrakt ekstrahira se s 80 mL 50 % -tnog etanola zagrijavanjem 30 min u tikvici na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja sadržaj se filtrira, a filtrat razrijedi u odmjernoj tikvici 50 % -tnim etanolom do 100,0 mL. 1,0 mL ekstrakta prebaci se u odmjernu tikvicu od 10,0 mL te redom dodaju reagensi: 2,0 mL HCl (0,5 M), 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa, 2,0 mL otopine NaOH (8,5 % -tna). Tikvica se zatim nadopuni vodom do oznake. Određivanje se provodi u triplikatu.

Poredbena otopina pripremi se tako da se 1,0 mL dobivenog ekstrakta razrijedi vodom u odmjernoj tikvici od 10,0 mL.

Apsorbancija ispitivane otopine mjeri se odmah na 505 nm, te rezultat izrazi kao ružmarinska kiselina prema formuli (EDQM; 2020):

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A * 2,5}{m}$$

A = apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm

m = masa droge u gramima

Specifična apsorbancija ružmarinske kiseline na 505 nm iznosi 400.

3.5.2) Određivanje antocijana

2,00 g praškaste droge pomiješa se s 95 mL metanola u Erlenmayerovoj tikvici te ekstrahira na mehaničkoj tresilici 30 min. Filtrira se u tikvicu od 100,0 mL uz ispiranje filter papira te nadopuni metanolom do oznake. Dobiveni ekstrakt razrijedi se 50 puta s otopinom 0,1 % HCl u metanolu (V/V) na način da se 0,2 mL ekstrakta prebaci u odmjernu tikvicu od 10,0 mL i nadopuni do oznake otopinom. Određivanje se provodi u triplikatu, a rezultat izrazi kao cijanidin-3-glukozid klorid prema formuli (EDQM, 2020):

$$\% \text{ antocijana} = \frac{A * 5000}{718 * m}$$

A = apsorbancija ispitivane otopine na 528 nm

m = masa droge u gramima

Za potrebe određivanja antocijana u vodeno-etanolnom ekstraktu droge *Myrtilli fructus siccus*, ekstrakt se razrjeđuje 20 puta s otopinom 0,1 % HCl u metanolu i u skladu s time modificira izraz za izračun.

Specifična apsorbanacija cijanidin-3-glukozida na 528 nm iznosi 718.

3.5.3) Određivanje trjeslovina

1,000 g praškaste droge prelije se sa 150 mL vode i ekstrahira 30 min na vrućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja, ekstrakt se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 250,0 mL, razrijedi vodom do oznake i ostavi da se čestice istalože. Filtrira se preko filter papira, a prvih 50 mL filtrata odbaci. Dobiveni filtrat koristi se za izradu otopina iz koji se određuju ukupni polifenoli i polifenoli neadsorbirani na kožni prašak.

Za određivanje ukupnih polifenola: 5,0 mL filtrata razrijedi se vodom do 25,0 mL u odmjernoj tikvici, a 2,0 mL te otopine pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensom i 10,0 mL vode u drugoj odmjernoj tikvici od 25,0 mL. Tikvica se napuni do oznake otopinom NaCO₃ (290 g / L).

Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninski polifenoli): U Erlenmayerovu tikvicu od 100 mL doda se 10,0 mL filtrata i 0,1 g kožnog praška te snažno mućka kroz 60 min na laboratorijskoj tresilici. Filtrira se, a 5,0 mL filtrata razrijedi vodom do 25,0 mL u odmjernoj tikvici. Uzme se 2,0 mL te otopine, prenese u drugu odmjernu tikvicu od 25,0 mL te dodaju 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode. Tikvica se napuni do oznake otopinom NaCO₃ (290 g / L).

Standardna otopina pirogalola: 50,0 mg pirogalola otopi se u 100,0 mL vode u odmjernoj tikvici. 5,0 mL te otopine prenese se u drugu odmjernu tikvicu od 100,0 mL i napuni vodom do oznake. 2,0 mL te otopine prenese se u odmjernu tikvicu od 25 mL te doda 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode. Tikvica se napuni do oznake otopinom NaCO₃ (290 g / L).

Apsorbanacija plavih ispitivanih otopina mjeri se nakon 30 min na 760 nm.

Mjerenje za sve uzorke i standard se provodi u triplikatu, uz vodu kao poredbenu otopinu. Sadržaj trjeslovina određuje se iz razlike sadržaja ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak prema formuli (EDQM, 2020):

$$\% \text{ trjeslovina} = 62,5 * \frac{(A1-A2)*m2}{A3*m1}$$

$m1$ = masa uzorka u gramima

$m2$ = masa pirogalola u gramima

$A1$ = apsorbancija otopine ukupnih polifenola

$A2$ = apsorbancija otopine polifenola neadsorbiranih na kožni prašak

$A3$ = apsorbancija otopine pirogalola

3.5.4) Određivanje flavonoida

Izvaže se 0,600 g praškaste droge ili etanolnog ekstrakta te doda u tikvicu okruglog dna 1 mL otopine heksametilentetramina (5 g/L), 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L). Sadržaj tikvice zagrijava se 30 min na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Filtrira se preko pamuka, a ostatak droge zajedno s pamukom dodatno ekstrahira dvaput s 20 mL acetona, kroz 10 min na vodenoj kupelji. Nakon hlađenja filtrati se sjedine, filtrira se preko filter papira u odmjernu tikvicu od 100,0 mL uz ispiranje tikvice i filter papira acetonom, te nadopuni do oznake. 20 mL acetonskog ekstrakta prenese se u lijevak za odjeljivanje i pomiješa s 20 mL vode. Ekstrakcija se provodi prvo s 15 mL etilacetata, zatim tri puta s 10 mL etilacetata. Sjedinjeni ekstrakti dodatno se isperu u lijevku za odjeljivanje dvaput s 50 mL vode. Etilacetatni ekstrakt se filtrira preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL i razrijedi etilacetatom do oznake.

Ispitivana otopina izradi se na način da se 10,0 mL etilacetatnog ekstrakta prebaci u odmjernu tikvicu od 25,0 mL, doda 1 mL aluminijevog klorida te nadopuni 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake. Apsorbancija se mjeri nakon 30 min.

Poredbena otopina izradi se na način da se 10,0 ml etilacetatnog ekstrakta razrijedi u odmjernoj tikvici od 25,0 mL s 5 % -tnom metanolnom otopinom octene kiseline.

Ispitivana otopina pokazuje maksimum apsorpcije na 425 nm te se na toj valnoj duljini provodi mjerenje, uz poredbenu otopinu. Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračuna se prema formuli (EDQM, 2020):

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A * 1,25}{m}$$

A = apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm

m = masa droge u gramima

Specifična apsorbanacija izokvercetrozida na 425 nm iznosi 500.

3.6) Istraživanje antioksidacijske aktivnosti vodenno-etanolnog ekstrakta droge *Myrtilli fructus siccus*

3.6.1) Određivanje sposobnosti hvatanja dušikovog (II) oksida (NO)

Postupak: pripremi se niz serijskih razrjeđenja uzorka u mikrotitarskim jažicama tako da testirane koncentracije uzorka u reakcijskoj smjesi budu u rasponu 1600-12,5 µg/mL. U kontrolne jažice stavi se 70 % -tni EtOH umjesto uzorka. Određivanje se provodi u duplikatu. U svaku jažicu doda se 80 µL otopine Na-nitroprusida (2 mM) u PBS-u (fosfatom puferirana otopina soli, 0,01 M, pH 7,4) i sadržaj promiješa. Reakcijska smjesa inkubira se 120 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije doda se 80 µL Griessovog reagensa (1 % sulfanilamid, 0,1 % NED i 5 % H₃PO₄) i promiješa sadržaj. Odmah nakon dodatka otopine NED-a izmjeri se apsorbanacija na 545 nm, u odnosu na slijepu probu (Harput i sur., 2011).

Sposobnost hvatanja NO radikala izražava se u postocima prema formuli:

$$\% \text{ NO antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

A_0 = apsorbanacija kontrolne otopine koja umjesto uzorka sadrži jednaku količinu otapala

A_1 = apsorbanacija ispitivane otopine

Uz određivanje antiradikalne sposobnosti uzorka, provedeno je isto određivanje za dva standarda; askorbinsku kiselinu i kvercetin.

Konačni rezultat izrazi se kao IC₅₀; koncentracija uzorka koja ostvaruje 50 %- tni učinak na inhibiciju NO radikala, a dobiva se interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

3.6.2) Određivanje sposobnosti hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala

Postupak: u epruvetama se priredi niz serijskih razrjeđenja uzorka u 70 % -tnom EtOH, tako da testirane koncentracije uzorka budu u rasponu 1600 - 3,13 µg/mL. U kontrolne epruvete stavi se 1,5 mL 70 % -tnog EtOH umjesto uzorka. Određivanje se provodi u duplikatu. U

svaku epruvetu doda se 0,5 mL svježe otopine DPPH radikala (0,1 mM) pomoću repetitivne epruvete te se njome promiješa sadržaj. Reakcijska smjesa inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Apsorbancija se izmjeri na 517 nm valne duljine uz 70 % -tni EtOH kao slijepu probu.

Određivanje antiradikalne sposobnosti za standardne antioksidanse provedeno je korištenjem 96 % -tnog EtOH kao otapala, a testirane koncentracije uzorka u reakcijskoj smjesi bile su u rasponu 100 - 0,2 µg/mL (Kindl i sur., 2015).

Sposobnost hvatanja DPPH radikala izračuna se prema formuli te izrazi postotkom:

$$\%DPPH \text{ antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

A_0 = apsorbancija kontrolne otopine (umjesto ispitivanog uzorka sadrži jednaku količinu otapala)

A_1 = apsorbancija ispitivane otopine umanjena za apsorbanciju samog uzorka

Konačni rezultat izrazi se kao koncentracija uzorka koja ostvaruje 50 % -tni učinak na inhibiciju radikala (IC50), a dobiva se na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

3.7) Statistička analiza

Obrada rezultata provedena je pomoću računalnog programa Microsoft Excel 2021, iz programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Uzorci su testirani u duplikatu ili triplikatu, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Kod određivanja antiradikalne sposobnosti, koncentracija koja ostvaruje 50 % -tni učinak (IC50) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1) Gubitak sušenjem

Utvrđeno je da gubitak sušenjem za drogu *Myrtilli fructus siccus* iznosi 7,26 %. U farmakopejskoj monografiji droge naveden je zahtjev da gubitak sušenjem ne smije biti veći od 12 %, iz čega proizlazi da analizirani uzorak suhog borovničinog ploda udovoljava tom zahtjevu.

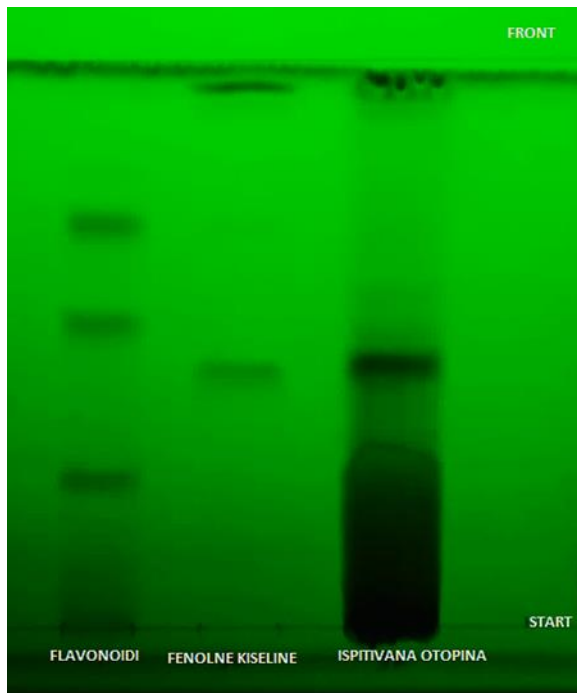
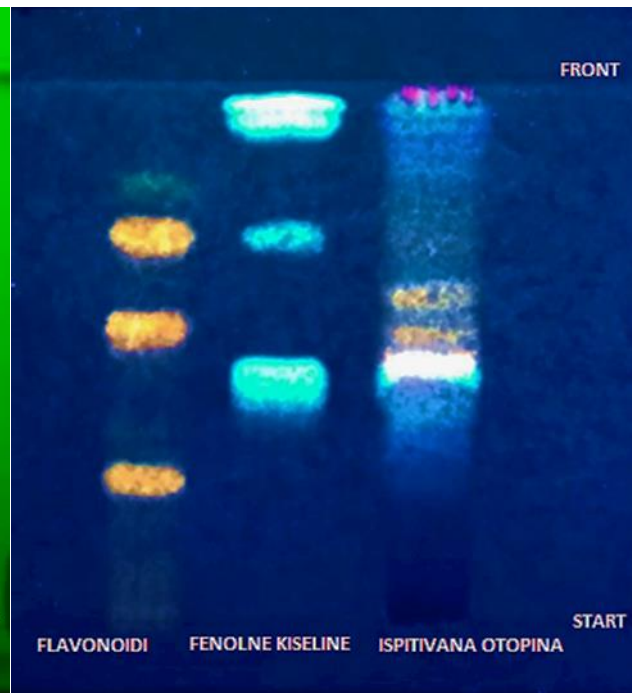
Ekstrakcijom biljnog materijala sa 70 %-tnim etanolom određen je udio ekstraktibilnih tvari od 62,1 %. Dobiveni ekstrakt bio je tamnoljubičaste boje, gust i ljepljiv.

4.2) Dokazivanje polifenolnih sastavnica droge *Myrtilli fructus siccus* metodom tankoslojne kromatografije (TLC)

4.2.1) Dokazivanje flavonoida i fenolnih kiselina

Odjeljivanje flavonoidnih i drugih fenolnih sastavnica borovničinog ploda provedeno je na tankom sloju silikagela korištenjem smjese otapala etilacetat : mravlja kiselina : voda (8:1:1). Razvijeni kromatogrami promatrani su na 254 nm, te nakon prskanja ploče NST/PEG reagensom na 365 nm. Slika 4 prikazuje dobivene kromatograme.

Flavonoidi su nakon prskanja NST/PEG reagensom pod UV svjetlom na 365 nm vidljivi kao zone narančaste fluorescencije, dok su fenolne kiseline vidljive kao zone plave fluorescencije. Na kromatogramu ekstrakta borovničinog ploda detektirane su zone koja bojom i položajem odgovaraju poredbenom flavonoidu izokvercitrinu ($R_f = 0,53$) te poredbenim fenolnim kiselinama, klorogenskoj ($R_f = 0,45$) i kavenoj ($R_f = 0,95$). Intenzitet i veličina zone koja odgovara klorogenskoj kiselini u ispitivanom uzorku veća je od zone koja odgovara kavenoj kiselini.

A**B**

Slika 4) Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u drogi *Myrtilli fructus siccus*

Pokretna faza: etilacetat : mravlja kiselina : voda (80:10:10 V/V/V)

Nepokretna faza: ploča Silikagel 60 F254

Detekcija A: UV-254 nm

Detekcija B: NS / PEG, UV-365 nm

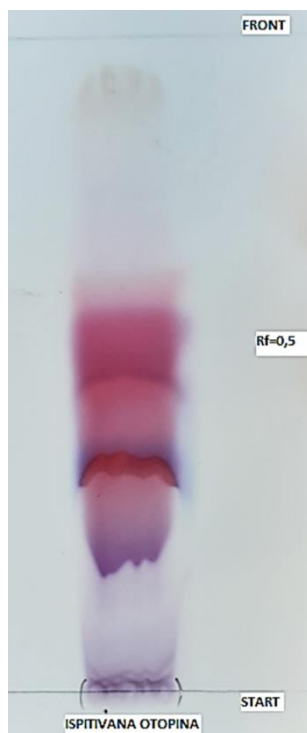
Poredbena otopina flavonoida: rutin ($R_f=0,27$), izokvercitrin ($R_f=0,53$), kvercitrin ($R_f=0,71$)

Poredbena otopina fenolnih kiselina: klorogenska kiselina ($R_f=0,45$), kavena kiselina ($R_f=0,95$)

Ispitivana otopina: metanolni ekstrakt suhog ploda borovnice

4.2.2) Dokazivanje antocijana

Odijeljivanje antocijana provedeno je na tankom sloju silikagela uz mobilnu fazu mravlja kiselina : voda : butanol (16:19:65). Rezultat je ljubičasto obojena vrpca u kojoj se uočava nekoliko zona s nijansama plave i crvene boje; u području ispod R_f vrijednosti 0,5 prisutna je ljubičasto-plava zona, a u središnjm R_f području crveno-ljubičasta zona. Usporedbom s literaturom ustanovljeno je da navedena zona najvjerojatnije odgovara krizanteminu, tj. cijanidin-3-O-glukozidu (EDQM, 2020). Wagner i Bladt (2001) navode da plave i ljubičasto-crvene obojane zone u rasponu R_f vrijednosti 0,2 – 0,5 pripadaju antocijanima. Iz navedenog može se zaključiti da je analizirana droga *Myrtilli fructus siccus* bogata antocijanima.



Slika 5) Kromatogram antocijana u drogi *Myrtilli fructus siccus*

Pokretna faza: mravlja kiselina: voda: butanol (16:19:65 V/V/V)

Nepokretna faza: Silikagel 60 F 254

Detekcija: dnevno svjetlo

Ispitivana otopina: metanolni ekstrakt suhog ploda borovnice

4.3) Sadržaj polifenolnih sastavnica u drogi *Myrtilli fructus siccus*

4.3.1) Fenolne kiseline

Sadržaj fenolnih kiselina, iz skupine derivata hidroksicimene kiseline, određen je metodom koja se temelji na reakciji *o*-dihidroksifenolne skupine i nitrit-molibdat reagensa, a nastali žuto obojeni kompleksni spoj dodatkom lužine prelazi u narančastocrveno obojenje čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski. Analiza je pokazala da droga *Myrtilli fructus siccus* sadrži $0,59 \pm 0,03$ % fenolnih kiselina, izraženo kao ružmarinska kiselina, dok je u vodenometanolnom ekstraktu određen sadržaj od $1,12 \pm 0,05$ %.

4.3.2) Antocijani

Određivanje antocijana provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na svojstvu antocijana da u kiseljoj otopini (pH=1) stvaraju flavilium kation i povećavaju

apsorbanciju na valnoj duljini od 528 nm. Utvrđeno je da plodovi borovnice sadrže $1,61 \pm 0,03$ % antocijana, a vodeno-etanolni ekstrakt $1,94 \pm 0,02$ %, izraženo kao cijanidin-3-glukozid klorid.

Antocijani su vodotopljivi pigmenti, stabilniji pri nižem, kiselijem pH nego neutralnom ili lužnatom. No, u prisustvu jake kiseline i kisika hidroliziraju. Kako bi određivanje antocijana bilo točnije, poželjno je koristiti slabe kiseline umjesto jakih te pročistiti ekstrakt od drugih fenolnih komponenti, slobodnih šećera i organskih kiselina. Smatra se da su glikozidni spojevi glavni nositelji antioksidacijske aktivnosti nakon apsorpcije u crijevima, zato je poželjno provesti analizu glikozida a ne antocijanidina (Kähkönen i sur., 2003). U kliničkim studijama pretežno se koriste ekstrakti borovnice koji su standardizirani na udio antocijana od 36 %, a pritom se prisutnost slobodnih antocijanidina smatra pokazateljem loše kvalitete ekstrakta. Uzrok tome mogu biti loši uvjeti skladištenja ili ekstrakcijski proces. Jednostavne metode određivanja antocijana koriste hidrolizu glikozida jakim kiselinama te se mjeri sadržaj aglikona (antocijanidina). Plodovi također sadrže proantocijanidine, koji u tom slučaju isto hidroliziraju dajući antocijanidine. Na taj način rezultati mogu pokazati veći sadržaj antocijana nego što je stvarno prisutan (Cassinese i sur., 2007). Antocijani se najčešće ekstrahiraju polarim otapalima poput etanola ili metanola zbog dobre topljivosti koja potječe od hidroksilnih skupina na strukturi (Welch i sur., 2008).

4.3.3) Trjeslovine

Sadržaj trjeslovina u plodu borovnice određen je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na određivanju ukupnih polifenola prije i nakon obrade kožnim praškom na koji se vežu trjeslovine, Korišten je Folin-Ciocalteu reagens s kojim polifenoli stvaraju plavo obojene komplekse, apsorbancija ispitivanih otopina izmjerena je na 760 nm, a sadržaj izražen kao pirogalol. Rezultati analize pokazali su da droga *Myrtilli fructus siccus* sadrži 0,93 % trjeslovina, dok je vodeno-etanolni ekstrakt sadržavao 1,03 % trjeslovina. Europska farmakopeja propisuje za drogu minimalni udio trjeslovina u iznosu od 0,8 %, što ukazuje da je analizirana droga farmaceutske kakvoće (EDQM; 2020).

4.4.4) Flavonoidi

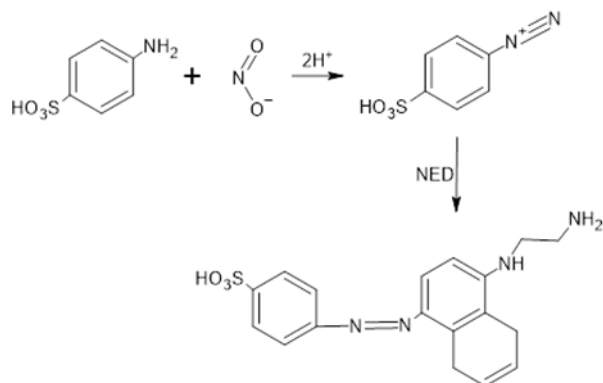
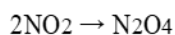
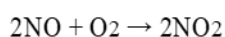
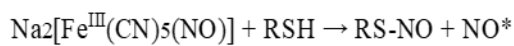
Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida u borovničinom plodu temelji se na hidrolizi flavonoidnih glikozida, odjeljivanju aglikona izmućkavanjem s etilacetatom i dodatku aluminijevog klorida u otopinu aglikona pri čemu nastaje žuto obojeni kompleksni spoj čija se apsorbancija mjeri na 425 nm. Analiza je pokazala da plod borovnice sadrži $0,130 \pm 0,004$ % flavonoida, dok je u vodeno-etanolnom ekstraktu određen sadržaj od $0,145 \pm 0,002$ %, izraženo kao izokvercetrozid.

Prijašnja istraživanja fitokemijskog sastava borovnice pokazala su da vrsta i količina bioaktivnih sastavnica uvelike ovise o uvjetima rasta biljke (geografski položaj, sastav tla, vrijeme ubiranja), ali i o primijenjenim metodama analize (Dróždž i sur., 2017). Zoratti i sur. (2016) dokazali su da sastav i količina antocijana variraju ovisno o geografskom položaju biljke. Ekstrakcija polifenolnih spojeva se uglavnom provodi pomoću razrijeđenog etanola zbog njihove dobre topljivosti u polarnim otapalima. Blago povišena temperatura (55 °C umjesto 20 °C) također pospješuje ekstrakcijski proces, ukoliko ne traje predugo. Veći udio ekstrahiranih polifenolnih spojeva podrazumijeva veću antioksidacijsku aktivnost ekstrakta, što se pokazalo u radovima Dróždž i sur. (2017) i Brasanac-Vukanovic i sur. (2018), gdje je antioksidacijska aktivnost etanolnog ekstrakta bila veća od vodenog.

4.4) Antioksidacijska aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta droge *Myrtilli fructus siccus*

4.4.1) Sposobnost hvatanja radikala dušikovog (II) oksida (NO)

Spektrofotometrijsko određivanje sposobnosti hvatanja NO radikala temelji se na mjerenju koncentracije nitrit iona koji reagiraju u Griess-ovoj reakciji diazotacije sa sulfanilamidom i NED-om u kiselom mediju, stvarajući ljubičasti kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije na 540 nm. Nitrit ioni nastaju u reakciji NO radikala s kisikom, a izvor NO radikala je natrijev nitroprusid. Ukoliko je prisutan antioksidans, dolazi do gašenja NO radikala, nema stvaranja nitrit iona niti azo-kompleksa, odnosno otopina ostaje obezbojena (Sadeer i sur., 2020).

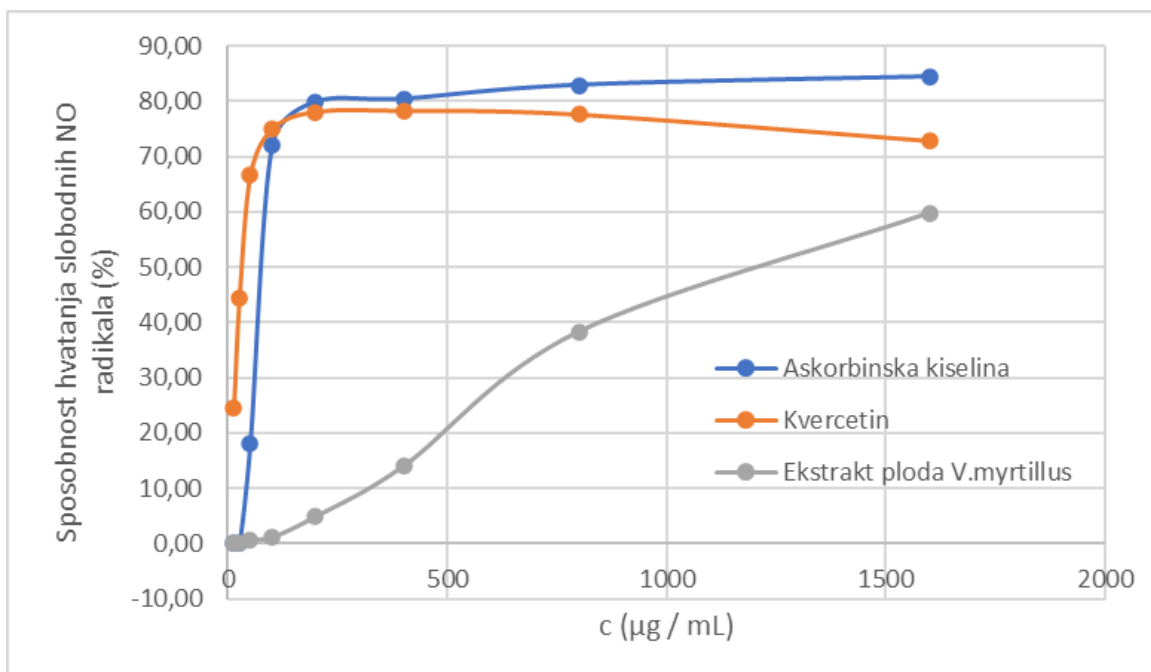


Slika 6) Reakcijska shema stvaranja NO radikala i ljubičaste azo-boje u slučaju odsutnosti antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 1) Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodeno-etanolnog ekstrakta ploda borovnice, kvercetina i askorbinske kiseline - sposobnost hvatanja slobodnih NO radikala

Sposobnost hvatanja NO radikala (%)			
c (µg / mL)	Ekstrakt Myrtilli fructus siccus	Askorbinska kiselina	Kvercetin
1600	59,72 ± 5,08	84,42 ± 0,84	72,84 ± 0,52
800	38,29 ± 3,75	82,91 ± 1,01	77,67 ± 1,92
400	13,99 ± 0,41	80,4 ± 1,14	78,26 ± 2,46
200	4,87 ± 6,89	79,95 ± 0,54	78,07 ± 2,62
100	1,10 ± 1,56	72,07 ± 0,94	75,98 ± 5,27
50	0,59 ± 0,84	18,22 ± 5,76	66,65 ± 8,84
25	nd	nd	44,29 ± 6,23
12,5	nd	nd	24,52 ± 0,67

nd = nije djelotvoran



Slika 7) Grafički prikaz ovisnosti postotka inhibicije NO* radikala o koncentraciji za ekstrakt suhog ploda borovnice, askorbinsku kiselinu i kvercetin.

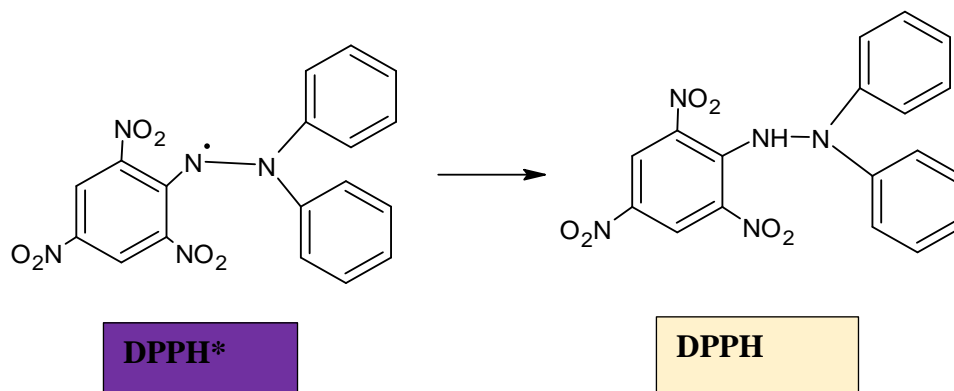
U tablici 1 prikazani su rezultati određivanja sposobnosti hvatanja NO radikala, iz koje je uočljiva snažna antioksidacijska aktivnost kvercetina i askorbinske kiseline, koji pri koncentraciji 100 µg/mL neutraliziraju 75,98 % odnosno 72,07 % slobodnih NO radikala. Vodeno-etanolni ekstrakt suhog ploda borovnice pokazao je znatno slabiji antioksidacijski potencijal u odnosu na standarde, te je pri koncentraciji 100 µg/mL inhibirao samo 1,10 % NO radikala, dok je pri najvećoj testiranoj koncentraciji 1600 µg/mL dosegnuo učinkovitost od $59,72 \pm 5,08$ % inhibicije.

U istraživanju izračunata je IC₅₀ koncentracija interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka. IC₅₀ je vrijednost koncentracije ispitivanog uzorka pri kojoj je postignuta 50 %-tna inhibicija slobodnih radikala. Za analizirane uzorke utvrđene su sljedeće vrijednosti IC₅₀: $1287,61 \pm 119,11$ µg / mL za voden-etanolni ekstrakt suhog ploda borovnice, $78,68 \pm 0,99$ µg/mL za askorbinsku kiselinu i $34,19 \pm 5,47$ µg/mL za kvercetin.

4.4.2) Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala

DPPH metoda temelji se na reakciji komercijalno dostupnog slobodnog radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH) i antioksidansa, pri čemu ljubičasto obojena otopina radikala prelazi u svijetložuto obojenu otopinu stabilne dijamagnetične molekule DPPH uslijed reakcije

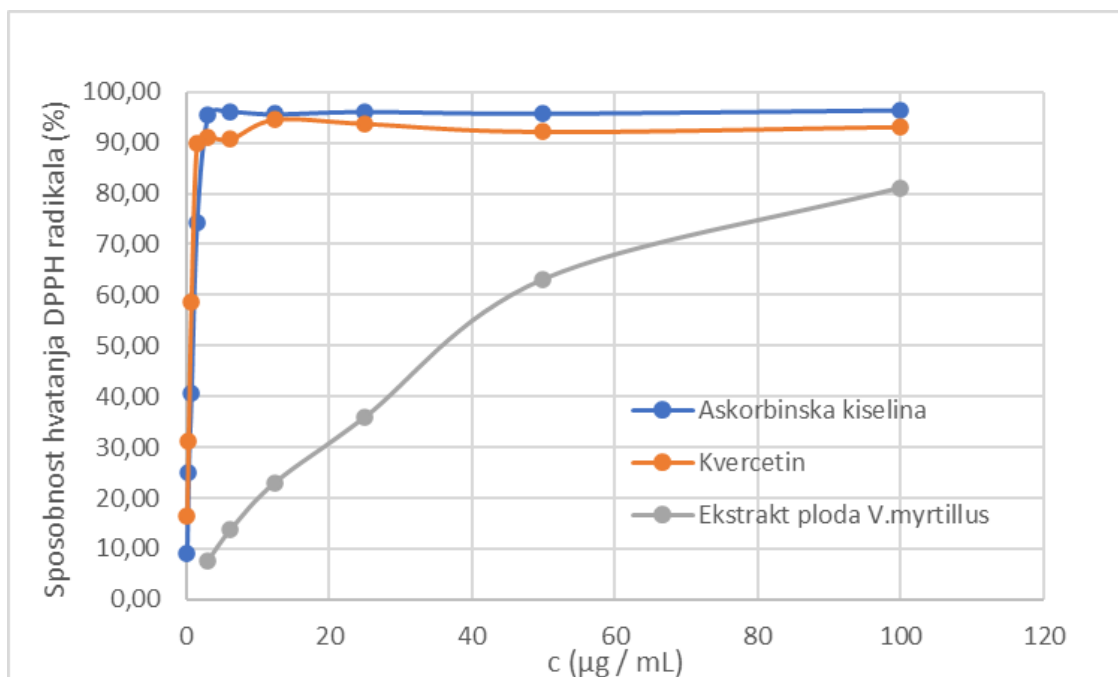
redukcije. Antioksidans pritom donira slobodni elektron ili vodik. Antiradikalna aktivnost ispitivanog spoja očituje se obezbojenjem otopine DPPH radikala, a apsorbanacija se mjeri na 517 nm (Kindl i sur., 2015).



Slika 8) Gašenje DPPH radikala karakterizirano je promjenom boje otopine iz ljubičaste u blijedožutu.

Tablica 2) Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodeno-etanolnog ekstrakta ploda borovnice, kvercetina i askorbinske kiseline – sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

Sposobnost hvatanja DPPH radikala (%)			
c (µg / mL)	Ekstrakt Myrtilli fructus siccus	Askorbinska kiselina	Kvercetin
400	80,88 ± 4,33	-	-
200	79,79 ± 11,51	-	-
100	81,03 ± 4,55	96,49 ± 0,04	93,07 ± 1,57
50	63,01 ± 10,44	95,85 ± 0,95	92,10 ± 3,39
25	35,83 ± 5,68	96,17 ± 0,49	93,71 ± 1,11
12,5	23,04 ± 3,38	95,69 ± 0,18	94,52 ± 0,03
6,25	13,71 ± 5,78	96,17 ± 0,04	90,66 ± 4,98
3,13	7,79 ± 0,49	95,37 ± 0,18	91,12 ± 3,46
1,56	-	74,32 ± 4,03	89,83 ± 1,64
0,78	-	40,64 ± 4,36	58,71 ± 0,72
0,39	-	24,92 ± 19,78	31,13 ± 1,45
0,20	-	9,18 ± 0,66	16,45 ± 1,29



Slika 9) Grafički prikaz ovisnosti postotka inhibicije DPPH* radikala o koncentraciji za ekstrakta suhog ploda borovnice, askorbinsku kiselinu i kvercetin.

Rezultati određivanja antiradikalne aktivnosti prikazani u tablici 2 pokazuju da standardni antioksidansi pokazuju snažan antioksidacijski učinak, te 90 %-tnu inhibiciju postižu već pri koncentraciji 3,13 µg/mL. Vodeno-etanolni ekstrakt suhog ploda borovnice 80 %-tnu inhibiciju pokazuje pri koncentraciji 100 µg / mL te se približava učinku standarda. Izračunata IC50 vrijednost za askorbinsku kiselinu iznosi $0,90 \pm 0,21$ µg/ L, za kvercetin $0,66 \pm 0,00$ µg/mL, a za testirani biljni ekstrakt $36,95 \pm 4,71$ µg/mL.

Tablica 3) Usporedni prikaz postignutih IC50 vrijednosti u antioksidacijskim testovima, izraženih kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

	IC50 (µg / mL)	
	Hvatanje NO radikala	Hvatanje DPPH radikala
Uzorak	1287,61 ± 119,11	36,95 ± 4,71
Askorbinska kiselina	78,68 ± 0,99	0,90 ± 0,21
Kvercetin	34,19 ± 5,47	0,66 ± 0,00

Iz navedenih rezultata uočljivo je da vodeno-etanolni ekstrakt suhog ploda borovnice pokazuje sposobnost inhibicije slobodnih radikala, ali pri znatno višim koncentracijama u odnosu na standardne antioksidanse askorbinsku kiselinu i kvercetin.

5. ZAKLJUČAK

Preliminarna fitokemijska analiza provedena metodom tankoslojne kromatografije ukazala je na prisutnost različitih skupina polifenolnih sastavnica u suhom plodu samonikle borovnice hrvatskog podrijetla. Utvrđeni su karakteristični TLC profili flavonoida i fenolnih kiselina te antocijana. Kvantitativnom analizom provedenom primjenom spektrofotometrijskih metoda utvrđeno je da droga *Myrtilli fructus siccus* sadrži $0,59 \pm 0,03$ % fenolnih kiselina, $1,61 \pm 0,03$ % antocijana, 0,93 % trjeslovina i $0,130 \pm 0,004$ % flavonoida. Antioksidacijska aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta borovničinog ploda utvrđena je na temelju sposobnosti inhibicije slobodnih radikala u dva provedena ispitivanja; test inhibicije NO radikala i DPPH radikala. Koncentracije pri kojoj je ekstrakt droge pokazao sposobnost 50 %- tne inhibicije, 1288 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 37 $\mu\text{g/mL}$, znatno su više u usporedbi sa standardima, askorbinskom kiselinom i kvercetinom, što upućuje na znatno slabiji antioksidacijski potencijal. Usprkos tome, antioksidacijski učinak ploda borovnice u očuvanju zdravlja ne treba zanemariti, a tome u prilog govore prethodno provedena istraživanja.

Analiza polifenolih spojeva borovnice ukazala je na visok udio antocijana, koji su zaslužni za privlačnu tamnoljubičastu boju ploda i njegovih ekstrakta te za biološke učinke. Zbog tih se svojstava plodovi borovnice koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao korigens boje i okusa, a u dodacima prehrani kao antioksidans u preventivne svrhe.

Provedeno istraživanje govori u prilog bogatom sadržaju bioaktivnih sastavnica i biomedicinskom potencijalu hrvatskog uzorka borovničinog ploda.

6. LITERATURA

- Arevström L, Bergh C, Landberg R, Wu H, Rodriguez-Mateos A, Waldenborg M, Magnuson A, Blanc S, Fröbert O. Freeze-dried bilberry (*Vaccinium myrtillus*) dietary supplement improves walking distance and lipids after myocardial infarction: an open-label randomized clinical trial. *Nutr Res*, 2019, 62, 13–22.
- Arora R, Sharma J, Selvamurthy W, Shivashankara A, Mathew N, Baliga M. Chapter 23 : Asian medicinal remedies for alleviating aging effects. U: Bioactive food as dietary interventions for the aging population. Watson R, Preedy V, urednici, London, Academic Press, 2013, str 305–320.
- Brasanac-Vukanovic S, Mutic J, Stankovic DM, Arsic I, Blagojevic N, Vukasinovic-Pesic V, Tadic VM. Wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) from Montenegro as a source of antioxidants for use in the production of nutraceuticals. *Molecules*, 2018, 23(8), 1864.
- Calò R, Marabini L. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *J Photochem Photobiol B*, 2014, 132, 27–35.
- Cassinese C, De Combarieu E, Falzoni M, Fuzzati N, Pace R, Sardone N. New liquid chromatography method with ultraviolet detection for analysis of anthocyanins and anthocyanidins in *Vaccinium myrtillus* fruit dry extracts and commercial preparations. *J AOAC Int*, 2007, 90, 911–919.
- Czizgle S, Bittner Fialova S, Toth J, Mučaji P, Nagy M. Treatment of gastrointestinal disorders: plants and potential mechanisms of action of their constituents. *Molecules*, 2022, 27(9), 2881.
- Domac R. Flora Hrvatske. Školska knjiga, Zagreb, str. 252.
- Drózdź P, Šežienė V, Pyrzynska K. Phytochemical properties and antioxidant activities of extracts from wild blueberries and lingonberries. *Plant Foods Hum Nutr*, 2017, 72, 360–364.

- EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 10. izdanje. Strasbourg, Council of Europe, 2020, str. 5731.
- ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy). Myrtilli fructus. U: ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, Online Series. Mills S, Hutchins R, urednici, Exeter, European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 2014, str. 1.
- Fang J. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*, 2015, 31, 1301–1306.
- Harput US, Genc Y, Khan N, Saracoglu I. Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Rec Nat Prod*, 2011, 5 (2), 100 - 107.
- Kähkönen MP, Heinämäki, J, Ollilainen V, Heinonen M. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci Food Agric*, 2003, 83, 1403–1411.
- Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir - Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015, ID 403950, 1 - 10.
- Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str. 398-399, 433, 439.
- Li D, Wang P, Luo Y, Zhao M, Chen F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57, 1729–1741.
- Miyake S, Takahashi N, Sasaki M, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. *Lab Investig*, 2012, 92, 102–109.
- Morazzoni P, Petrangolini G, Bombardelli E, Ronchi M, Cabri W, Riva A. SAMITAL®: a new botanical drug for the treatment of mucositis induced by oncological therapies. *Futur Oncol*, 2013, 9, 1717–1725.

- MSD priručnik dijagnostike i terapije: Šok, n.d., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/kriticna-stanja/sok-i-nadoknada-volumena/sok>, pristupljeno 05.12.2022.
- O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34, 185–204.
- Olivas-Aguirre FJ, Rodrigo-García J, Martínez-Ruiz NDR, Cárdenas-Robles AI, Mendoza-Díaz SO, Álvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA, De La Rosa LA, Ramos-Jiménez A, Wall-Medrano A. Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects. *Molecules*, 2016, 21, 1264.
- Pires TCSP, Caleja C, Santos-Buelga C, Barros L, Ferreira ICFR. *Vaccinium myrtillus* L. fruits as a novel source of phenolic compounds with health benefits and industrial applications - a review. *Curr Pharm Des*, 2020, 26, 1917–1928.
- Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL. Retinol-binding protein 4 and its relation to insulin resistance in obese children before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93, 2287–2293.
- Rimpapa Z, Toromanović J, Tahirović I, Sapcanin A, Sofić E. Total content of phenols and anthocyanins in edible fruits from Bosnia. *Bosn J basic Med Sci*, 2007, 7, 117–120.
- Sadeer NB, 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, 1–39.
- Smeriglio A, Barreca D, Giuseppina L, Ersilia B, Domenico T. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). U: Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements. Nabavi SM, Sanches Silva A, urednici, London, Academic Press, 2019, 159–163.
- Ștefănescu BE, Călinoiu LF, Ranga F, Fetea F, Mocan A, Vodnar DC, Crișan G. chemical composition and biological activities of the nord-west Romanian wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaves. *Antioxidants*, 2020, 9, 495.

- Thornthwaite JT, Thibado SP, Thornthwaite KA. Bilberry anthocyanins as agents to address oxidative stress. U: Pathology: Oxidative stress and dietary antioxidants. Preedy V, urednik, London, Academic Press, 2020, 179–187.
- Thumann TA, Pferschy-Wenzig E, Moissl-Eichinger C, Bauer R. The role of gut microbiota for the activity of medicinal plants traditionally used in the European Union for gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol*, 2019, 245, 112153.
- Upton J. AHP Monographs : Bilberry Fruit. U: The American Herbal Pharmacopoeia. Upton R, urednik, Santa Cruz, CRC Press, 2001, 1–25.
- Vanekova Z, Rollinger JM. Bilberries: Curative and Miraculous - A review on bioactive constituents and clinical research. *Front Pharmacol*, 2022, 13, 909914.
- Vladimir - Knežević S, Blažeković B, Bival - Štefan M, Kindl M. Praktikum iz farmakognoze 1. Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko - biokemijski fakultet, Zagreb, 2019, str. 1.
- Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Plant Drug Analysis, 2. izdanje. Heidelberg, Springer Berlin, 2001, str. 286-288.
- Welch CR, Wu Q, Simon JE. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Curr Anal Chem*, 2008, 4, 75–101.
- Zoratti L, Klemettilä H, Jaakola L. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Ecotypes. U: Nutritional composition of fruit cultivars. Simmonds M, Preedy V, urednici, London, Academic Press, 2016, 83–99.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav i antioksidacijska svojstva suhog ploda samonikle borovnice (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) koja raste u Hrvatskoj, te njenog vodenog-etanolnog ekstrakta. Metodom tankoslojne kromatografije u borovničinom plodu dokazana je prisutnost polifenolnih sastavnica. Spektrofotometrijskim metodama određen je sadržaj trjeslovina, fenolnih kiselina, antocijana i flavonoida u plodu i vodeno-etanolnom ekstraktu. Antioksidacijska aktivnost vodenog-etanolnog ekstrakta suhog borovničnog ploda procjenjena je na temelju sposobnost hvatanja NO i DPPH radikala i uspoređena sa učinkom standardnih antioksidansa. Utvrđeno je da je plod borovnice bogat izvor polifenolnih spojeva, posebice antocijana, i posjeduje antioksidativna svojstva. Dobiveni rezultati doprinose znanstvenim spoznajama o fitokemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti droge *Myrtilli fructus siccus* hrvatskog porijekla.

In this thesis, the phytochemical composition and antioxidant properties of the dry fruit of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) growing in Croatia, and its water-ethanol extract, were investigated. The presence of polyphenolic components in the bilberry fruit was proven by the method of thin-layer chromatography. The contents of tannins, phenolic acids, anthocyanins and flavonoids in the fruit and water-ethanol extract were determined by appropriate spectrophotometric methods. The antioxidant activity of the water-ethanol extract of dry bilberry fruit was evaluated based on the ability to scavenge NO and DPPH radicals and compared with the effect of standard antioxidants. It has been established that the bilberry fruit is a rich source of polyphenolic compounds, especially anthocyanins, and has antioxidant properties. The obtained results contribute to scientific knowledge on the phytochemical composition and biological activity of the herbal drug *Myrtilli fructus siccus* of Croatian origin

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognozijsku
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb

Diplomski rad

Polifenolne sastavnice i antioksidacijsko djelovanje droge *Myrtilli fructus siccus*

Barbara Martinko

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav i antioksidacijska svojstva suhog ploda samonikle borovnice (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) koja raste u Hrvatskoj, te njenog vodenog-etanolnog ekstrakta. Metodom tankoslojne kromatografije u borovničinom plodu je dokazana prisutnost polifenolnih sastavnica. Spektrofotometrijskim metodama određen je sadržaj trjeslovina, fenolnih kiselina, antocijana i flavonoida u plodu i vodeno-etanolnom ekstraktu. Antioksidacijska aktivnost vodenog-etanolnog ekstrakta suhog borovničnog ploda procijenjena je na temelju sposobnost hvatanja NO i DPPH radikala i uspoređena sa učinkom standardnih antioksidansa. Utvrđeno je da je plod borovnice bogat izvor polifenolnih spojeva, posebice antocijana, i posjeduje antioksidativna svojstva. Dobiveni rezultati doprinose znanstvenim spoznajama o fitokemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti droge *Myrtilli fructus siccus* hrvatskog porijekla.

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

Rad sadrži: 32 stranica, 9 grafičkih prikaza, 3 tablice i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: suhi plod borovnice, *Myrtilli fructus siccus*, polifenoli, antocijani, antioksidacijska aktivnost

Mentor: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

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

Dr. sc. Ana-Marija Domijan, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Rad prihvaćen: 14. rujan 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb

Diploma thesis

Polyphenolic compounds and antioxidant activity of *Myrtilli fructus siccus*

Barbara Martinko

SUMMARY

In this thesis, the phytochemical composition and antioxidant properties of the dry fruit of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) growing in Croatia, and its water-ethanol extract, were investigated. The presence of polyphenolic components in the bilberry fruit was proven by the method of thin-layer chromatography. The contents of tannins, phenolic acids, anthocyanins and flavonoids in the fruit and water-ethanol extract were determined by appropriate spectrophotometric methods. The antioxidant activity of the water-ethanol extract of dry bilberry fruit was evaluated based on the ability to scavenge NO and DPPH radicals and compared with the effect of standard antioxidants. It has been established that the bilberry fruit is a rich source of polyphenolic compounds, especially anthocyanins, and has antioxidant properties. The obtained results contribute to scientific knowledge on the phytochemical composition and biological activity of the herbal drug *Myrtilli fructus siccus* of Croatian origin.

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

Thesis includes: 32 pages, 9 figures, 3 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: wild bilberry dry fruit, *Myrtilli fructus siccus*, polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity

Mentor: **Biljana Blažeković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Blažeković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana-Marija Domijan, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 14th September 2022