Preliminarna studija utjecaja ekstrakcijskog otapala na sadržaj berberina i antiradikalnu aktivnost ekstrakata kore korijena žutike (Berberis vulgaris L.)

Jelačić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:358480

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Matea Jelačić

Preliminarna studija utjecaja ekstrakcijskog otapala na sadržaj berberina i antiradikalnu aktivnost ekstrakata kore korijena žutike (*Berberis vulgaris* L.)

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić.

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Marijani Zovko Končić na stručnom vodstvu, pruženoj pomoći, strpljenju i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmakognoziju na potpori te na korištenju sredstava i potrebne laboratorijske opreme Zavoda.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju koje su mi uvijek pružali tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD ... 1

1.1 ŽUTIKA ... 1

1.2 BERBERIN ... 2

1.3 OKSIDATIVNI STRES ... 2

1.3.1 PATOFIZIOLOGIJA OKSIDATIVNOG STRESA ... 3

1.3.2 ANTIOKSIDANSI I ANTIRADIKALNA AKTIVNOST ... 3

1.4 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVOROSTI (HPLC) ... 4

1.5 METODE EKSTRAKCIJE ... 5

1.5.1 MACERACIJA ... 5

1.5.2 ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA ... 5

2. OBRAZLOŽENJE TEME ... 6

3. MATERIJALI I METODE ... 7

3.1 BILJNI MATERIJAL ... 7

3.2 KEMIKALIJE ... 7

3.3 UREĐAJI ... 7

3.4 IZRADA EKSTRAKATA ... 7

3.4.1 IZRADA MACERATA ... 7

3.4.2 IZRADA ULTRAZVUČNIH EKSTRAKATA ... 8

3.4.3 KVANTIFIKACIJA BERBERINA ... 9

3.4.4 ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI ... 9

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 10

4.1 BAŽDARNI PRAVAC ... 10

4.2 SADRŽAJ BERBERINA U EKSTRAKTIMA ... 10

4.2.1 MACERACIJA SMJESOM VODE I ETANOLA ... 10

4.2.2 MACERACIJA SMJESOM VODE I GLICEROLA ... 13

4.2.3 ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA ... 15

4.2.4 USPOREDBA REZULTATA MACERACIJE I ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE ... 17

4.3 ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI ... 18

5. ZAKLJUČAK ... 20

6. LITERATURA 21
7. SAŽETAK/SUMMARY 23
7.1 SAŽETAK 23
7.2 SUMMARY 23

1. UVOD

1.1 ŽUTIKA

Berberis vulgaris L. (žutika) biljna je vrsta iz porodice Berberidaceae i široko je korištena u narodnoj medicini. Nalazi se na području južne Europe, sjeverozapadne Afrike i zapadne Azije. Žutika je listopadni grm koji raste u svijetlim šumama, po rubovima šuma i šikarama. Mlado drvo ima crvene grane koje kasnije odrvene i postanu sivkaste boje. Listovi su jajolikog oblika, naizmjenični i trepavičasto dlakavi smješteni u snopiće. Cvat čine viseći grozdovi dvospolnih cvijetova. Plodovi žutike su duguljaste crvene bobice koje dozrijevaju u kasno ljeto ili na jesen. Bogate vitaminom C i jestive, ali su izrazito kisele (Abd El-Wahab i sur., 2013).

B. vulgaris je bila poznata u ajurvedskoj, iranskoj i kineskoj tradicionalnoj medicini, te još u starom Egiptu gdje su plod žutike i sjemenke komorača koristili protiv zaraznih bolesti. Koristila se kod brojnih bolesti kao što su: dizenterija, kod jetrenih i žučnih oboljenja, malarije, reumatizma i kao opći tonik (Kosalec i sur., 2008).

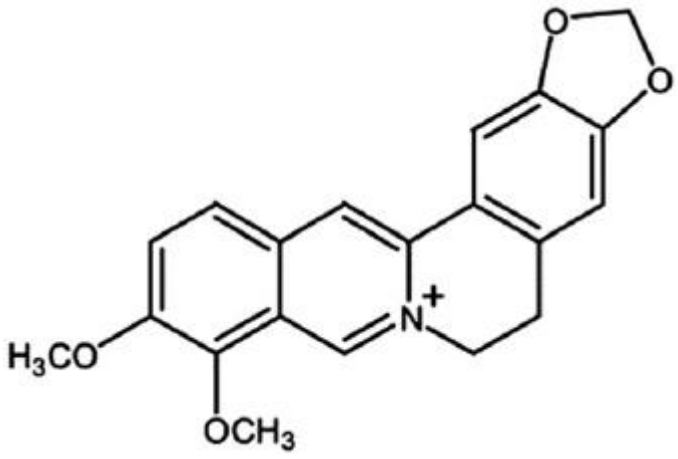
Korijen, stabljika i kora sadrže protoberberine i benzil-izokinolinske alkaloide od kojih je glavna aktivna tvar berberin (Abd El-Wahab i sur., 2013).



Slika 1. *Berberis vulgaris* L., Berberidacae, žutika (Izvor: www.plantea.com.hr)

1.2 BERBERIN

Berberin pripada skupini izokinolinskih alkaloida. Nalazi se u brojnim biljnim vrstama poput *Berberis* spp., *Coptis* spp., te u vrsti *Hydrastis canadensis*. Brojnim studijama je pokazan širok sektar djelovanja berberina od kojih treba istaknuti imnosupresivno, protuupalno, antidijabetsko, antimikrobno, vazorelaksirajuće i pozitivno inotropno djelovanje (Imanshahidi i Hosseinzadeh, 2008). Osim toga valja spomenuti i inhibicijsko djelovanje na acetilkolinesterazu što ga čini potencijalnim lijekom za Alzheimerovu bolest (Imanshahidi i Hosseinzadeh, 2016).



Slika 2. Berberin, kemijska struktura (Izvor: www.researchgate.net)

1.3 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres se javlja zbog poremećaja ravnoteže u produkciji reaktivnih kisikovih specija i djelovanja antioksidansa. Ima ključnu ulogu u oštećenju tkiva. Razlikujemo slobodne radikale (ROS) i neradikale. Slobodni radikali imaju nesparene elektrone u vanjskoj elektronskoj ljusci koji su odgovorni za njihovu aktivnost. Najznačajniji ROS su superoksid anion ($O_2^{-\cdot}$), hidroksil radikal (•OH) i hidrogen peroksid (H_2O_2). To su endogeni radikali, a postoje i egzogeni izvori slobodnih radikala kao što su dim cigarete, ioni teških metala, izloženost ozonu, hiperoksija (Birben i sur., 2012).

1.3.1 PATOFIZIOLOGIJA OKSIDATIVNOG STRESA

Ciljna mjesta djelovanja ROS su lipidi, proteini i DNA. Induciraju lipidnu peroksidaciju što dovodi do oštećenja lipidnih barijera i povećane permeabilnosti tkiva. Mogu uzrokovati degradaciju proteina oksidacijom aminokiselina zbog čega su podložnije djelovanju proteaza. Tome su najpodložnije aminokiseline metionin i cistein. DNA mogu oštetiti na nekoliko načina, od pucanja uzvojnice DNA, promjene kemijske strukture šećerne komponente ili baza do mutacija, delecija, translokacija. Sve ima značajnu ulogu u karcinogenezi, starenju, autoimunim bolestima te kardiovaskularnim oboljenjima (Birben i sur., 2012).

1.3.2 ANTIOKSIDANSI I ANTIRADIKALNA AKTIVNOST

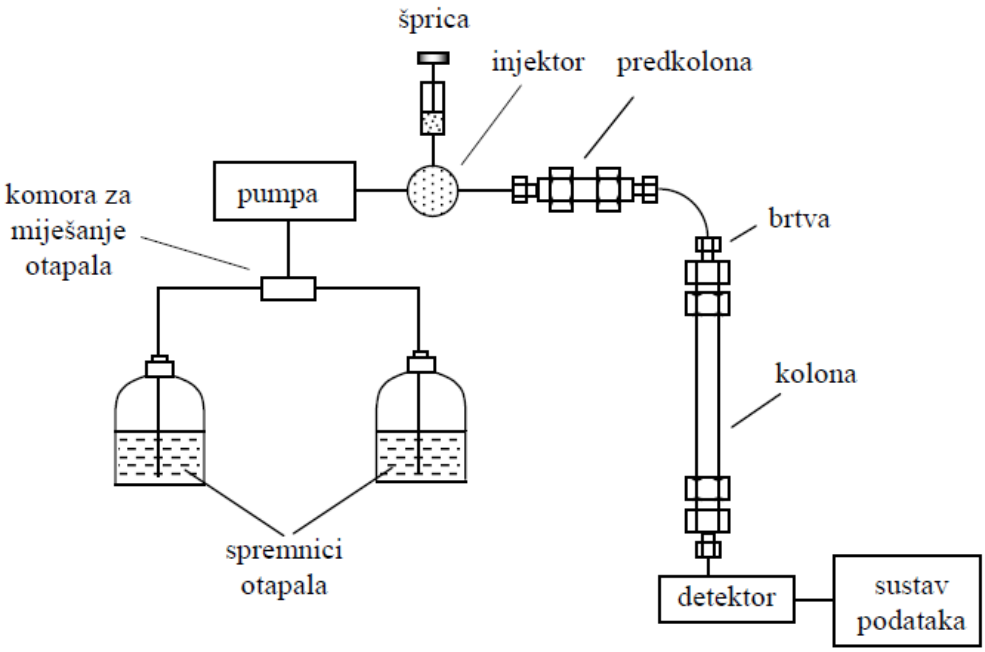
U tijelu postoje brojni antioksidativni mehanizmi kojima se organizam brani od slobodnih radikala. Antioksidansi se dijele na enzimske i neenzimske. Enzimski su: superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation transferaza i druge. Neenzimske čine različiti spojevi male molekulske mase, a to su intracelularni glutation (GSH) (tripeptid l-γ-glutamil-l-cisteinil-l-glicin), vitamin E (α-tokoferol), vitamin C (askorbinska kiselina) te β karoten (Kazazić, 2004).

Osim toga, brojni antioksidansi se nalaze u voću, povrću, raznim plodovima, biljnom ulju, medu, kavi te drugim namirnicama koje također imaju važnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa (Yashin, 2013).

1.4 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVOROSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornsti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je tehnika koja se danas najčešće koristi za kvantifikaciju spojeva. Odlikuje ju visoka preciznost, selektivnost te je automatizirana metoda koja se lako prilagođava analizi različitih vrsta spojeva (Watson,1999). Koristi se za odjeljivanje i određivanje polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi (Luterotti, 2012).

Osnovni dijelovi HPLC uređaja su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, pretkolona, kolona za odjeljivanje i detektor. Otapala mobilne faze moraju biti visoke čistoće. Pumpa ubacuje otapala pod tlakom kroz kolonu koja sadrži čestice stacionarne faze promjera 3-10 µm. Analit se pomoću injektora unosi u kolonu gdje dolazi do razdvajanja spojeva na temelju njihova vremena zadržavanja. Na kraju se nalazi detektor koji može biti spektroskopski, detektor flourescencije, detektor indeksa loma i elektrokemijski detektor koji prati značajke analita i kao rezultat se dobije kromatogram (Luterotti, 2012).



Slika 3. Shematski prikaz HPLC kromatografa (Izvor: Lutteroti, 2012)

1.5 METODE EKSTRAKCIJE

1.5.1 MACERACIJA

Maceracija je metoda iscrpljivanja aktivnih tvari iz biljnih droga. To je jednokratna ekstrakcija gdje se propisano usitnjena droga prelije ekstrakcijskim sredstvom te čuva u dobro zatvorenoj posudi, zaštićenoj od sunčeve svjetlosti onoliko dana koliko je propisano. Nakon toga se filtrira i dobiveni filtrat čini macerat. Maceracija je prikladna metoda ekstrakcije za slabo topljive, termolabilne tvari te tvari sklone bubrenju (Senjković, 2003.).

1.5.2 ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

Ultrazvučna ekstrakcija je metoda u kojoj se koristi ultrazvuk koji izaziva mehaničke titraje u biljnom materijalu. Na taj način se u vrlo kratkom vremenu mogu dobiti visokovrijedni ekstrakti djelatnih tvari. Način izvedbe je, slično kao kod maceracije, da se usitnjena biljna droga prelije ekstrakcijskim sredstvom. Zatim se stavi u ultrazvučnu kupelj tijekom propisanog vremena i pri propisanoj temperaturi te na kraju filtrira (Senjković, 2003.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Berberin je bioaktivni alkaloid kojeg se može naći u kori korijena žutike. Ljudi danas sve više teže liječenju ili održavanju zdravlja tradicionalnim biljnim lijekovima i ekstraktima. Većina biljnih ekstrakata izrađuje se pomoću etanola kao otapala koji ljudi ne preferiraju, posebice kada se radi o djeci i osobama starije životne dobi. U ovom radu uspoređena je učinkovitost maceracije berberina glicerolom i etanolom te ultrazvučne ekstrakcije berberina etanolom iz kore korijena žutike.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 BILJNI MATERIJAL

Ispitivana je kora korijena biljne vrste *B. vulgaris* koja je bila poklon fakultetu od tvrtke Suban (Hrvatska).

3.2 KEMIKALIJE

Za ispitivanje korištene su ove kemikalije: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), berberin klorid (≥98%), trietilamin te butilhidroksianisol (BHA; ≥98,5%) (Sigma-Aldrich,US). Acetonitril je bio stupnja čistoće za HPLC. Sve kemikalije bile su analitičke čistoće.

3.3 UREĐAJI

U ispitivanju korišteni su sljedeći uređaji: precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital 10P, Bandelin electronic, Njemačka), HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, USA), DAD detektor (Agilent Technologies 1260 Infinity), magnetska mješalica (Wisd Laboratory Instruments, Witeg Njemačka), čitač mikrotitarskih pločica (Awareness Technology Stat Fax 3200, SAD).

3.4 IZRADA EKSTRAKATA

3.4.1 IZRADA MACERATA

Izvagano je šest puta po 0,2 g usitnjene i osušene kore korijena žutike i prenesno u šest Erlenmayerovih tikvica sa ubrušenim čepom. U svakoj tikvici droga je prelivena sa 10 mL različitog otapala (voda, 50% i 100% etanol te 10%, 50% i 90% glicerol). Tikvice su nakon toga zatvorene čepom i parafinom te stavljene na tamno mjesto 72 h. Zatim je sadržaj tikvica filtriran kroz naborani filter papir. Uzorci su pohranjeni na 4 ºC. Jednodnevni macerati izrađeni su na isti način samo što su nakon prelijevanja droge tikvice stavljene na tamno mjesto na 24 h.

3.4.2 IZRADA ULTRAZVUČNIH EKSTRAKATA

U tri Erlenmyerove tikvice izvagano je 0,2 g usitnjene i osušene kore korijena žutike i preliveno sa 10 mL otapala (voda, 50% i 100% etanol). Nakon toga tikvice su stavljene na ultrazvučnu kupelj 20 min na 80 ºC pri jačini ultrazvuka 20%. Zatim je sadržaj tikvica filtriran kroz naborani filter papir. Uzorci su pohranjeni na 4 ºC.

Tablica 1. Skraćeni nazivi ekstrakata

Maceracija	**Otapalo**
MAC-GV19	Glicerol:voda (1:9)
MAC-GV11	Glicerol:voda (1:1)
MAC-GV91	Glicerol:voda (9:1)
Maceracija	**Otapalo**
MAC-V	Voda
MAC-VE	Voda:etanol (1:1)
MAC-E	Etanol
Ultrazvučna ekstrakcija	**Otapalo**
UZV	Voda
UZVE11	Voda:etanol (1:1)
UZE	Etanol

3.4.3 KVANTIFIKACIJA BERBERINA

Berberin je kvantificiran uporabom HPLC uređaja (Agilent 1200 series, Agilent Technologies, USA) na Zorbax eclipse XDB-C18 (4,6 mm × 250 mm, 5 μm) uz odgovarajuću pretkolonu i sa detektorom sa varijabilnim valnim duljinama. (Yi et al, 2004). Volumen injektiranja bio je 20 μL. Prije injektiranja, otopina standarda (0,2 mg/mL otopina berberina) i ekstrakti filtrirani su kroz PTFE filtar veličine pora 45 μm. Kao mobilna faza korištena je smjesa 25% acetonitrila te 0,02 mol/L H_3PO_4 prilagođeno na pH 4,82 pomoću trietilamina. Brzina protoka bila je 1,0 mL/min. Raspodjela i identifikacija pikova dobivena je usporedbom vremena zadržavanja i spektra pikova kromatograma uzorka sa vremenom zadržavanja i spektrom standarda. Kvantifikacija berberina provedena je pomoću baždarnog pravca standarda. Na y-osi je Area under the curve (AUC) berberinskog pika (proizvoljna jedinica), a na x- osi je masa berberina u uzorku (μg).

3.4.4 ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI

Ispitivanje antiradikalne aktivnosti (RSA, Radical scavenging activity) provedeno je pomoću DPPH slobodnog radilkala. Provedeno je prema literaturnom propisu (Zovko Končić i sur., 2011). Svježe pripremljena metanolna otopina DPPH (70 μL, 0,2 mg/mL) dodana je u 130 μL metanolne otopine ekstrakta (uzorka) ili metanolu (negativna kontrola). Smjesa je stavljena na tamno mjesto na sobnoj temperaturi. Nakon 30 min očitana je apsorbancija na 545 nm. BHA je korišten kao pozitivna kontrola.

RSA za DPPH slobodne radikale izračunato je prema formuli:

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

gdje je:

- $A_{control}$ apsorbancija negativne kontrole (pr. otopina DPPH bez dodanog uzorka)
- A_{sample} apsorbancija DPPH otopine sa ekstraktom

RSA je izračunat kao koncentracija ekstrakta koja hvata 50% slobodnih radikala DPPH prisutnih u otopini (RSA IC_{50}) i prikazan kao mg ekvivalenta biljnog materijala (HME- herbal material equivalent) po mL ekstrakta (mg HME/ml). Mjerenja su provedena u triplikatu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

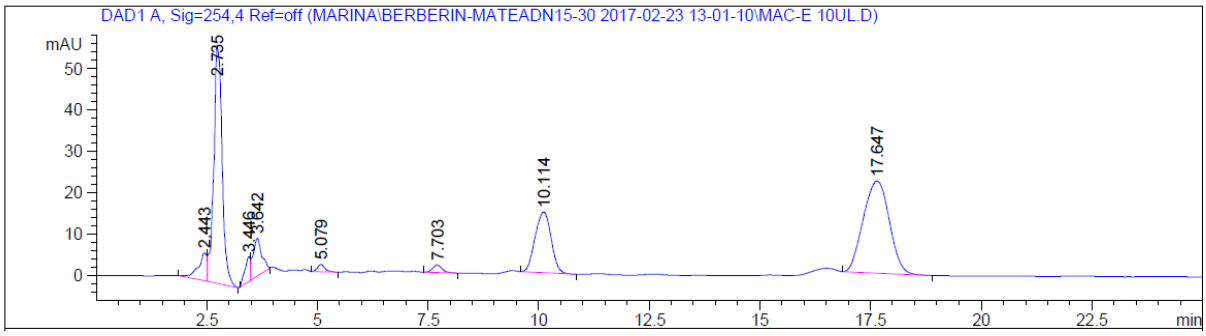
4.1 BAŽDARNI PRAVAC

Regresijskom analizom dobivena je jednadžba pravca: y = 2834,4x + 22,08, gdje je y površina ispod kromatografskog pika, a x je masa berberina u µg. Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) su određene prema propisu (Kleinschmidt, 2005). LOD i LOQ iznose 0,0186µg/mL i 0,0564µg/mL (Dulić, u izradi).

4.2 SADRŽAJ BERBERINA U EKSTRAKTIMA

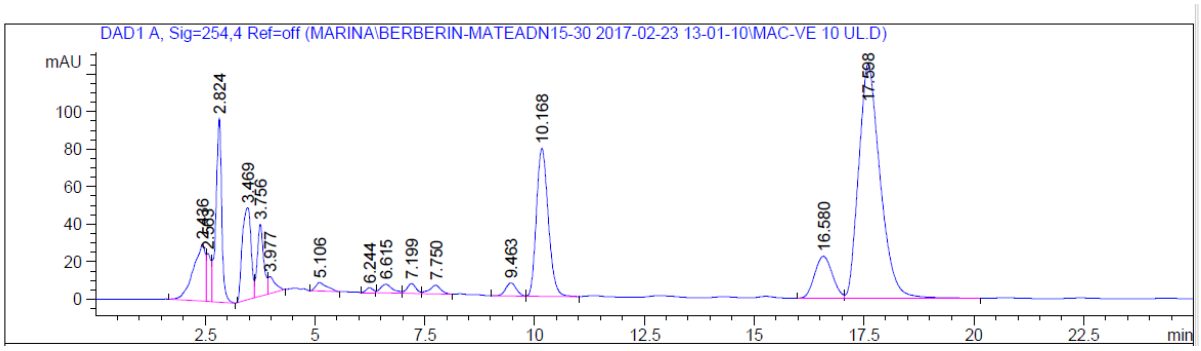
4.2.1 MACERACIJA SMJESOM VODE I ETANOLA

HPLC analizom jednodnevnih i trodnevnih vodeno-etanolnih macerata dobiveni su kromatogrami (Slike 4, 5, 6). Berberin je identificiran na osnovi vremena zadržavanja (t_R) i usporedbom UV spektra. Pomoću površine ispod krivulje (AUC) dobivena je koncentracija berberina u pojedinim ekstraktima.



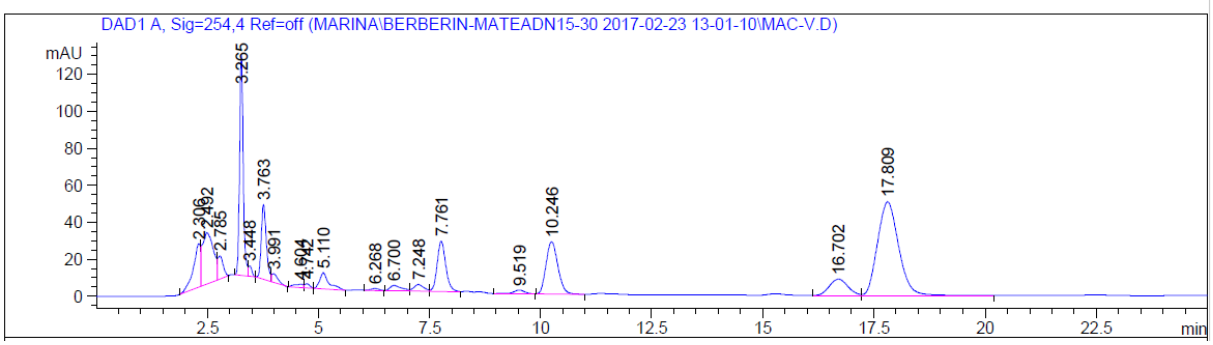
Slika 4. Kromatogram uzorka MAC-E na 254 nm

Usporedbom spektra i retencijskog vremena berberina u kromatogramu uzorka (Slika 4.) uočeno je da pik na 17,65 min pripada berberinu. Njegova AUC iznosila je 909,89 iz čega je određeno da je koncentracija berberina 82,03 µg/mL.



Slika 5. Kromatogram uzorka MAC-VE na 254 nm

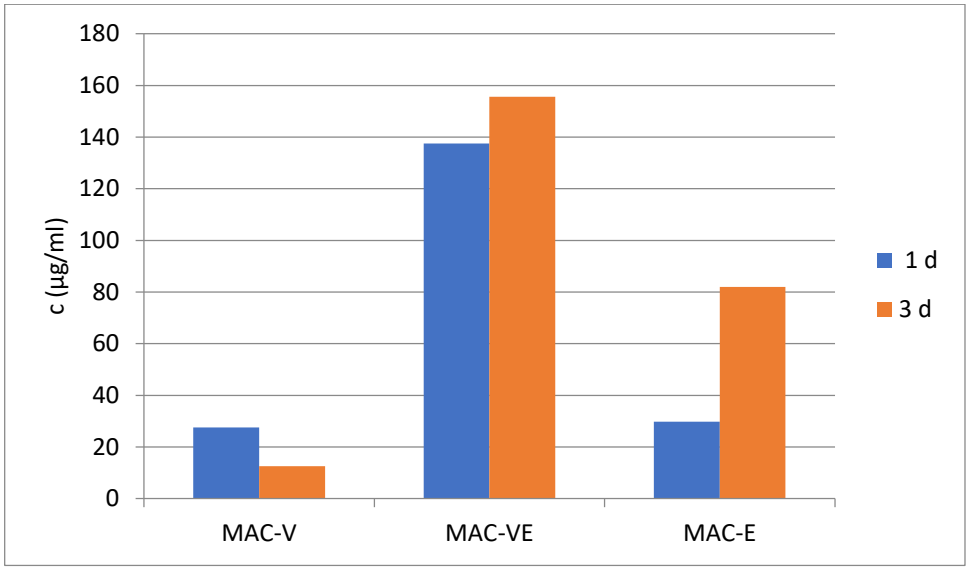
Usporedbom spektra i retencijskog vremena berberina u kromatogramu uzorka (Slika 5.) uočeno je da pik na 17,60 min pripada berberinu. AUC berberina iznosila je 4227,30 iz čega je određeno da je koncentracija berberina 155,57 µg/mL.



Slika 6. Kromatogram uzorka MAC-V na 254 nm

Prema spektru i vremenu zadržavanja berberina u kromatogramu uzorka (Slika 6.) uočeno je da pik na 17,81 min pripada berberinu. Njegova AUC iznosila je 1657,09 iz čega je određeno da je koncentracija berberina 12,57 µg/mL.

Usporedni rezultati ekstrakcije etanolom prikazani su u Grafu 1.



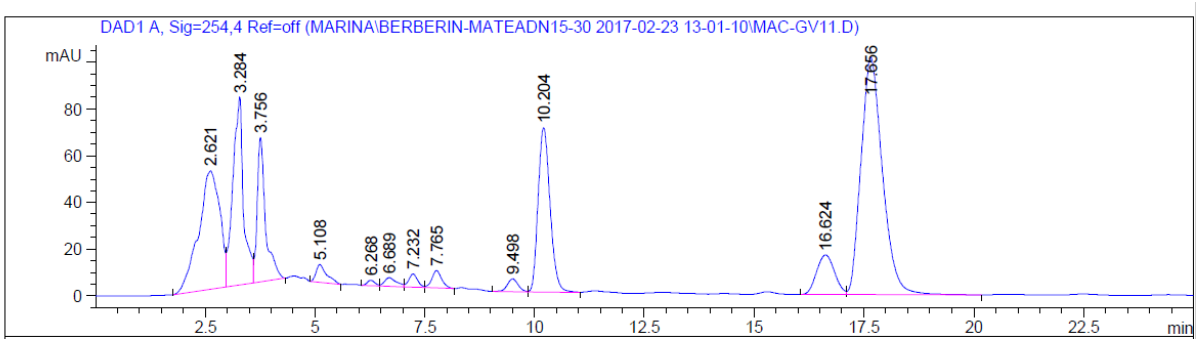
Graf 1. Koncentracija berberina u etanolnim i vodenim maceratima

Iz Grafa 1. je vidljivo da se berberin najbolje ekstrahira 50%-tnim etanolom (MAC-VE). Nešto je slabija ekstrakcija 100%-tnim etanolom (MAC-E), a najslabije je ekstrahiran samo vodom (MAC-V). Ono što je, također vidljivo iz grafa da se dužom maceracijom povećava koncentracija berberina u ekstraktima, osim u slučaju vode kao otapala.

4.2.2 MACERACIJA SMJESOM VODE I GLICEROLA

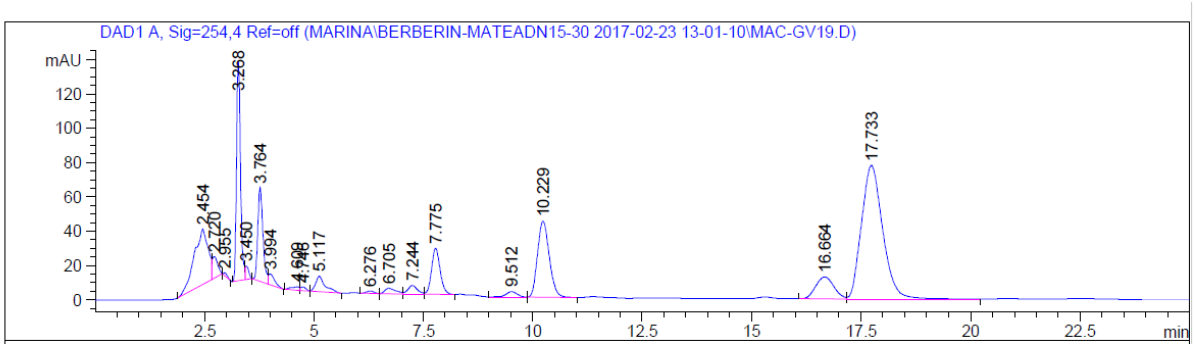
Glicerol je pogodno otapalo za izradu ekstrakata jer je netoksično, biorazgradivo, prikladno za primjenu na koži, prikladno za izradu ekstrakata za djecu te se proizvodi iz obnovljivih izvora (Wolfson i sur., 2006).

HPLC analizom jednodnevnih i trodnevnih vodeno-glicerolnih macerata dobiveni su kromatogrami (Slike 7, 8, 9). Napravljena je identifikacija berberina usporedbom retencijskog vremena (t_R) i UV spektra. Pomoću površine ispod krivulje (AUC) dobivena je koncentracija berberina u ekstraktima.



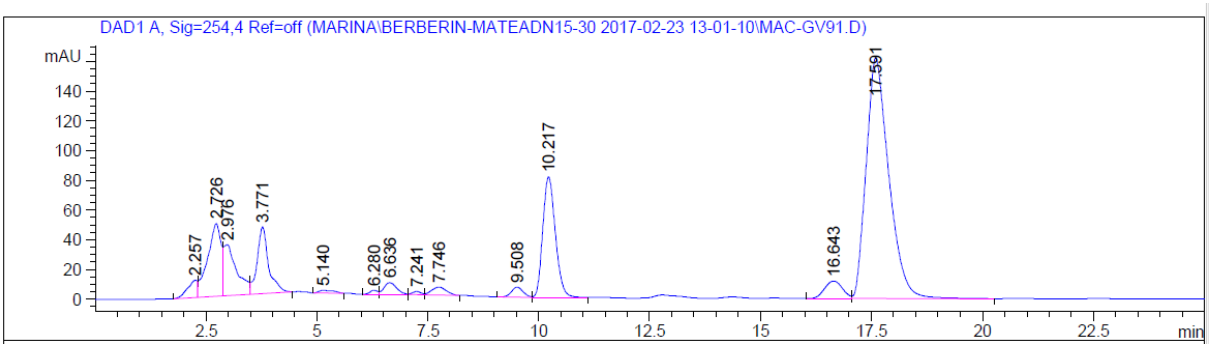
Slika 7. Kromatogram uzorka MAC-GV11 na 254 nm

Uočeno je da pik na 17,66 min (Slika 7.) pripada berberinu. AUC berberina iznosila je 3452,35 iz čega je određeno da koncentracija iznosi 76,83 µg/mL.



Slika 8. Kromatogram uzorka MAC-GV19 na 254 nm

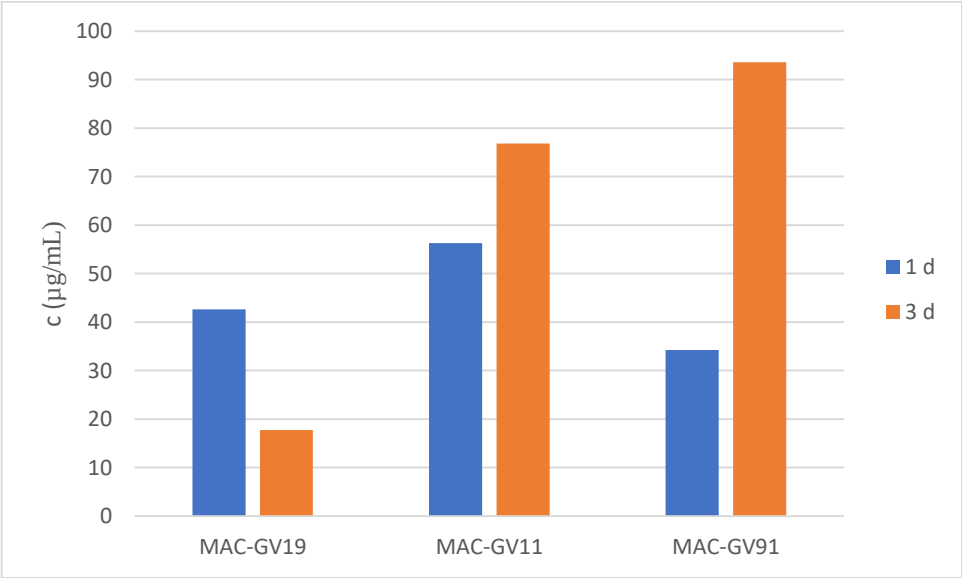
Kada se usporedi spektar i vrijeme zadržavanja berberina u kromatogramu uzorka (Slika 8.) vidljivo je da pik na 17,73 min pripada berberinu. Očitan je AUC koji iznosi 2612,18 te je prema tome određeno da je koncentracija berberina 17,72 µg/mL.



Slika 9. Kromatogram uzorka MAC-GV 91 na 254 nm

U kromatogramu uzorka (Slika 9.) uspoređeno je vrijeme zadržavanja i spektar berberina te je uočeno da pik na 17,59 min pripada berberinu. Njegova AUC iznosila je 5739,40 iz čega je određeno da je koncentracija berberina 93,26 µg/mL.

Usporedni rezultati ekstrakcije glicerolom prikazanu su u Grafu 2.



Graf 2. Koncentracija berberina u glicerolnim i vodenim maceratima

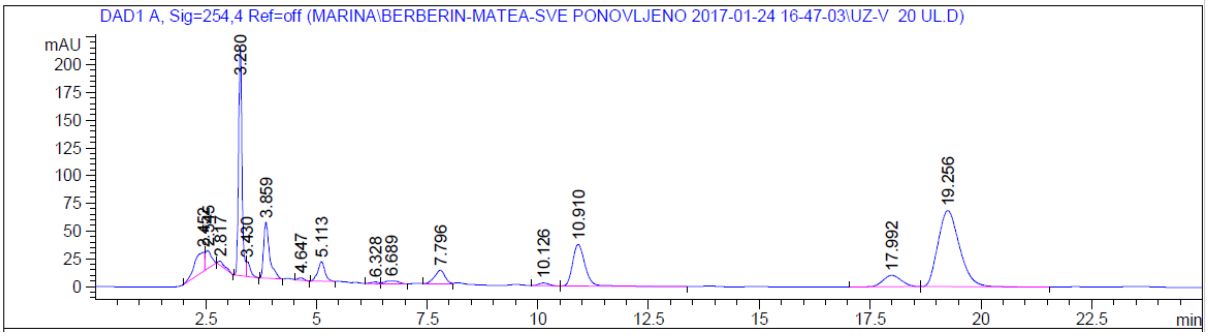
U Grafu 2. vidljivo je kako je najviše berberina ekstrahirano 90%-tnim glicerolom (MAC-GV91) trodnevnom maceracijom Može se zaključiti da se berberin dobro ekstrahira 50%-tnim glicerolom (MAC-GV11), a najmanje se ekstrahira 10%-tnim glicerolom (MAC-

GV19). Također se može zaključiti da se dužom maceracijom povećava koncentracija berberina u ekstraktima, samo ne u slučaju MAC-GV19.

4.2.3 ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

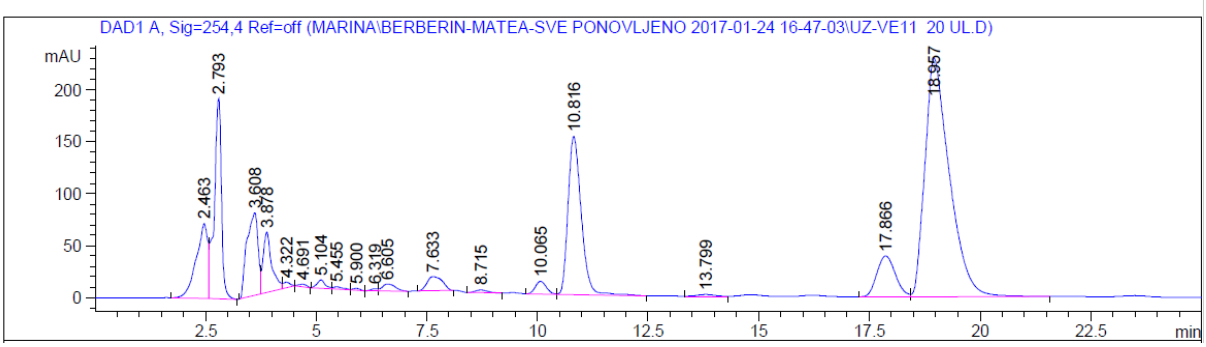
Ultrazvučna ekstrakcija je prikladna metoda za ekstrakciju prirodnih spojeva. Kako biljne stanice imaju čvrstu staničnu stijenku, ultrazvučna ekstrakcija se pokazala kao tehnika koja pojačava difuziju otapala u stanice i na taj način poboljšava ekstrakciju (Vinatoru, 2001).

HPLC analizom ultrazvučnih ekstrakata dobiveni su kromatogrami (Slike 10, 11, 12). Identifikacija berberina provedena je usporedbom UV spektra i vremena zadržavanja (t_R). Prema površini ispod krivulje (AUC) dobivena je koncentracija berberina u pojedinim ekstraktima.



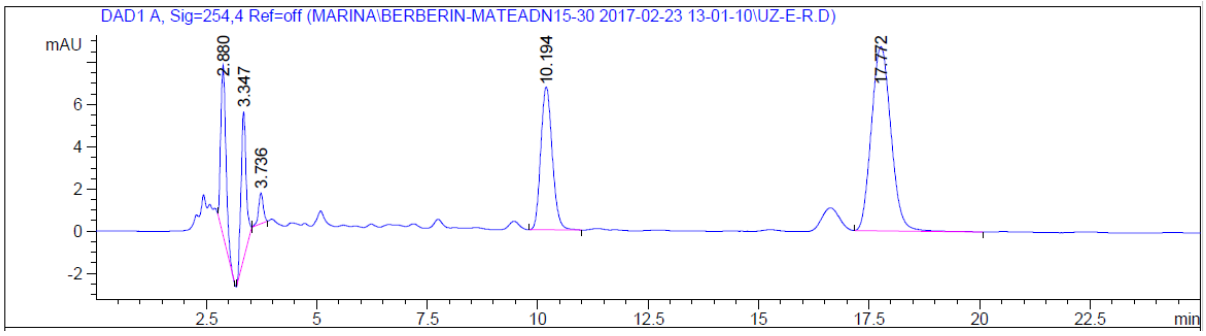
Slika 10. Kromatogram uzorka UZ-V na 254 nm

Prema usporedbi spektra i retencijskog vremena berberina u kromatogramu uzorka (Slika 10.) uočeno je da pik na 19,26 min pripada berberinu. Njegova AUC iznosila je 2322,92 iz čega je određeno da je koncentracija berberina 37,91 µg/mL.



Slika 11. Kromatogram uzorka UZ-VE11 na 254 nm

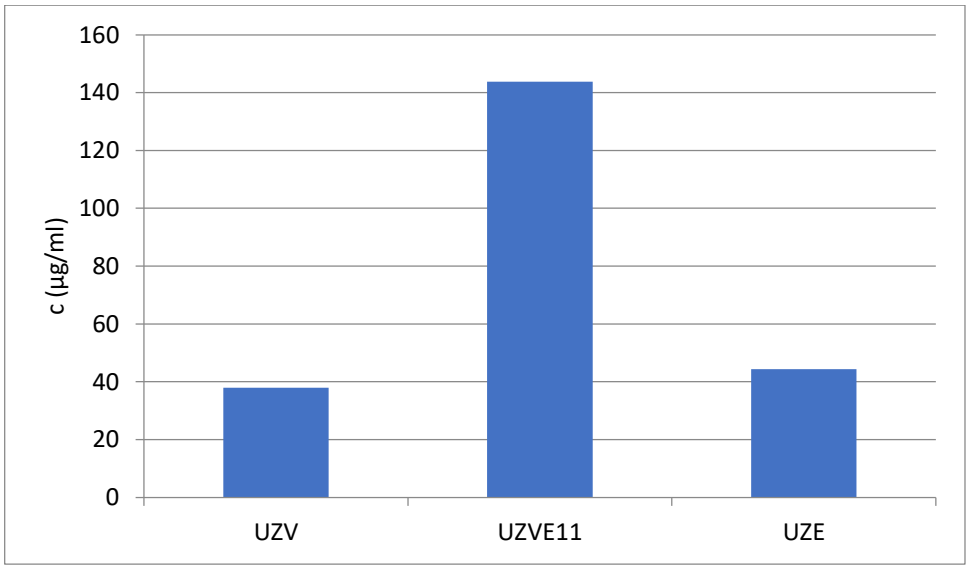
Usporedbom spektra i retencijskog vremena berberina u kromatogramu uzorka (Slika 11.) uočeno je da pik na 18,96 min pripada berberinu. AUC berberina iznosila je 8822,54 iz čega je određeno da je koncentracija berberina 143,8 µg/mL.



Slika 12. Kromatogram uzorka UZ-E na 254 nm

Usporedbom spektra i retencijskog vremena berberina u kromatogramu uzorka (Slika 12.) uočeno je da pik na 17,72 min pripada berberinu. Njegova AUC iznosila je 268,55 iz čega je određeno da je koncentracija berberina 44,34 µg/mL.

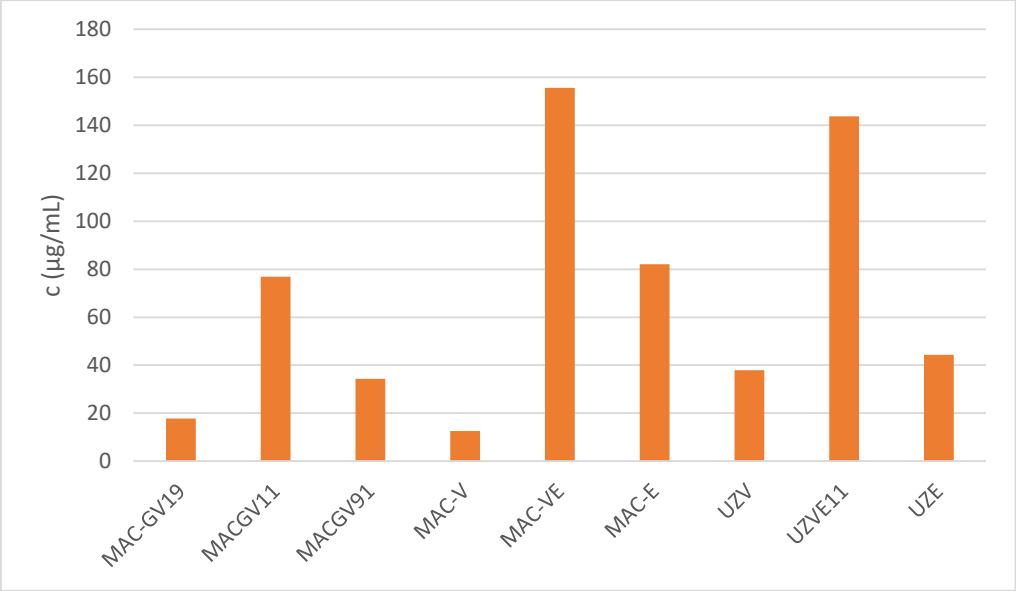
Usporedni rezultati ultrazvučne ekstrakcije etanolom prikazani su u Grafu 3.



Graf 3. Koncentracija berberina u ekstraktima priređenim ultrazvučnom ekstrakcijom

Ono što se može zaključiti iz Grafa 3. je da je najbolje otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju berberina 50%-tni etanol (UZVE11). Jednako kao i kod maceracije. Puno je slabija ekstrakcija 100%-tnim etanolom (UZE) te vodom (UZV).

4.2.4 USPOREDBA REZULTATA MACERACIJE I ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE



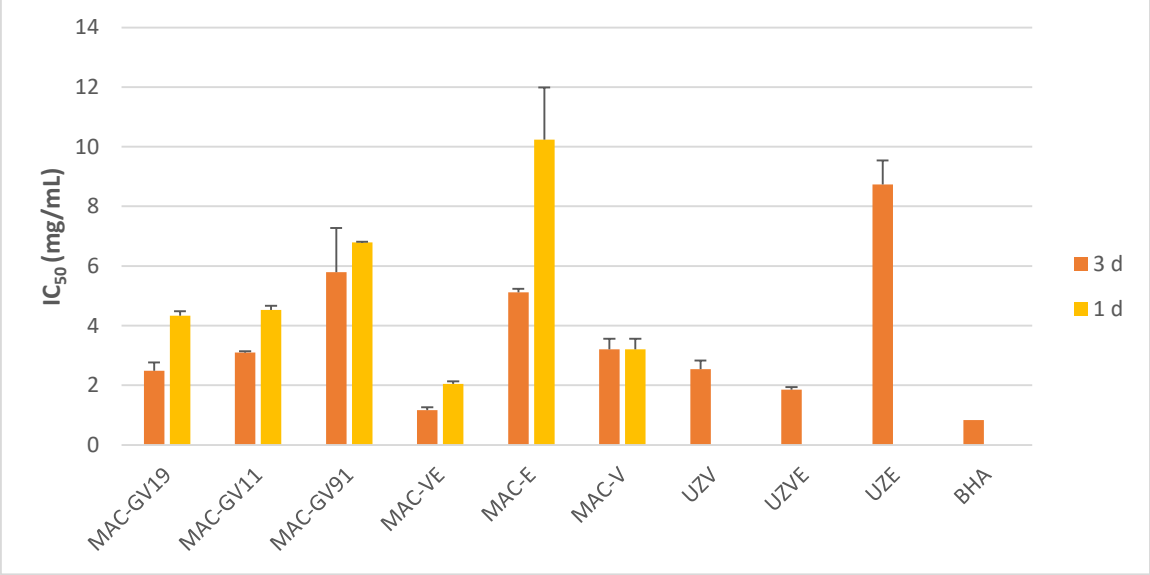
Graf 4. Koncentracija berberina u maceratima i ekstraktima priređenim ultrazvučnom ekstrakcijom

U Grafu 4. usporedbom koncentracija berberina dobivenih ekstrakcijom sa glicerolom i ekstrakcijom sa etanolom može se zaključiti da je glicerol dobro otapalo za ekstrakciju berberina, međutim ne toliko dobro kao etanol. Sa etanolom kao otapalom dobivene su puno više koncentracije berberina u ekstraktu. Kada se usporede vodeno-etanolni macerirani ekstrakti sa ekstraktima dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom da se zaključiti da se u puno kraćem vremenu mogu dobiti jednako vrijedni ekstrakti kao i maceracijom. Koncentracije berberina u ultrazvučnim i maceriranim etanolnim ekstraktima su približne. Vrijednost dobivenih rezultata ograničava činjenica da pokusi nisu rađeni u multiplikatu stoga dobivene vrijednosti nisu mogle biti statistički uspoređene.

4.3 ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI

Za određivanje antiradikalne aktivnosti korišten je DPPH, koji je slobodan radikal često korišten u ovoj metodi. Cilj ove metode je ispitati antioksidativna svojstva berberina. Metoda se temelji na redukciji slobodnog radikala DPPH, koji je stabilan na sobnoj temperaturi, u prisutnosti antioksidansa. Svježe pripremljena metanolna otopina DPPH je intenzivne tamno ljubičaste boje, čiji je maksimum apsorpcije na oko 520 nm (Kedare i Singh, 2011). U prisutnosti antioksidansa, dolazi do redukcije nesparenog elektrona na dušiku molekule DPPH, dok istodobno vodikov atom s antioksidansa prelazi na taj isti dušik i stvara se 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin te se pri tome otopina obezboji i dolazi do pada apsorbancije. Što je veći pad apsorbancije, to je veća antiradikalna akivnost.

Rezultati su prikazani kao vrijednost IC_{50} , što predstavlja koncentraciju (µg/mL) ekstrakta potrebnu da uništi 50% slobodnih radikala DPPH. Što je vrijednost IC_{50} veća, to je antiradikalna aktivnost manja.

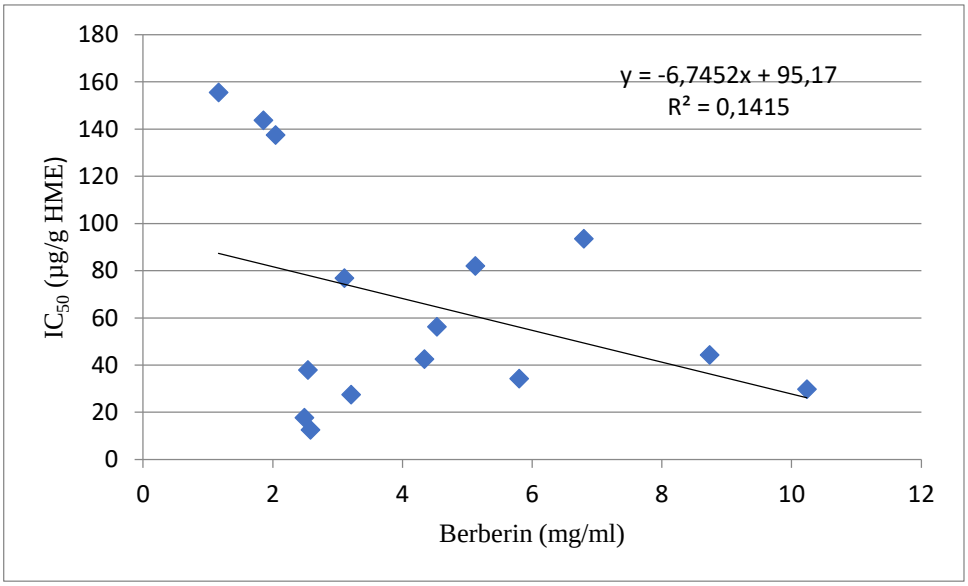


Graf 5. Antiradikalna aktivnost ispitivanih uzoraka (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD)

U Grafu 5. uspoređeni su ispitivani ekstrakati sa BHA, antioksidans koji je korišten kao pozitivna kontrola. Ono što se se može vidjeti da etanolni ekstrakti (MAC-E) imaju povišenu vrijednost IC_{50}, što bi značilo da imaju malu antiradikalnu aktivnost. Vodeno-etanolni ekstrakti

(MAC-VE;UZVE) su pokazali najveću antiradikalnu aktivnost, što se vidi prema najmanjim vrijednostima IC_{50}. MAC-GV19 i MAC-GV11 su imali podjednake IC_{50} vrijednosti, a najveće je imao ekstrakt MAC-GV91. Usporedbom IC_{50} vodeno-etanolnih ekstrakata sa glicerolnim vidljivo je da glicerolni ekstrakti imaju veće vrijednosti IC_{50}, samim time imaju manju antiradikalnu aktivnost. Iz ovoga se može pretpostaviti da se u vodenim i vodeno-etnolnim ekstraktima nalaze još neke tvari osim berberina koje pojačavaju antiradikalnu aktivnost. Ultrazvučni ekstrakti su pokazali iste rezultate kao i vodeno-etanolni macerati te potvrdli kako ekstrakti s etanolom imaju veću antiradikalnu aktivnost. BHA ima najmanji IC_{50}, odnosno u usporedbi s drugim ekstraktima ima najbolju antiradikalnu aktivnost. Niti jedan ekstrakt nije uspio pokazati bolji antiradikalni učinak od sintetskog BHA.

Kako su u vodeno-etanolnim ekstraktima (MAC-VE; UZVE) ekstrahirane najveće koncentracije berberina te su ti ekstrakti pokazali najveću antiradikalnu aktivnost, bilo je potrebno utvrditi ima li koncentracija berberina utjecaja na aktiradikalnu aktivnost ekstrakta. Izrađen je graf ovisnosti antiradikalne aktivnosti o koncentraciji berberina (Graf 6.).



Graf 6. Ovisnost antiradikalne aktivnosti o koncentraciji berberina

Iz Grafa 6. utvrđeno je da nema poveznice između koncentracije berberina u ekstraktima i antiradikalne aktivnosti. Koncentracija berberina nema utjecaja na antiradikalnu aktivnost.

5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je usporediti glicerolno- i etanolno-vodenu maceraciju kao metodu za ekstrakciju berberina iz kore korijena žutike. Nadalje, uspoređena je učinkovitost maceracije i ultrazvučne ekstrakcije pomoću vodeno-etanolnih otopina. Priređenim ekstraktima određena je antiradikalna aktivnost. HPLC analizom je utvrđeno da je glicerol dobro otapalo za ekstrakciju berberina, međutim ne toliko dobro kao etanol. Za ultrazvučnu ekstrakciju može se zaključiti da se u kraćem vremenu mogu dobiti bolji ili jednako vrijedni rezultati kao maceracijom. Spektofotometrijskim mjerenjem antiradikalne aktivnosti utvrđeno je da ekstrakti kore žutike imaju antiradikalni učinak, međutim puno je slabiji od učinka koje ima BHA. Antiradikalni učinak nije ovisio o koncentracji berberina.

6. LITERATURA

Abd El-Wahab AE, Ghareeb DA, Sarhan EM, Abu-Serie M, El Demellawy MA. In vitro biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13, 218.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*, 2012, 5 (1), 9-19.

Dulić M, Specijalistički rad, u izradi

Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituens, berberine. *Phytother Res*, 2008, 22, 999-1012.

Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberis vulgaris and berberine: An update review. *Phytother Res*, 2016, 30, 1745-1764.

Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2004, 55, 279-290.

Kedare SB and Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48 (4), 412-422.

Kleinschmidt G. Case Study: Validation of an HPLC-Method for Identity, Assay, and Related Impurities. In J. Ermer, & J. H. McB. Miller (Eds.), Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice ,Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2005, 195-212.

Kosalec I, Gregurek B, Kremer D, Zovko M, Sanković K, Karlović K. Croatian barbery (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine.analysis an antimicrobial activity. *World J Mircobiol Biotechnol*, 2009, 25, 145–50.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2012, str. 222-224.

Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb, Školska knjiga, 2003, str. 42-45.

Vilinski JR, Dumas ER, Chai HB, Pezzuto JM, Angerhofer CK, Gafner S. Antibacterial activity and alkaloid content of *Berberis thunbergii, Berberis vulgaris* and *Hydrastis canadensis*. P*harm Biol*, 2003, 41, 551-557.

Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem*, 2001, 8, 303-313.

Watson D. Pharmaceutical analysis. Glasgow, Chirchill livingstone, 1999, str. 4-6.

Wolfson A, Dlugy C, Shotland Y. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environ Chem Lett*, 2006, 5, 67-71.

Yashin A, Yashin Y, Wang JY, Nemzer B. Antioxidant and antiradical activity of coffee. *Antioxidants (Basel),* 2 (4), 230–245.

Yi L, Xu X. Study on the precipitation reaction between baicalin and berberine by HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 810, 165-168.

Zovko Končić M, Barbarić M, Perković I, Zorc B. Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas. *Molecules*, 2011, 16, 6232-6242.

Zovko Končić M, Kremer D, Karlović K, Kosalec I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberiss vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48, 2176-2180.

Zovko Končić M, Kremer D, Schuhly W, Brantner A, Karlović K, Kalođera Z. Chemical differentiation of *Berberis croatica* and *B. vulgaris* using HPLC fingerprinting. *Croat Chem Acta*, 2010, 83, 451-456.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1 SAŽETAK

U radu je korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) za usporedbu koncentracija berberina u etanolnim i glicerolnim ekstraktima kore korijena žutike (Berberis vulgaris L., Berberidaceae). Antiradikalna aktivnost ekstrakata ispitana je spektofotometrijski, hvatanjem slobodnog radikala DPPH u prisutnosti antioksidansa. Utvrđeno je da se berberin bolje ekstrahira etanolom, odnosno da etanolni ekstrakti imaju veći sadržaj berberina nego glicerolni. U spektofotometrijskom ispitivanju utvrđeno je da svi ekstrakti posjeduju relativno slabu antiradikalnu aktivnost u usporedbi s BHA. Najveću antiradikalnu aktivnost pokazao je vodeno-etanolni ekstrakt (MAC-VE; UZVE). Budući antiradikalna aktivnost nije ovisila o sadržaju berberina, pretpostavlja se da se, osim berberina, u biljnoj drogi nalaze još neke tvari koje imaju antioksidativnu aktivnost.

7.2 SUMMARY

In the study, HPLC was used to compare concentrations of berberine in ethanolic and glycerolic extracts made from barberry root bark (Berberis vulgaris L., Berberidaceae). Antiradical activity was determined spectrophotometrically, using the scavenging effect on DPPH free radical method. Extraction of berberine is better when ethanol is used as a solvent, rather than glycerol. Spectophotometric analysis of the extracts showed relatively low antiradical activity compared with the BHA. Extract with the mixture of water and ethanol used as solvent showed the highest activity. Since the antiradical activity was not dependent on berberice concentration, it may be assumed that this plant may contain other substances which have antioxidant activity

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Preliminarna studija utjecaja ekstrakcijskog otapala na sadržaj berberina i antiradikalnu aktivnost ekstrakata kore korijena žutike (*Berberis vulgaris* L.)

Matea Jelačić

SAŽETAK

U radu je korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) za usporedbu koncentracija berberina u etanolnim i glicerolnim ekstraktima kore korijena žutike (Berberis vulgaris L., Berberidaceae). Antiradikalna aktivnost ekstrakata ispitana je spektofotometrijski, hvatanjem slobodnog radikala DPPH u prisutnosti antioksidansa. Utvrđeno je da se berberin bolje ekstrahira etanolom, odnosno da etanolni ekstrakti imaju veći sadržaj berberina nego glicerolni. U spektofotometrijskom ispitivanju utvrđeno je da svi ekstrakti posjeduju relativno slabu antiradikalnu aktivnost u usporedbi s BHA. Najveću antiradikalnu aktivnost pokazao je vodeno-etanolni ekstrakt (MAC-VE; UZVE). Budući antiradikalna aktivnost nije ovisila o sadržaju berberina, pretpostavlja se da se, osim berberina, u biljnoj drogi nalaze još neke tvari koje imaju antioksidativnu aktivnost.

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

Rad sadrži: 23 stranice, 18 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: berberin, ultrazvučna ekstrakcija, maceracija, HPLC, glicerol

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Biljana Nigović, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Monika Barbarić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

A preliminary study of extraction solvent influence on berberine content and antiradical activity of barberry root bark extracts (*Berberis vulgaris* L.)

Matea Jelačić

SUMMARY

In the study, HPLC was used to compare concentrations of berberine in ethanolic and glycerolic extracts made from barberry root bark (Berberis vulgaris L., Berberidaceae). Antiradical activity was determined spectrophotometrically, using the scavenging effect on DPPH free radical method. Extraction of berberine is better when ethanol is used as a solvent, rather than glycerol. Spectophotometric analysis of the extracts showed relatively low antiradical activity compared with the BHA. Extract with the mixture of water and ethanol used as solvent showed the highest activity. Since the antiradical activity was not dependent on berberice concentration, it may be assumed that this plant may contain other substances which have antioxidant activity.

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

Thesis includes: 23 pages, 18 figures, 1 table and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: berberine, ultrasonic extraction, maceration, HPLC, glycerol

Mentor: **Marijana Zovko Končić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dr. sc. Biljana Nigović,, *Full professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dr. sc. Monika Barbarić, *Docent,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: september 2017.