

Fitokemijski sastav i biološki učinci ekstrakata listova borovnice

Ingula, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:621678>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-29**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Ingula

**FITOKEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI
UČINCI EKSTRAKATA LISTOVA
BOROVNICE**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija i izrađen na Zavodu za farmakognozijsko vodstvo dr. sc. Marijane Zovko Končić, izvanredne profesorice.

Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

SADRŽAJ

SADRŽAJ	3
1. UVOD	1
1.1. Biljna vrsta <i>Vaccinium myrtillus</i> L., Ericaceae (obična borovnica)	1
1.2. OKSIDATIVNI STRES	2
1.3. STARENJE KOŽE	4
1.4. TIROZINAZA	5
1.5. POLIFENOLI	5
1.6. FLAVONOIDI.....	6
1.7. FENOLNE KISELINE	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Materijali za ispitivanje	10
3.1.1. Biljni materijal.....	10
3.1.2. Kemikalije	10
3.1.3. Uređaji	10
3.2. Metode ispitivanja	11
3.2.1. Priprema ekstrakata	11
3.2.2. Određivanje suhe tvari u ekstraktima.....	11
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola.....	11
3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida	11
3.2.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina	12
3.2.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti	12
3.2.7. Određivanje sposobnosti inhibicije tirozinaze	12
3.2.8. HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida	13

3.2.9.	HPLC analiza arbutina	13
3.2.10.	TLC analiza arbutina	13
3.2.11.	Statistička obrada.....	14
4.	REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1.	Priprema etanolnih ekstrakata	15
4.2.	Određivanje ukupnih polifenola	16
4.3.	Određivanje ukupnih flavonoida	17
4.4.	Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....	19
4.5.	Određivanje antiradikalne aktivnosti.....	20
4.6.	Određivanje inhibicije tirozinaze.....	22
4.7.	HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida.....	23
4.8.	HPLC analiza arbutina.....	27
4.9.	TLC analiza arbutina	30
5.	ZAKLJUČAK	33
6.	LITERATURA.....	34
7.	SAŽETAK.....	36
8.	SUMMARY	37
9.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Biljna vrsta *Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae (obična borovnica)

Rod *Vaccinium* obuhvaća relativno velik broj biljnih vrsta, no u Hrvatskoj najraširenija je *Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae (obična borovnica) od koje se sakupljaju bobice kao sezonsko šumsko voće. Raste na tlu crnogoričkih i bjelogoričnih šuma srednje i sjeverne Europe, sjeverne Azije i Sjeverne Amerike, u nizinskim krajevima kao i planinskim područjima do 2000 m nadmorske visine. To je nizak, vrlo razgranjen listopadni grm visine 20-50 cm, čvorave stabljike i puzavog korijena sa okruglasto – jajolikim listovima. Pojedinačni okruglasto – zvonasti cvjetovi svijetlo su ružičasti i smješteni su u pazušcima listova. Cvate od lipnja do kolovoza nakon čega se razvija plod, sočna boba plavocrne boje, veličine graška (Slika 1). Borovnice su odličan izvor vitamina C, flavonoida, folne kiseline, kalija, kalcija i željeza. Zahvaljujući vlaknima korisne su pri dijetama za mršavljenje, jer stvaraju osjećaj sitosti. Plodovi, bobe sakupljaju se u srpnju i kolovozu, nakon sazrijevanja, suše se te koriste u svježem ili osušenom stanju protiv hemoroida, neuredne stolice i slabog teka. U svibnju i u jeseni sabiru se listovi koji se suše i iz kojih se izrađuju čajevi. Čaj od listova koristi se protiv povraćanja, proljeva, želučanih grčeva, kašlja i šećerne bolesti, a izvana za ispiranje sluzokože u ustima (Dujmović Purgar i sur., 2007).



Slika 1. Plodovi borovnice

Cijeli niz pozitivnih učinaka na zdravlje kao što je prevencija raka, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, pretilosti i bolesti urinarnog trakta pripisuje se fitokemijskim spojevima prisutnim u

plodovima borovnice poput antocijana i derivata hidroksicimetne kiseline te u nešto manjoj mjeri antocijanidinima, flavonoidima, kumarinima i iridoidima. Listovi su puno bogatiji fenolima što prati i veća antioksidativna aktivnost listova u usporedbi sa cvjetovima. Sadrže 0,8-6,7 % katehinskih trijeslovina, pentahidroksiflavone poput glikozida kvercetina i kemferola, iridoide, alkaloide, šećer, gume te klorogensku i druge fenolne kiseline. Arbutin i hidrokinon mogu se pronaći u tragovima ili nisu prisutni uopće. Može se pronaći visoki sadržaj mangana, kroma i vitamina C (Bujor i sur., 2016; Kuštrak, 2005; Willfort, 1974).

Listovi borovnice tradicionalno se koriste u snižavanju glukoze u krvi gdje im se djelovanje objašnjava sadržajem kroma ili flavonoida. Mogući mehanizmi kojima se to postiže su: inhibicija α -glukozidaze i α -amilaze (enzimi koji razgrađuju ugljikohidrate), utjecaj na metabolizam ugljikohidrata i lipida, smanjenje hiperglikemije, rezistencije na inzulin i dislipidemije, stimulacija β stanica, metabolizam adipoznog tkiva, smanjenje oksidativnog stresa i protuupalno djelovanje. Najodgovorniji za takvo djelovanje smatraju se flavonoidi i fenolne kiseline. Plodovi ne smanjuju razine glukoze u krvi, ali jačaju krvne žile i smanjuju njihovo oštećenje zahvaljujući antocijanima koji čine 90% ukupnih polifenola. Smatra se da koncentracija i udio pojedinih polifenola ovisi najviše o polarnosti ekstrakcijskog otapala, o staništu i uvjetima u kojima je biljka rasla, ali također i o prirodi kompleksa koje polifenoli mogu tvoriti s drugim biljnim spojevima kao što su ugljikohidrati i proteini (Brasanac-Vukanović i sur. 2018; Kuštrak, 2005; Willfort, 1974).

1.2. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres definira se kao poremećaj ravnoteže prooksidansa i antioksidansa pri čemu prevladavaju prooksidansi. Do neravnoteže dolazi ako je antioksidativna zaštita preslaba ili je stvaranje radikala pojačano. Slobodni radikali su atomi ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci, zbog čega imaju izraženu kemijsku reaktivnost i malu specifičnost za reaktante. Oni su proizvodi normalnog metabolizma pa su tako svi aerobni organizmi podložni njihovim oštećenjima. Neki od njih su npr. $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ i H_2O_2 koji su u stanicama prisutni u malim količinama, a zovu se reaktivne kisikove vrste (ROS –

engl.reactive oxygen species). Oni u organizmu imaju i pozitivnu ulogu kao drugi glasnici (*second messengers*) koji su uključeni u nadzor nad transkripcijom, proliferacijom ili smrću stanica. Iako nastaju u mnogim reakcijama u organizmu (kao posljedica ionizirajućeg zračenja, UV svijetla, lijekova, toksina, upalnih procesa), najvažniji izvor slobodnih radikala kisika su procesi oksidativne fosforilacije i ciklus limunske kiseline koji se odvijaju u mitohondriju. U tim procesima dolazi do prijenosa elektrona preko sustava citokroma C do kisika (O_2) koji se reducira te spaja s vodikom i nastaje molekula vode. No, 2-4% kisika završi u obliku superoksidnog radikala ($\bullet O_2^-$) koji je ishodna molekula za nastanak cijele skupine slobodnih radikala. U stanjima oksidativnog stresa dolazi do porasta ROS-a u organizmu ili tkivima koji onda oštećuju DNA, proteine i lipide stanične membrane. Na nukleinskim kiselinama slobodni radikali dovode do lomova lanaca, mijenjanja pojedinih baza ili krivog sparivanja baza. Mijenjaju strukturu i funkciju proteina adicijom karbonilnih grupa, fragmentacijom ili povezivanjem proteina. Svi slobodni radikali mogu reagirati s bilo kojom makromolekulom, ali najreaktivniji je hidroksilni radikal ($\bullet OH$). On odmah stupa u reakciju s bilo kojom molekulom kojoj može oduzeti vodikov atom. U toj početnoj reakciji nastane sekundarni radikal koji je stabilniji i nastavlja kaskadnu reakciju. Među najosjetljivijim makromolekulama su polinezasićene masne kiseline u staničnim membranama. Oduzimanjem vodika započinje lipidna peroksidacija. Krajnji produkti su toksični, primjerice, mutageni malondialdehid. Putem destabilizacije membrana, oštećenja DNA i oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL), slobodni radikali pridonose mutagenezi, karcinogenezi i koronarnim bolestima srca. Uključeni su u proces starenja i razvojne procese brojnih bolesti, kao što su: maligne bolesti, astma, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, neurodegenerativne bolesti, katarakta, upalne bolesti, bolesti bubrega, jetre, infektivne i druge (Halliwell, 2007; Kazazić, 2004; Medić-Šarić i sur., 2000).

Kao obrana od oksidativnog stresa, u našem organizmu postoje brojne molekule koje na razne načine djeluju kao svojevrsni hvatači radikala te na taj način neutraliziraju i gase reaktivne radikale koji su nastali. One u niskim koncentracijama mogu usporiti ili spriječiti oksidaciju drugih molekula sa slobodnim radikalima. Takve molekule nazivamo antioksidansima, a većinom su enzimi i vitamini. S obzirom na mjesto gdje djeluju mogu biti unutarstanični (enzimi poput superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze), membranski (liposolubilne tvari poput vitamina E, koenzima Q, β -karotena), izvanstanični (transferin, vitamin C, ceruloplazmin) i drugi (Gutteridge, 1995).

Iako organizam posjeduje brojne endogene mehanizme za smanjenje štetnog utjecaja ROS na stanice i tkiva, pravilnom prehranom u organizam se unose brojni egzogeni antioksidansi koji također pomažu organizmu u borbi protiv oksidativnog stresa. Brojnim studijama pokazano je da unošenje hrane bogate prirodnim fenolima jača taj obrambeni sustav. Zato je pozornost usmjerena na razvoj i izolaciju prirodnih antioksidansa iz biljnih izvora. To su fenolni spojevi (flavonoidi, fenolne kiseline i tanini), spojevi s dušikom (alkaloidi, aminokiseline, peptidi, amini), karotenoidi, tokoferoli, askorbinska kiselina i drugi (Amarowicz i sur., 2004).

1.3. STARENJE KOŽE

Starenje kože može se podijeliti na intrinzično i ekstrinzično starenje. Intrinzično se može definirati kao prirodno starenje kože uzrokovano gubitkom elasticiteta, dok je ekstrinzično uzrokovano izlaganju kože sunčenu UV zračenju. Starenje uključuje progresivni gubitak integriteta i fizioloških funkcija kože. UV zračenje dovodi do oksidativnog oštećenja lipida, proteina i DNA kože generirajući ROS koje aktiviraju mnoge enzime uključene u starenje kao što su kolagenaza, elastaza, tirozinaza i ksantin oksidaza. To dovodi do oštećenja tkiva dermisa i preuranjenog starenja, odnosno fotostarenja. Kronična izloženost UV zračenju uzrokuje eritreme, nastanak bora, promjenu u pigmentaciji kože i melazmu, supresiju imunskog sustava, upale, rak kože i smanjenu sposobnost zacjeljivanja rana. Obje vrste zračenja, i UV-A i UV-B, predominantno uzrokuju fotostarenje. Pokazano je da biljni polifenoli i flavonoidi mogu apsorbirati UV zračenja i kao takvi imaju potencijala da se koriste kao solarni filteri u novim formulacijama u zaštiti od sunca. Biljni spojevi se dugo istražuju kao prirodni antioksidansi i inhibitori enzima povezanih sa hiperpigmentacijama, upalama i raznim drugim kožnim bolestima. Iz tog razloga su veliki potencijal u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u borbi protiv preranog starenja kože (Biswajit i sur., 2017).

1.4. TIROZINAZA

Tirozinaza je enzim monooksigenaza koja sadrži bakar u aktivnom mjestu, poznata i kao polifenol oksigenaza. Katalizira reakciju hidroksilacije monofenola u *o*-difenoale i oksidaciju *o*-difenola u *o*-kinone. Nastali kinoni su vrlo reaktivni spojevi koji mogu spontano polimerizirati u smeđe pigmente visoke molekularne mase (melanin) ili reagirati s aminokiselinama i proteinima te pojačavati smeđu boju nastalom pigmentu.

Melanin je široko rasprostranjen enzim u biljnom i životinjskom svijetu. U biljkama je odgovoran za nepoželjno tamnjenje oštećenog voća i povrća te tako stvara problem u prehrambenoj industriji. U ljudskom organizmu odgovoran je za prirodnu boju kože i kose. Međutim, prekomjerno nakupljanje melanina može uzrokovati melazmu, staračke pjege i akutno oštećenje. Biosinteza melanina može biti zaustavljena inhibicijom tirozinaze. Za izbjeljivanje kože prije se propisivao 1,4-dihidrokinon, ali je otkriveno da može inducirati mutacije jer utječe na sintezu DNA i RNA i može djelovati citotoksično na melanocyte. Iz tog razloga istražuju se sigurniji i potentniji inhibitori tirozinaze. Mikroorganizmi i biljke su glavni izvori prirodnih inhibitora. Neki od biljnih produkata koji su pokazali željenu aktivnost inhibicije su flavonoidi, nezasićene masne kiseline kao linolenska i oleinska, p-kumarna kiselina, eugenol, β -sitosterol i stigmasterol i drugi (Biswajit i sur., 2017; Boqiang i sur., 2005).

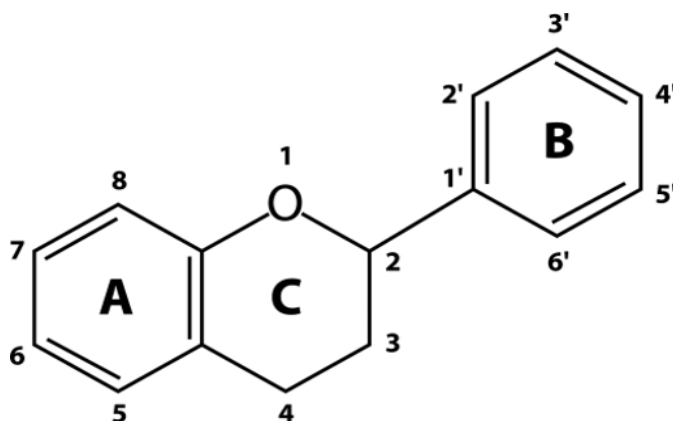
1.5. POLIFENOLI

Polifenoli su bioaktivni biljni produkti, raznolika skupina sekundarnih metabolita, uključeni u brojne metaboličke procese. Najčešće su prisutni u listovima, cvjetovima i drvenastim dijelovima biljaka. Zbog kemijskih svojstava fenolne skupine djeluju kao donori vodika te imaju jako visoku antioksidativnu aktivnost. Stupaju u reakcije sa slobodnim radikalima i na taj način smanjuju njihov štetni utjecaj (Amarowicz i sur, 2004).

Zastupljenost i raznolikost fenolnih spojeva u biljnom svijetu je velika. S obzirom na strukturne karakteristike polifenola razlikujemo fenolkarboksilne kiseline i derivate, flavonoide, kumarine, lignane, trjeslovine i antranoide (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).

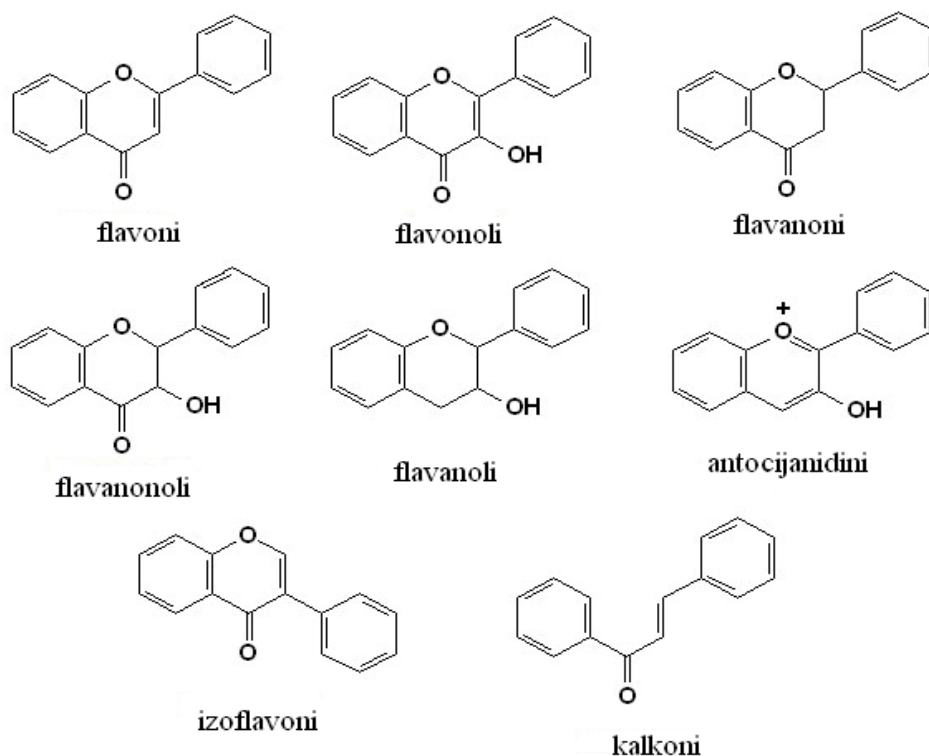
1.6. FLAVONOIDI

Flavonoidi su jedna od skupina polifenola. To su ubikvontirani spojevi, najrašireniji sekundarni produkti biljnog metabolizma i životinjski organizam ih ne može sintetizirati te se moraju unositi hranom. Sačinjeni su od nešećernog dijela, fenolnog aglikona, na koji je vezan jedan ili više šećera. Posjeduju antioksidativnu i andtiradikalnu aktivnost (Kazazić, 2004; Heim i sur., 2002; Toplak Galle, 2001). Osnovna struktura je difenilpropan, dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem, koji obično tvori heterociklički prsten s atomom kisika (Slika 2). Iz te osnovne strukture može nastati flavan i druge osnovne strukture: flavanoni, flavan-3-oli (katehini), flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini, izoflavoni (Slika 3) (Kazazić, 2004; Havsteen, 1983). Flavoni i flavanoli imaju dvostruku vezu na položaju 2-3, a izoflavonoidi fenilnu skupinu vezanu na položaju 3. Flavani uključuju katehine, leukoantocijanidine, proantocijanidine i tanine, a dolaze u obliku mono-, di- i tri-mera. Do danas je identificirano više od 4000 spojeva.



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida

Pojavljaju se najčešće u glikozidnoj formi (C3 i C7 O-glikozidi). Brojne strukturne varijante proizlaze iz različitog stupnja oksidacije heterocikličkog prstena, različitih supstituenata na aromatskim prstenima, te različitih vrsta i položaja šećera na aglikonskim komponentama (Bruneton, 1999). Supstituenti se najčešće nalaze na položajima 5, 7, 3', 4' i 5'. Na položajima 3 i 7 vežu se šećeri (uglavnom ramnoza, glukoza, glukuramnoza, galaktoza i arabinoza) i tako nastaju glikozidi (Kazazić, 2004; Cao i sur., 1997).



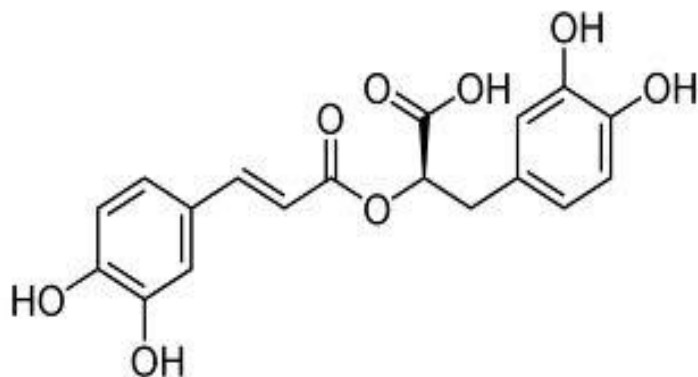
Slika 3. Osnovne strukture flavonoida

Antioksidativna aktivnost temelji se na primanju nesparenih elektrona slobodnih radikala, doniranju vodikovog atoma, keliranju iona prijelaznih metala (uglavnom bakra i željeza), aktiviranju antioksidacijskih enzima, inhibiranju oksidaze i sinergističkom djelovanju s fiziološkim antioksidansima (Czaplinska i sur., 2012). Aktivnost ovisi o rasporedu i vrsti supstituenta, planarnosti molekule te broju i vrsti vezanih šećera.

Uz antioksidativno djelovanje, imaju i antiviralno, antibakterijsko, antitumorsko, antialergijsko i antiupalno djelovanje. Mogu inhibirati razvoj neurodegenerativnih bolesti i djelovati protektivno protiv ionizirajućeg i UV-zračenja. Od drugih djelovanja imaju i spazmolitsko, diuretsko, koleretsko i dijaforetsko djelovanje (Czaplinska i sur., 2012; Kuštrak, 2005; Kazazić, 2004; Toplak Galle, 2001).

1.7. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline prisutne u biljnim drogama dijele se na hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline. Dolaze u slobodnom obliku, obliku estera ili glikozida. Osnovu strukture hidroksibenzojevih kiselina čini C_6-C_1 jedinica, a međusobno se razlikuju po hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena (npr. galna i vanilinska kiselina). Osnova hidroksicimetnih kiselina je C_6-C_3 jedinica. Najčešće među njima su kavena i kumarinska. Uglavnom su prisutne u obliku estera (npr. klorogenska i ružmarinska kiselina), a rjeđe u slobodnom obliku. Ružmarinska kiselina je ester kavene kiseline i 3,4-dihidroksifenilmlječne kiseline, a karakteristična je sastavnica droga koje se dobivaju iz biljnih vrsta porodice Lamiaceae (Slika 4). Djeluje protuupalno i antioksidativno (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).



Slika 4. Ružmarinska kiselina

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U našem organizmu nastaju brojni slobodni radikali oksidoredukcijskim reakcijama. Oni su prirodni normalni produkti metabolizma i naš organizam ima odgovarajuće mehanizme kojima ih drži pod kontrolom. Ipak, zbog raznih okološnih čimbenika često odnos antioksidansa i slobodnih radikala nije u ravnoteži te nastaje stanje koje se naziva oksidativni stres. Nebrojeno puta je dokazano da je oksidativni stres u osnovi starenja te brojnih kroničnih bolesti današnjice kao što su ateroskleroza, dijabetes, artritis, karcinomi i neurodegenerativne bolesti. Egzogeni uzročnici oksidativnog stresa, naročito UV zračenje, koji generiraju ROS mogu aktivirati i enzime u koži povezane sa kožnim bolestima i starenjem kao što je tirozinaza. Zbog dokazane toksičnosti sintetskih antioksidansa kao i sintetskih inhibitora tirozinaze, njihova se svakodnevna upotreba izbjegava. Iz tog razloga sve veća pozornost se pridaje prirodnim spojevima biljnog podrijetla, polifenolima, koji imaju veliku antioksidativnu moć.

Cilj ovog rada bio je ispitati razliku u fitokemijskom sastavu jedanaest uzoraka listova borovnice sakupljenih u Hrvatskoj i Crnoj Gori, njihovu antioksidativnu aktivnost te sposobnost inhibicije tirozinaze. Također se HPLC metodom htjela utvrditi prisutnost arbutina, budući da su literaturni podaci o tome podvojeni.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali za ispitivanje

3.1.1. Biljni materijal

Ispitivani su osušeni listovi jedanaest različitih uzoraka biljne vrste *Vaccinium myrtillus* sabranih na različitim područjima Hrvatske i Crne Gore.

3.1.2. Kemikalije

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije: destilirana voda, etanol, metanol (T.T.T., Njemačka), nitrit-molibdat reagens (MP Biomedicals Inc., SAD); 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), aluminijev klorid heksahidrat, arbutin $\geq 98\%$, diklorokinonklorimid, Folin-Ciocalteu reagens, galna kiselina 97%, kavena kiselina $\geq 98\%$, klorogenska kiselina $\geq 95\%$, kvercetin dihidrat 98%, *p*-kumarna kiselina $\geq 98\%$, *tert*-butil-4-hidroksianisol (BHA), tirozinaza iz gljiva (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD); natrijev hidroksid (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb); natrijev karbonat (Zorka, Šabac); klorovodična kiselina (Poch, Poljska); hiperozid 98% (Indofine Chemical Company); L-DOPA (Cayman Chemical Company, USA); etilacetat, metanol, mravlja kiselina HPLC čistoće (Scharlau, Španjolska).

3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje biljnog materijala (UD Corporation, SAD); sušionik (Instrumentaria, Zagreb); precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska); ultrazvučna kupelj (Sonorex digital 10P, Bandelin electronic, Njemačka); UV/VIS spektrofotometar (Perkinelmer, SAD); čitač mikrotitarskih pločica (Awareness technology inc., SAD); HPLC (Agilent 1200 serija, Agilent Technologies, USA) s autosamplerom i VWD detektorom.

3.2. Metode ispitivanja

3.2.1. Priprema ekstrakata

Osušeni uzorci listova borovnice samljeveni su u prah. U Erlenmeyerove tikvice je odvagano 0,1 g droge i preliveno sa 15 mL ekstrakcijskog otapala (60% etanol). Ekstrakcija je izvršena na sobnoj temperaturi ručnim miješanjem. Nakon toga uzorci su profiltrirani u staklene bočice. Vodeni ekstrakti priređeni su na jednak način, ali je omjer droge i ekstrakcijskog otapala bio 1:10.

3.2.2. Određivanje suhe tvari u ekstraktima

Količina suhe tvari određena je prema Općem propisu Farmakopeje. Na vodenoj kupelji je 4 mL ekstrakta upareno do suha, a ostatak je isušen u sušioniku na 100-105 °C, 3 sata. Suhi ostatci ohlađeni su u eksikstoru 2 sata te odvagnuti. Rezultat je izražen kao maseni udio. (Eur.Ph. 9.5)

3.2.3. Određivanje ukupnih polifenola

Određivanje polifenolnih spojeva u ekstraktima rađeno je prema modificiranom propisu po Singeltonu (Singleton i sur., 1999). Uzeto je 80 µL otopine ekstrakta te dodano po 80 µL Folin Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđenog vodom u omjeru 1:3) i 10 % otopine natrijevog karbonata. Nakon 1 sata inkubacije na sobnoj temperaturi na tamnom izmjerena je apsorbancija na 630 nm. Količina ukupnih polifenola određena je pomoću baždarnog pravca galne kiseline. Rezultati određivanja prikazani su kao ekvivalenti galne kiseline u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta..

3.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje flavonoida u ekstraktima provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu Kumazawa (Kumazawa i sur., 2004). U jažice je pipetirano 120 µL otopine ekstrakta, a zatim je dodano 120 µL 0,2%-tne metanolne otopine AlCl₃. Nakon 1 sata inkubacije na sobnoj temperaturi na tamnom izmjerena je apsorbancija na 405 nm. Sadržaj flavonoida određen je pomoću baždarnog pravca 20%-tne metanolne otopine kvercetin dihidrata. Rezultati određivanja prikazani su kao ekvivalenti kvercetina u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta.

3.2.5. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih kiselina u ekstraktima provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu iz Europske farmakopeje (Eur. Ph. 9.5) za određivanje derivata ružmarinske kiseline u listu ružmarina. U jažice mikrotitarske ploče stavljeno je 100 μ L otopine ekstrakata. Zatim je dodano 50 μ L 0,5 M HCl, 50 μ L nitrit-molibdat reagensa i 50 μ L 8,5%- tne vodene otopine NaOH. Nakon 10 minuta izmjerena je apsorbancija na 492 nm. Količina ukupnih fenolnih kiselina određena je pomoću baždarnog pravca kavene kiseline. Rezultati određivanja prikazani su kao ekvivalenti kavene kiseline u miligramima fenolnih kiselina po gramu suhe tvari ekstrakta.

3.2.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu (Yen i Chen, 1995). U otopinu ekstrakta dodano je 70 μ L DPPH koncentracije 0,21 mg/mL, te je nakon 60 minuta stajanja na tamnom mjestu izmjerena apsorbancija na 545 nm. Kao negativna kontrola korištena je smjesa 130 μ L metanola i 70 μ L otopine DPPH. Moć hvatanja slobodnih radikala (Radical scavenging activity, RSA) izračunata je kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka otopine uzoraka i apsorbancije otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka, prema formuli:

$$RSA = (1 - AU/AD) \times 100 \quad (1)$$

gdje su AU apsorbancija otopine DPPH kojoj je dodan ekstrakt borovničina lista, a AD apsorbancija otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka (negativna kontrola). Rezultati su izraženi kao IC₅₀, odnosno koncentracija koja pokazuje RSA = 50%. Kao pozitivna kontrola korišten je BHA.

3.2.7. Određivanje sposobnosti inhibicije tirozinaze

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu (Biswajit i sur., 2017). U 160 μ L otopine ekstrakta dodano je 40 μ L otopine tirozinaze priređene u 16 mM fosfatnom puferu te inkubirano na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon 10 min dodano je 80 μ L otopine L-DOPA. Nakon 10 min izmjerena je apsorbancija na 492 nm. Kao negativna kontrola korištena je smjesa koja je umjesto ekstrakta sadržavla pufer. Sposobnost inhibicije tirozinaze izračunata je prema formuli:

$$\text{Sposobnost inhibicije tirozinaze} = (1 - AU/AD) \times 100 \quad (2)$$

gdje je AU apsorbancija otopine ekstrakta, a AD apsorbancija negativne kontrole. Rezultati su izraženi kao IC_{50} , odnosno koncentracija koja pokazuje sposobnost inhibicije tirozinaze = 50%. Kao pozitivna kontrola korištena je kojična kiselina.

3.2.8. HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida

Za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC) standardi fenolnih kiselina i flavonoida pripremljeni su u koncentraciji od 0,2 mg/mL u metanolu. Korišteni su etanolni ekstrakti uzoraka. Prije injektiranja otopine standarada i ekstrakata filtrirane su kroz 0,45 μ m PTFE filter. Separacija je provedena na Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 12.5 mm $\times$ 4.6 mm, Agilent) koloni opremljenoj s odgovarajućom predkolonom. Smjesa vode, metanola i mravlje kiseline u omjeru 93:5:2 (V/V/V) i 3:95:2 (V/V/V) korišteni su kao pokretna faza A, odnosno B. Razdvajanje je provedeno pri 40°C prema sljedećem protokolu: 0 minuta 20% B, 10 minuta 40% B i 35 minuta 50% B. Brzina protoka bila je 1,0 mL/min. Primijenjeni volumen bio je 10 μ L. Identifikacija se temeljila na usporedbi retencijskog volumena uzorka i standarada. Komponente su kvantificirane prema njihovim kalibracijskim krivuljama pri 270 nm (hiperozid) ili 320 nm (klorogenska kiselina i p-kumarna kiselina). Granica detekcije (LD) i granice kvantifikacije (LQ) određene su prema radu autora Bljajić i sur. (2017).

3.2.9. HPLC analiza arbutina

Za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC) korišten je standard arbutina. Prije injektiranja otopine standarada i ekstrakata filtrirane su kroz 0,45 μ m PTFE filter. Separacija je provedena na Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 12.5 mm $\times$ 4.6 mm, Agilent) koloni opremljenoj s odgovarajućom predkolonom. Smjesa metanola i vode u omjeru 10:90 (V/V) korištena je kao pokretna faza. Brzina protoka bila je 1,2 mL/min. Primijenjeni volumen bio je 20 μ L. Identifikacija se temeljila na usporedbi retencijskog volumena uzorka i standarada.

3.2.10. TLC analiza arbutina

Za analizu arbutina tankoslojnom kromatografijom (TLC) na ploče su nanjeti vodeni ekstrakti koji su korišteni za HPLC analizu te standard arbutina u koncentraciji 1 mg/mL. Mobilnu fazu činila je smjesa mravlje kiseline, vode i etilacetata u omjeru 6:6:88 (V/V/V). Ploče su stavljene u kromatografsku komoru da se razviju. Nakon sušenja u sušioniku odjeljene sastavnice detektirane

su vizualno prskanjem ploča metanolnom otopinom diklorokinonklorimida i otopinom natrijeva karbonata.

3.2.11. Statistička obrada

Sva određivanja provedena su u triplikatu, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprema etanolnih ekstrakata

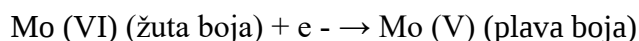
Od biljnog materijala s jedanaest različitih lokacija napravljeno je isto toliko etanolnih ekstrakata. Ekstrakti su korišteni za sva daljnja ispitivanja, osim za ispitivanja arbutina, kada su napravljeni vodeni ekstrakti. U Tablici 1. prikazani su nazivi ekstrakata, lokacija na kojoj su sakupljeni uzorci te maseni udio suhe tvari izražen kao miligrami suhe tvari po mililitru ekstrakta.

Tablica 1. Nazivi ekstrakata, lokacija, zemlja porijekla i maseni udio suhe tvari u ekstraktima.

Naziv ekstrakta	Lokacija	Zemlja porijekla	w ekstrakta (mg/mL)
VM-HR-1	Čabar, Čabranka	Hrvatska	2
VM-HR-2	Sj. Velebit, Lubenovac	Hrvatska	1,5
VM-HR-3	Sj Velebit, Šegotski padeži	Hrvatska	1,25
VM-CG-1	Semolj	Crna Gora	2
VM-HR-4	Samoborski gorje, Slani Dol	Hrvatska	1,5
VM-CG-2	planina Hajla, 7.9.2017.	Crna Gora	1,25
VM-CG-3	Barno jezero	Crna Gora	1,75
VM-HR-5	Hrvatsko zagorje, Radoboj	Hrvatska	1,75
VM-CG-4	Goveda jezera	Crna Gora	1,5
VM-CG-5	Tepačke šume, Tmor	Crna Gora	1,5
VM-CG-6	planina Hajla, 8.9.2017.	Crna Gora	2

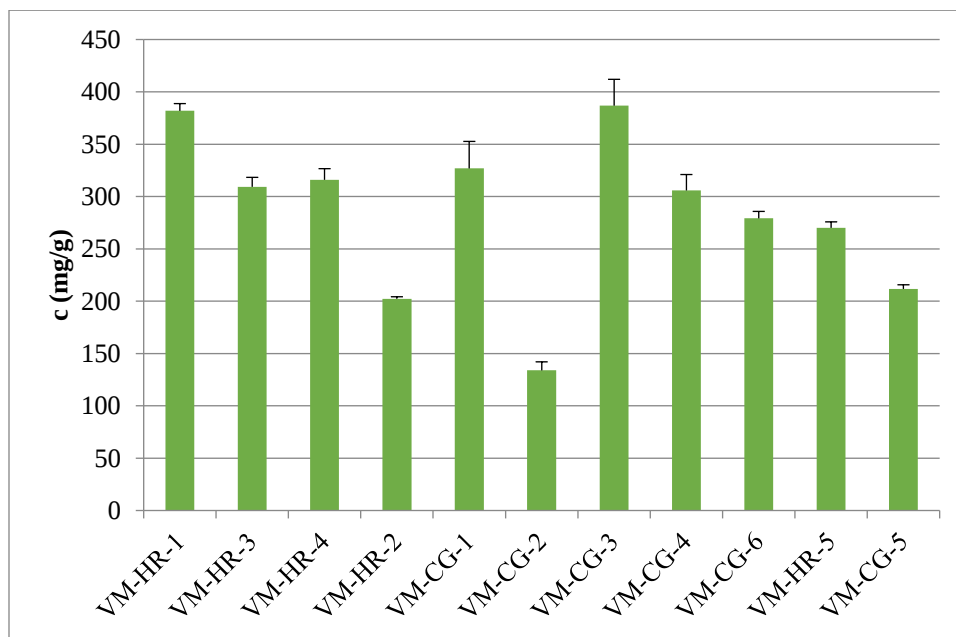
4.2. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli u ekstraktima određeni su pomoću Folin-Ciocalteu reagensa koji s reducirajućim fenolnim spojevima stvara kromogene spojeve čiji se intenzitet obojenja može mjeriti spektrofotometrijski. Smatra se da se kemijska struktura Folin-Ciocalteu reagensa sastoji od fosfomolibdenskih i fosfovolframskih heteropoli kiselina koje su žute boje. Prisustvom fenola, u bazičnom reakcijskom mediju, nastaje Mo-W kompleks koji reakcijsku smjesu oboji u plavo. Smatra se da je mehanizam reakcije taj da fenoli reduciraju ion molbidenata koji u drugom valentnom stanju ima drukčiju boju (Bljajić, 2018).



Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini 630 nm.

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći baždarni pravac galne kiseline. Rezultati su prikazani na Slici 5. kao koncentracija ukupnih polifenola u miligramima po gramu suhe tvari.



Slika 5. Količina ukupnih polifenola u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja $\pm$ SD)

Slika pokazuje da je sadržaj ukupnih polifenola svih uzoraka u rasponu od 133,89 mg/g suhe tvari do 386,79 mg/g suhe tvari. Uzorci s najviše ukupnih polifenola su VM-CG-3 i VM-HR-1. Nešto manje ukupnih polifenola ima u uzorcima VM-HR-3, VM-HR-4, VM-CG-1, VM-CG-4, VM-CG-6 i VM-HR-5. Uzorci VM-CG-5 i VM-HR-2 pokazuju još manje ukupnih polifenola te VM-CG-2 koji je najsiromašniji polifenolima. Zanimljiva je značajna razlika u udjelima ukupnih polifenola u dva različita uzorka sakupljenim na istoj lokaciji, planini Hajli, CG. Uzorak VM-CG-2 ima najmanje ukupnih polifenola, dok uzorak VM-CG-6 sakupljen samo dan nakon ima znatno više. Ne zna se razlog takvoj razlici u rezultatima ali pretpostavlja se da može biti rast jedne biljke na suncu, a druge u sjeni i sl.

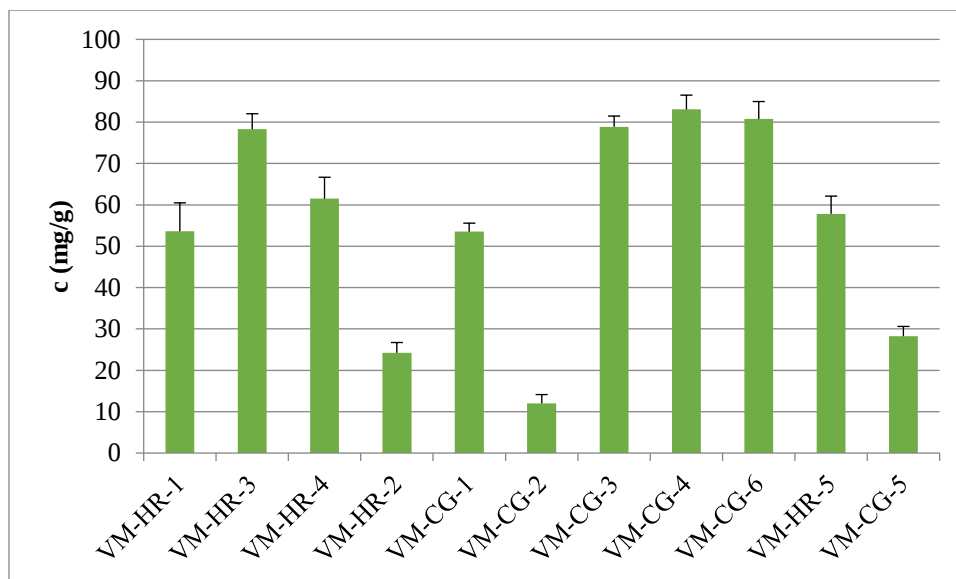
Rezultati su pokazali da je većina uzoraka bogatija ukupnim polifenolima od uzoraka iz literaturnog rada (Brasanac-Vukanovic i sur., 2018) gdje su uzorci bili listovi borovnice s planine Bjelasice u Crnoj Gori, a raspon ukupnih polifenola između 173.19 i 217.59 mg/g. Razlog tomu mogu biti različiti uvjeti ekstrakcije. U citiranom radu provedena je ekstrakcija sa 70% etanolom na povišenoj temperaturi, a u ovom radu ekstrakcija je napravljena na sobnoj temperaturi sa 60% etanolom.

Suprotno tome, rezultati ovoga rada slažu se s rezultatima iz doktorskog rada (Bljajić, 2018) iako su uvjeti ekstrakcije bili različiti (80% etanol, ultrazvučna kupelj, 80°C). U citiranom radu sadržaj ukupnih polifenola bio je oko 393,36 mg/g, što odgovara sadržaju u uzorku VM-CG-3.

4.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje flavonoida temelji se na reakciji flavona i flavanola s aluminijevim ionima iz reakcijske smjese. Pri tome dolazi do stvaranja kelata, a reakcijska smjesa se oboji u žuto, što se prati mjerenjem apsorbancije na 405 nm (Bljajić, 2018).

Koristeći baždarni pravac kvercetin dihidrata, na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka određen je sadržaj flavonoida. Rezultati određivanja prikazani su na Slici 6. a izraženi su kao koncentracija flavonoida u miligramima po gramu suhe tvari.



Slika 6. Količina flavonoida u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja $\pm$ SD)

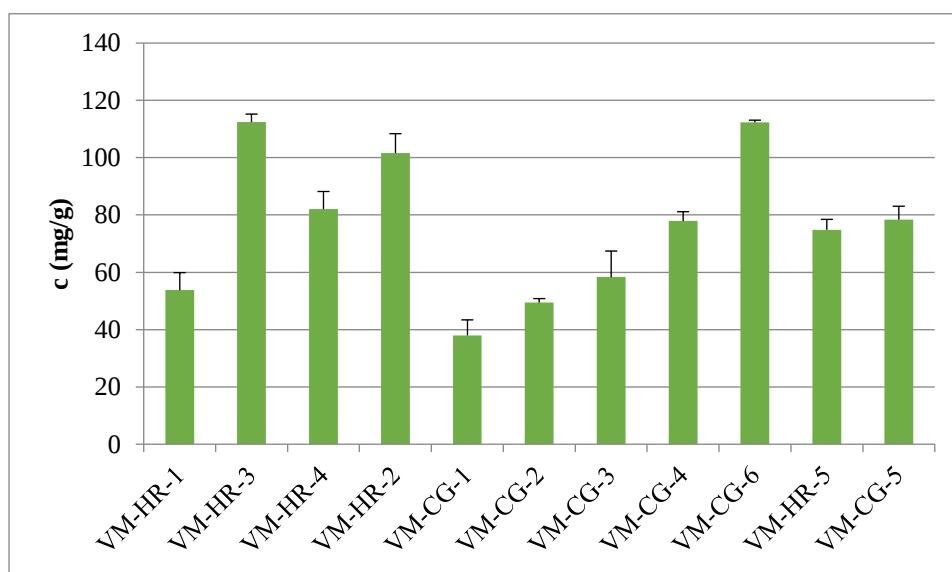
Sadržaj flavonoida u uzorcima mnogo varira, od 12,02 mg/g do 83,07 mg/g. Može se očekivati da će količinu ukupnih polifenola pratiti sadržaj ukupnih flavonoida, iako se to nije dogodilo u potpunosti. Flavonoidima najbogatiji uzorci su VM-CG-4, VM-CG-6 i VM-CG-3 te VM-HR-3. Uzorci VM-CG-4, VM-CG-6 i VM-HR-3 pokazali su veću količinu flavonoida od očekivanog budući da nisu imali i najveći sadržaj ukupnih polifenola. Zanimljivo je da uzorci VM-HR-1 i VM-CG-1 koji su imali najviše ukupnih polifenola, nemaju i najviše flavonoida. Slijede uzorci VM-HR-4 i VM-HR-5 sa nešto manje flavonoida te uzorci VM-CG-5, VM-HR-2 i VM-CG-2 s najmanje flavonoida kako je i očekivano.

U doktorskom radu (Bljajić, 2018) sadržaj ukupnih flavonoida bio je oko 77,69 mg/g. Uzorci s najvećim sadržajem flavonoida (VM-CG-4, VM-CG-6, VM-CG-3 i VM-HR-3) odgovaraju rezultatima iz citiranog rada, dok neki uzorci (VM-HR-2, VM-CG-2 i VM-CG-5) znatno odstupaju od literaturnih podataka.

4.4. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

U biljnim drogama od fenolnih kiselina najzastupljenije su hidroksicimetne kiseline (C6-C3), koje se međusobno razlikuju po hidroksilaciji i metilaciji aromatskog prstena. Određuju se na temelju prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata, koji s nitrit-molibdat reagensom daju žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine s NaOH žuta boja se mijenja u narančasto-crvenu te se mjeri apsorbanacija na 492 nm (Bljajić, 2018).

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbanacija uzoraka koristeći baždarni pravac kavene kiseline. Na Slici 7. prikazani su rezultati mjerenja izraženi kao koncentracija fenolnih kiselina u miligramima po gramu suhe tvari.



Slika 7. Količina fenolnih kiselina u uzorcima (srednja vrijednost tri mjerenja $\pm$ SD)

Sadržaj fenolnih kiselina u uzorcima kreće se u rasponu od 37,99 mg/g do 112,42 mg/g. Uzorci s najvećim sadržajem su VM-HR-3, VM-HR-2 i VM-CG-6. Za VM-HR-3 to je u skladu s očekivanjima, ali za VM-HR-2 i VM-CG-6 to je više od očekivanog budući da su ti uzorci bili među siromašnijima ukupnim polifenolima. Uzorci VM-HR-4, VM-CG-4, VM-HR-5 i VM-CG-5 pokazuju osrednju količinu fenolnih kiselina, kao što su to pokazali i za ukupne polifenole.

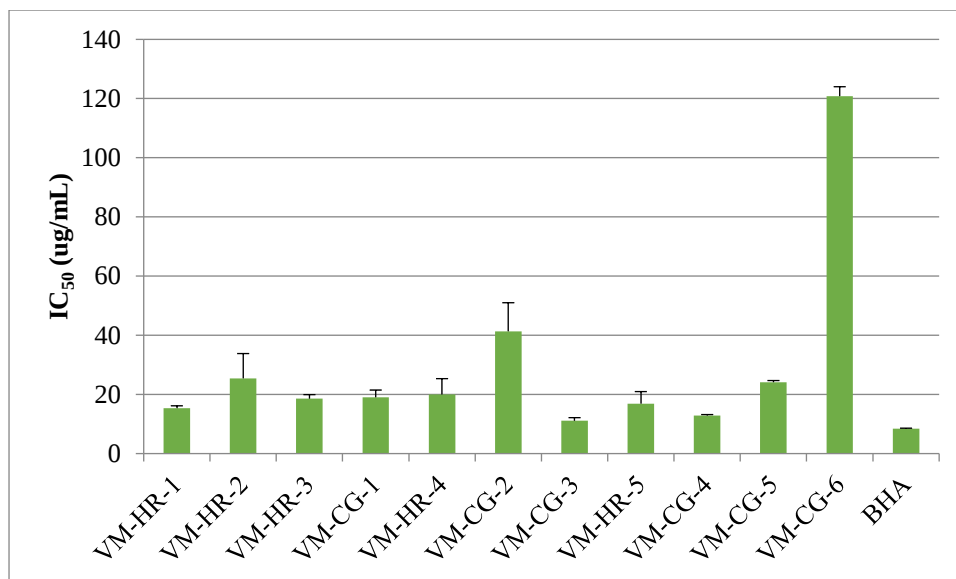
Uzorci koji su bili najbogatiji ukupnim polifenolima (VM-CG-3, VM-HR-1 i VM-CG-1), imaju iznenađujuće malo fenolnih kiselina. Uzorak VM-CG-1 je pokazao čak manji sadržaj od uzorka VM-CG-2 koji je bio daleko siromašniji ukupnim polifenolima.

U doktorskom radu (Bljajić, 2018) udio fenolnih kiselina bio je 82,92 mg/g. To je u skladu s rezultatima ovog rada budući da se većina uzoraka kreće oko te vrijednosti s većim ili manjim odstupanjem izuzev onih s najmanjim i najvećim sadržajem fenolnih kiselina.

4.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Za *in vitro* ispitivanja antiradikalne aktivnosti koristi se slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Temelj metode je redukcija stabilnog DPPH radikala u prisustvu antioksidansa. Za razliku od hidroksilnog radikala i superoksid aniona, na njega ne utječu sporedne reakcije, kao što je kelacija metalnih iona i enzimske inhibicije. Svježe pripremljena otopina DPPH je intenzivno ljubičaste boje s apsorpcijskim maksimumom na 517 nm. Antioksidansi koji ulaze u reakciju s DPPH doniraju mu vodik ili elektron i pri tome ga prevode u bezbojni produkt 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin ili slične supstituirane hidrazine. Pri tome nestaje intenzivna ljubičasta boja što dovodi do pada apsorbancije. Veći pad apsorbancije znači veću antiradikalnu aktivnost. Nedostatak je što je DPPH topiv u alkoholnom otapalu, tako da lipofilni spojevi ne mogu dobro reagirati s otopinom DPPH. Fenolni spojevi se smatraju glavnim sastavnicama koje doprinose antioksidativnim aktivnostima biljnih ekstrakata (Bljajić, 2018).

Rezultati određivanja prikazani su kao IC₅₀, odnosno vrijednost koja označava količinu ekstrakta koja hvata 50% slobodnih radikala DPPH prisutnih u otopini (Slika 8.). Dakle, što je IC₅₀ vrijednost manja, to je antiradikalno djelovanje ekstrakta bolje. Uzorci su uspoređeni s BHA, spojem poznate antiradikalne aktivnosti.



Slika 8. Antiradikalna aktivnost uzoraka (srednja vrijednost tri mjerenja $\pm$ SD)

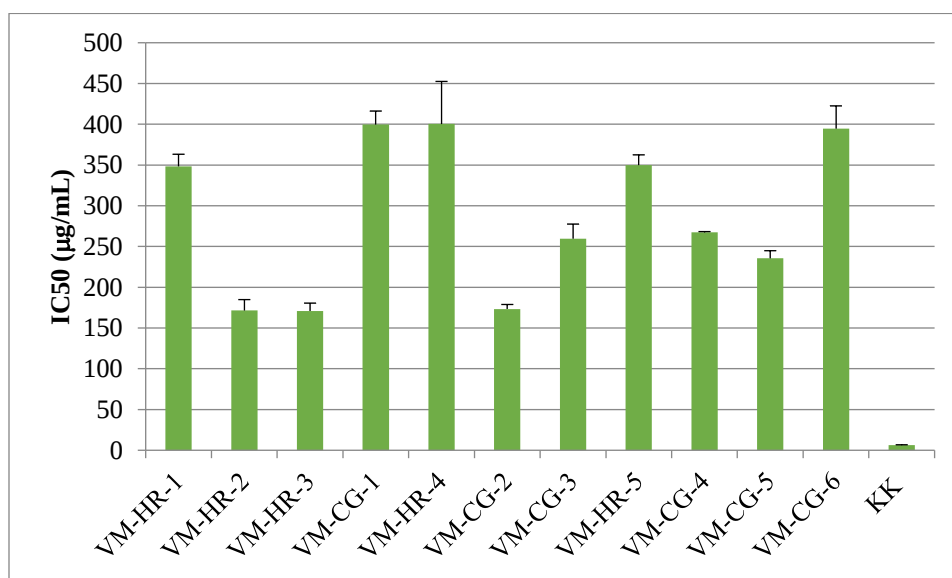
IC₅₀ vrijednost uzoraka varira od 11,08 μ g/mL do 120 μ g/mL. Kao što se može zaključiti iz rezultata, svi uzorci listova borovnice imaju dobru antiradikalnu aktivnost, vrlo sličnu pozitivnoj kontroli BHA, osim uzorka koji je bio najsiromašniji ukupnim polifenolima, VM-CG-2. Uzorak VM-CG-6 pokazao je daleko najlošiju antiradikalnu aktivnost, što nije u skladu s očekivanjima budući da je imao gotovo najveći sadržaj fenolnih kiselina i prilično velik sadržaj ukupnih polifenola. Najjaču aktivnost pokazuje uzorak VM-CG-3 s najmanjom vrijednosti IC₅₀.

U literaturnom radu (Bljajić i sur., 2017) dobivena vrijednost IC₅₀ je 17,8 μ g/mL što je u skladu s ovim rezultatima, budući da je to srednja vrijednost većine uzoraka u ovo radu, iako su neki od uzoraka pokazali jaču aktivnost (VM-CG-3 i VM-CG-4) a neki puno slabiju (VM-CG-2 i VM-CG-6).

4.6. Određivanje inhibicije tirozinaze

Metoda se temelji na enzimatskoj reakciji gdje kao supstrat služi otopina L-DOPA-e (L-dihidroksifenilalanin). Enzim tirozinaza katalizira reakciju oksidacije L-DOPA-e u dopakinon koji dalje neenzimskim reakcijama polimerizira u melanin. Inkubacijom otopine ekstrakta s otopinom enzima dolazi do njegove inhibicije te dodatkom supstrata ne dolazi do reakcije što se očituje kao smanjenje apsorbancije (Biswajit i sur., 2017).

Rezultati određivanja prikazani su kao IC_{50} , odnosno vrijednost koja označava količinu ekstrakta koja inhibira 50% enzima prisutnog u otopini (Slika 9). Dakle, što je IC_{50} vrijednost manja, to je veća sposobnost inhibicije. Uzorci su uspoređeni s kojičnom kiselinom (KK), jakim inhibitorom tirozinaze.



Slika 9. Sposobnost inhibicije tirozinaze (srednja vrijednost tri mjerenja $\pm$ SD)

Uzorci su pokazali određenu sposobnost inhibicije iako je u usporedbi sa standardom KK ta inhibicija puno manja. Oni s najmanjom IC_{50} vrijednosti, a najvećom inhibicijom su uzorci VM-HR-2 i VM-HR-3 te VM-CG-2 što je iznenađujuće jer je taj uzorak pokazao najmanji sadržaj fenolnih spojeva i manju antiradikalnu aktivnost od ostalih. Uzorci VM-HR-2 i 3 imali su veliki udio fenolnih kiselina što može biti povezano s jačim inhibicijskim učinkom, iako su potrebna

daljnja istraživanja da bi se to zaključilo. Nisu pronađeni odgovarajući literaturni podaci s kojima bi se rezultati mogli usporediti.

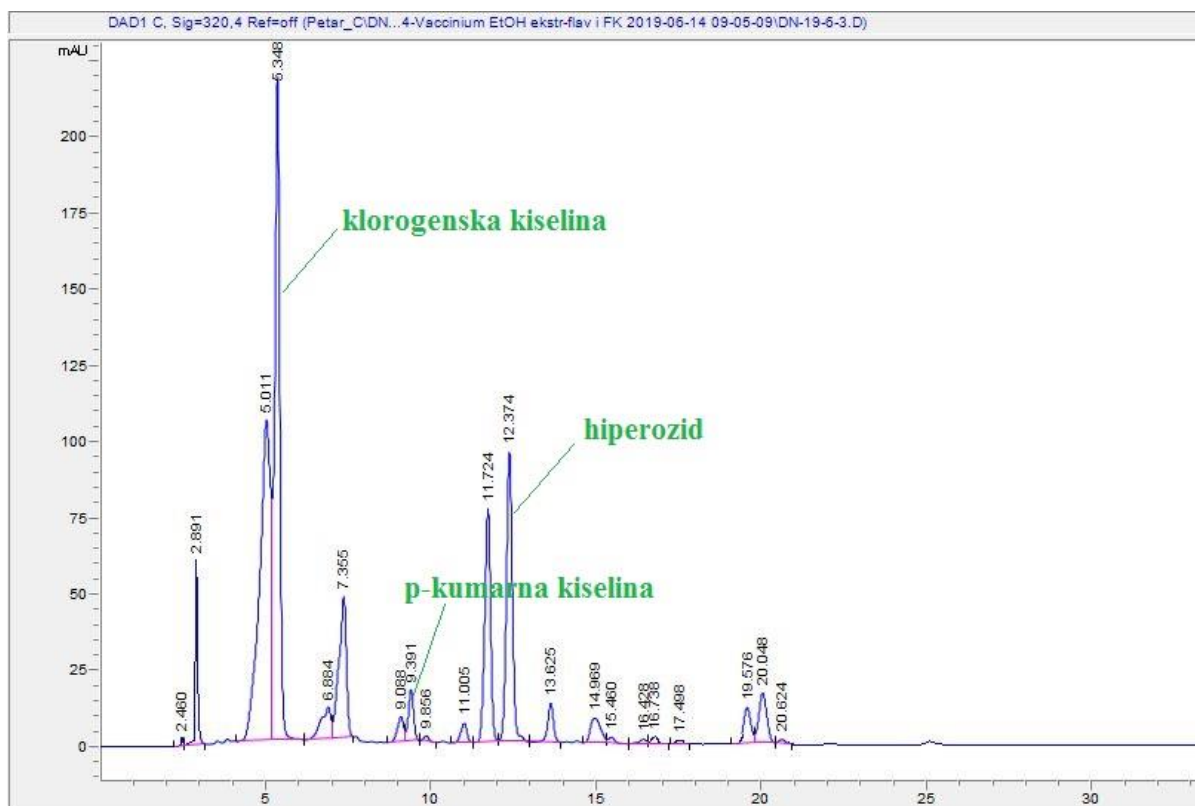
4.7. HPLC analiza fenolnih kiselina i flavonoida

Za identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnih spojeva korištena je tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti obrnutih faza (RP-HPLC). HPLC je tehnika pogodna za analizu zbog brojnih čimbenika koji uključuju: izvrsnu rezoluciju koja se može postići u širokom rasponu kromatografskih uvjeta za vrlo blisko povezane molekule, kao i strukturno sasvim različite molekule; veliku selektivnost koju se može mijenjati kroz promjene karakteristika mobilne faze; visoka sposobnost oporavka i, stoga, visoka produktivnost te izvrsnu ponovljivost odvajanja provedenih tijekom dugog vremenskog razdoblja, što je uzrokovano stabilnošću materijala stacionarne faze (Bljajić, 2018).

Različiti čimbenici utječu na HPLC analizu fenola uključujući pripremu uzoraka, mobilnu fazu, vrstu kolone i detektor. Analiza uključuje odvajanje molekula na temelju njihove polarnosti. Primjenjen je sustav gradijentnog eluiranja korištenjem kolone C18. Razdvajanje ovisi o vezanju molekula uzorka iz polarne mobilne faze na hidrofobne liganade stacionarne faze. Korišteni su metanol, voda i mravlja kiselina pri čemu se povećavanjem udjela metanola tijekom analize skraćuje tijek postupka s nastojanjem postizanja boljeg razlučivanja. Analiza se provela na temperaturi kolone od 40°C, dok je na vrijeme trajanja analize utjecalo vrijeme eluiranja standarada (Bljajić, 2018).

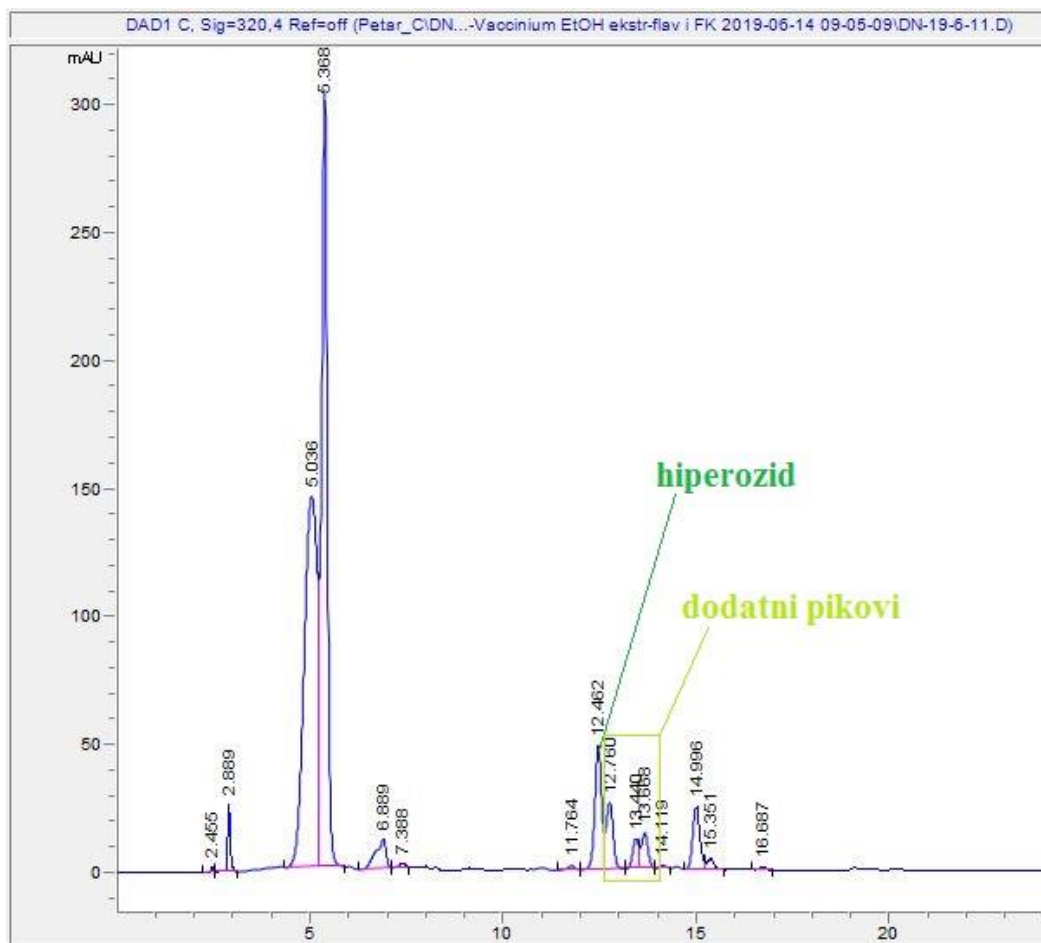
Rezultati analize prikazani su na Slici 10. na primjeru kromatograma uzorka VM-HR-3 koji je pokazao prisutnost svih triju analiziranih sastavnica. Kromatogrami ostalih uzoraka nisu stavljeni budući da izgledaju analogno prikazanom uzorku, osim što nemaju pik p-kumarne kiseline. Dodatni pikovi pored pika hiperozida koji su prisutni u većini uzoraka prikazani su na primjeru kromatograma uzorka VM-CG-6 (Slika 11). Parametri kalibracijskih krivulja za standarde flavonoida i fenolnih kiselina uočenih na kromatogramima preuzeti su iz literature (Bljajić i sur., 2017) i nalaze se u Tablici 2. Rezultati HPLC analize prikazani u Tablici 3.

prikazuju prisutne flavonoide i fenolne kiseline u ekstraktima izražene u mikrogramima po miligramu suhe tvari ekstrakta i prisutnost dodatnog pika pored pika hiperozida.



Slika 10. Kromatogram uzorka VM-HR-3

Vrijeme zadržavanja klorogenske kiseline bilo je na oko 5,3 minuta, p-kumarne 9,4 minuta, a hiperozida na 12,4 minuta. Uzorak VM-HR-3 jedini je pokazao prisutnost p-kumarne kiseline. Ostali uzorci nisu imali pikove na vremenu oko 9,4 minute ili su imali male pikove čiji se UV spektri nisu poklapali sa spektrom standarda p-kumarne kiseline, te je zaključeno da to nije tražena kiselina. Svi uzorci su imali dodatni pik pored pika klorogenske kiseline čiji je UV spektar odgovarao spektru standarda, ali ne može se sa sigurnošću tvrditi radi li se o toj kiselini.



Slika 11. Kromatogram uzorka VM-CG-6.

Svi uzorci iz Crne Gore (osim VM-CG-2) su imali dodatne pikove pored pika hiperozida čiji UV spektri izgledaju kao spektar standarda te se može pretpostaviti da se radi o nekom drugom derivatu kvercetina. Stoga su, slično kao kod gore opisanog pika uz klorogensku kiselinu potrebne dodatne studije da se utvrdi o kojem se derivatu radi. Suprotno tome, uzorci iz Hrvatske nisu imali dodatnih pikova pored hiperozida.

Tablica 2. Parametri kalibracijskih krivulja za standarde flavonoide i fenolne kiseline uočene na kromatogramima.

Standard	Jednadžba kalibracijskog pravca	r^2	LD (μg)	LQ(μg)
Klorogenska kiselina	$y = 2587.3x + 73.4$	0.9996	0.036	0.110
p-Kumarna kiselina	$y = 5735.6x + 89.3$	0.9999	0.005	0.015
Hiperozid	$y = 1426.2x + 15.4$	0.9999	0.013	0.040

Tablica 3. Rezultati HPLC analize fenolnih sastavnica ekstrakata.

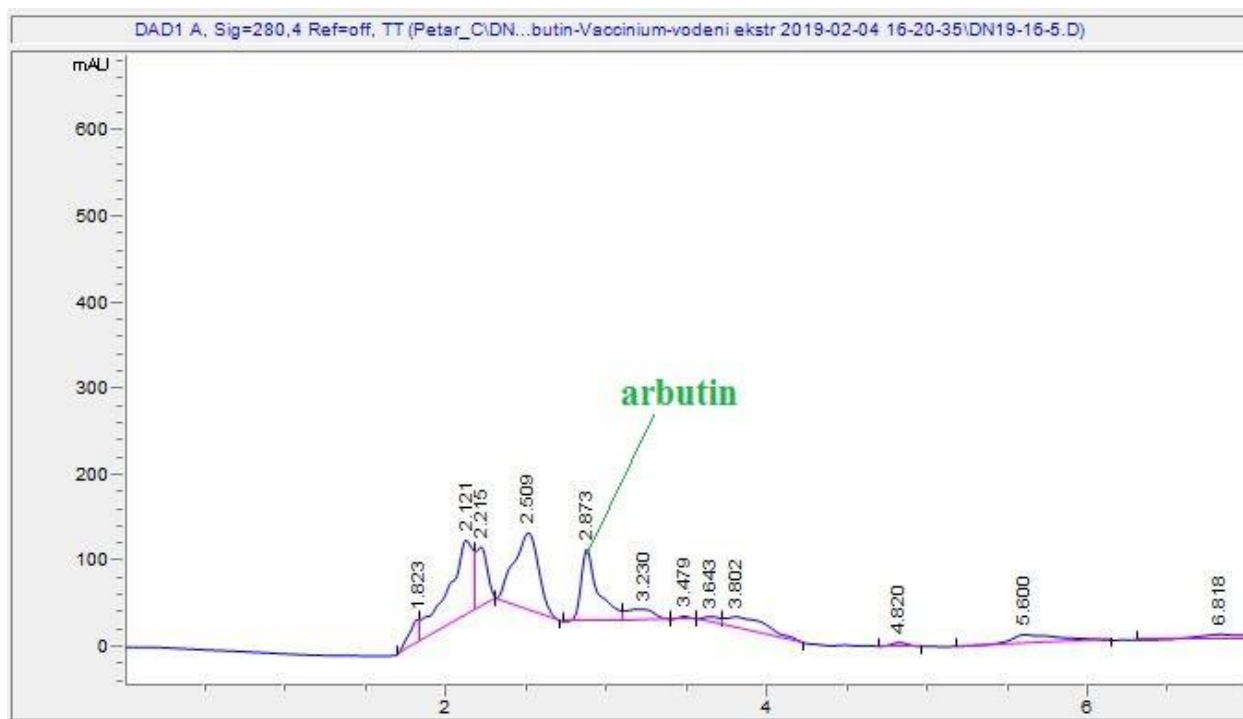
Uzorak	Klorogenska kiselina ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	p-Kumarna kiselina ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Hiperozid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Dodatni pik uz hiperozid
VM-HR-1	77,89	0,83	45,03	ne
VM-HR-2	38,82		11,21	ne
VM-HR-3	72,21		73,10	ne
VM-CG-1	73,15		24,91	da
VM-HR-4	90,01		60,81	ne
VM-CG-2	15,25		5,73	ne
VM-CG-3	72,82		23,93	da
VM-HR-5	84,63		57,91	ne
VM-CG-4	62,79		50,90	da
VM-CG-5	32,81		10,79	da
VM-CG-6	61,78		29,85	da

Iz Tablice 3. vidi se da svi uzorci sadrže klorogensku kiselinu i to u najvećem postotku, slijedi hiperozid koji je u većini uzoraka na drugom mjestu po sadržaju te p-kumarna kiselina koja se u tragovima nalazi samo u jednom uzorku. Uzorak najbogatiji klorogenskom kiselinom je VM-HR-4, a najsiromašniji je VM-CG-2 što je u skladu s očekivanjima budući da je taj uzorak bio najsiromašniji ukupnim polifenonim spojevima i u spektrofotometrijskim određivanjima. Rezultati nisu pokazali da uzorci s najvećim sadržajem ukupnih fenolnih kiselina analogno imaju i najveći sadržaj klorogenske kiseline. Neki uzorci (npr. VM-CG-1) koji su pokazali jako malo ukupnih fenolnih kiselina, imaju veliku količinu klorogenske kiseline i obrnuto. Jedini uzorak u kojem je nađena p-kumarna kiselina je VM-HR-3 i to vrlo malo. To je također uzorak s najvećim sadržajem hiperozida i jedan od uzoraka s najvećom inhibicijom tirozinaze što može biti povezano, jer literaturni podaci navode p-kumarnu kiselinu kao dobar inhibitor tog enzima (Boqiang i sur., 2005). No točna povezanost dobivenih rezultata ne može se sa sigurnošću zaključiti te su potrebna dodatna istraživanja. Hiperozid je pronađen u uzorcima VM-HR-1, VM-HR-2 i VM-HR-3 te svim uzorcima iz Crne Gore.

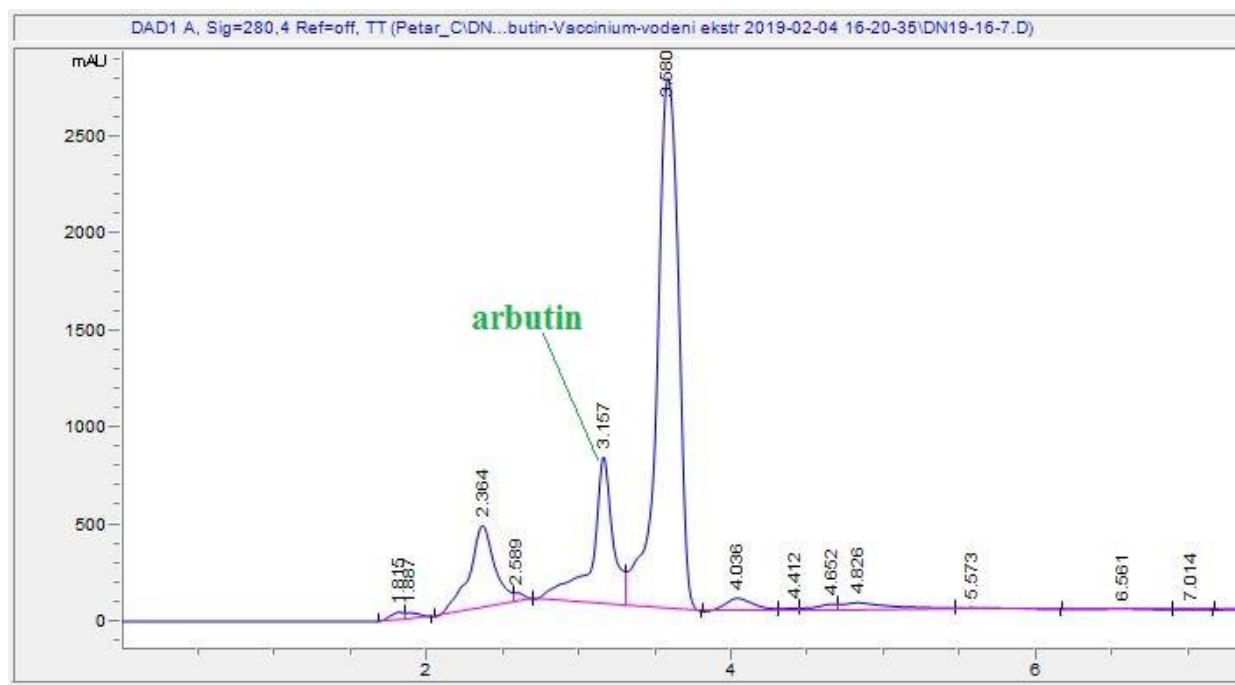
4.8. HPLC analiza arbutina

Kako bi se provela analiza arbutina pripremljeni su novi, vodeni ekstrakti uzoraka budući da je arbutin više topljiv u vodi. S obzirom da za vodene ekstrakte nije provedeno određivanje suhe tvari, rezultati HPLC analize nisu se mogli u potpunosti kvantificirati te je analiza provedena samo kvalitativno u svrhu identifikacije arbutina u uzorcima.

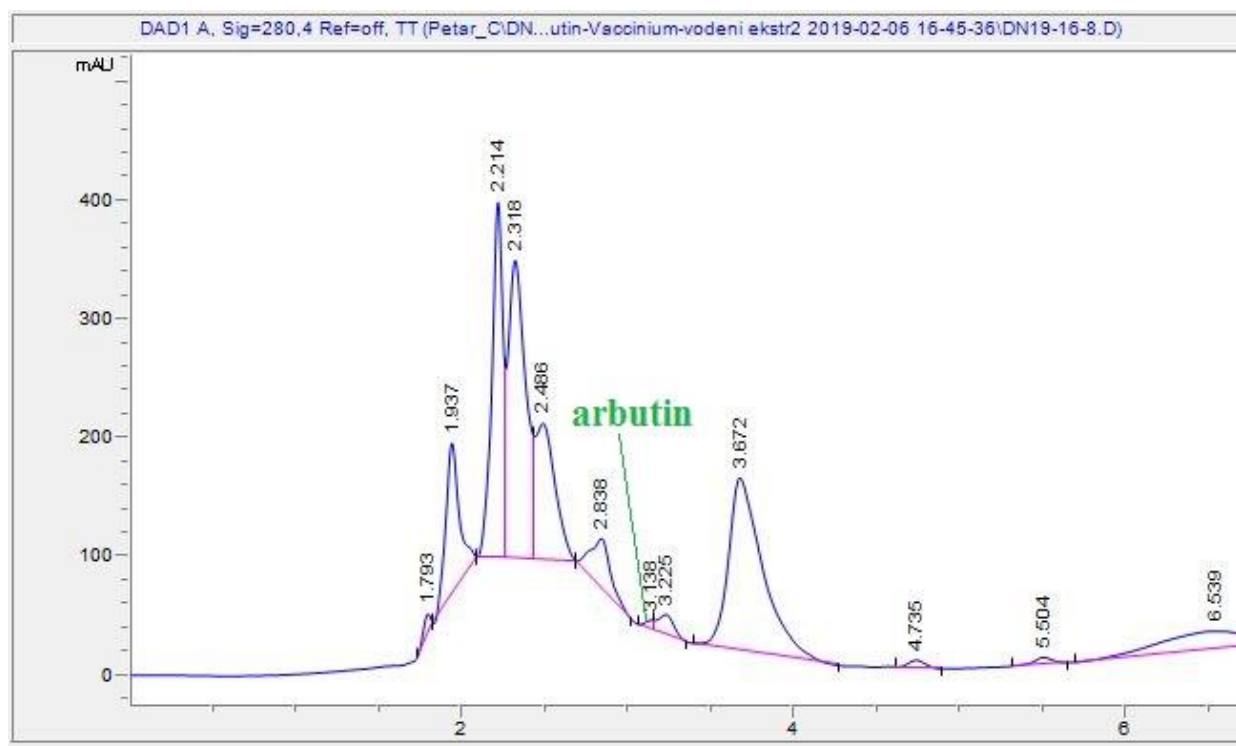
Arbutin je pronađen u samo tri uzorka (VM-HR-4, VM-CG-3 i VM-HR-5). Kromatogrami tih uzoraka dobiveni analizom prikazani su na Slikama 12, 13 i 14. Parametri kalibracijske krivulje korišteni su iz literature (Bljajić i sur., 2017) i prikazani su u Tablici 4. Rezultati analize prikazani su u Tablici 5. i izraženi su kao koncentracija arbutina u injektiranoj vodenoj otopini u mikrogramima po mililitru otopine.



Slika 12. Kromatogram uzorka VM-HR-4



Slika 13. Kromatogram uzorka VM-CG-3



Slika 14. Kromatogram uzorka VM-HR-5

Vrijeme zadržavanja arbutina bilo je oko 3 minute. Iz priloženih slika vidi se da svaki od uzoraka pokazuju pik za arbutin. Uzorak VM-HR-4 i VM-CG-3 pokazuju jasno odijeljen iako ne posve simetričan pik, dok je pik arbutina u uzorku VM-HR-5 jako mali, loše odvojen od susjednog pika, ali pokazuje prisutnost arbutina u uzorku, iako malu.

Tablica 4. Parametri kalibracijske krivulje za standard arbutina.

Jednadžba kalibracijskog pravca	r^2	LD (μg)	LQ (μg)
$y = 103.9x + 17.6$	0.9999	0.005	0.016

Tablica 5. Rezultati HPLC analize arbutina

Uzorak	c (mg/mL)
VM-HR-4	0,292
VM-CG-3	3,56
VM-HR-5	0,00332

Uzorak s najvećim sadržajem arbutina je VM-CG-3. Zanimljivo je da je arbutin nađen i u uzorku VM-HR-4 koji je pokazao i najveći sadržaj klorogenske kiseline. Iako starija literatura prihvaća prisutnost arbutina u borovnici, novija saznanja kažu da se ipak radi o *Vaccinium x intermedium*, hibridu dobivenom križanjem *Vaccinium vitis-idaea* i *Vaccinium myrtillus*. Budući da detaljnija morfološka analiza uzorka nije napravljena, ne može se tvrditi radi li se o hibridu ili ne. Iako je sadržaj arbutina u uzorcima vrlo mali, prekomjerno korištenje vodenih ekstrakata (npr. infuza) trebalo bi se izbjegavati (Bljajić i sur., 2017).

Arbutin je poznat kao dobar inhibitor tirozinaze. Iako bi bilo za očekivati da ova tri uzorka pokazuju i najjaču inhibiciju tirozinaze, to se nije dogodilo. Od ova tri uzorka, najveću inhibiciju pokazao je VM-CG-3, a ima i najveći sadržaj arbutina. Međutim, u usporedbi s ostalim uzorcima, VM-CG-3 nije među najjačim inhibitorima, dok su VM-HR-4 i VM-HR-5 čak pokazali najlošiju inhibiciju tirozinaze.

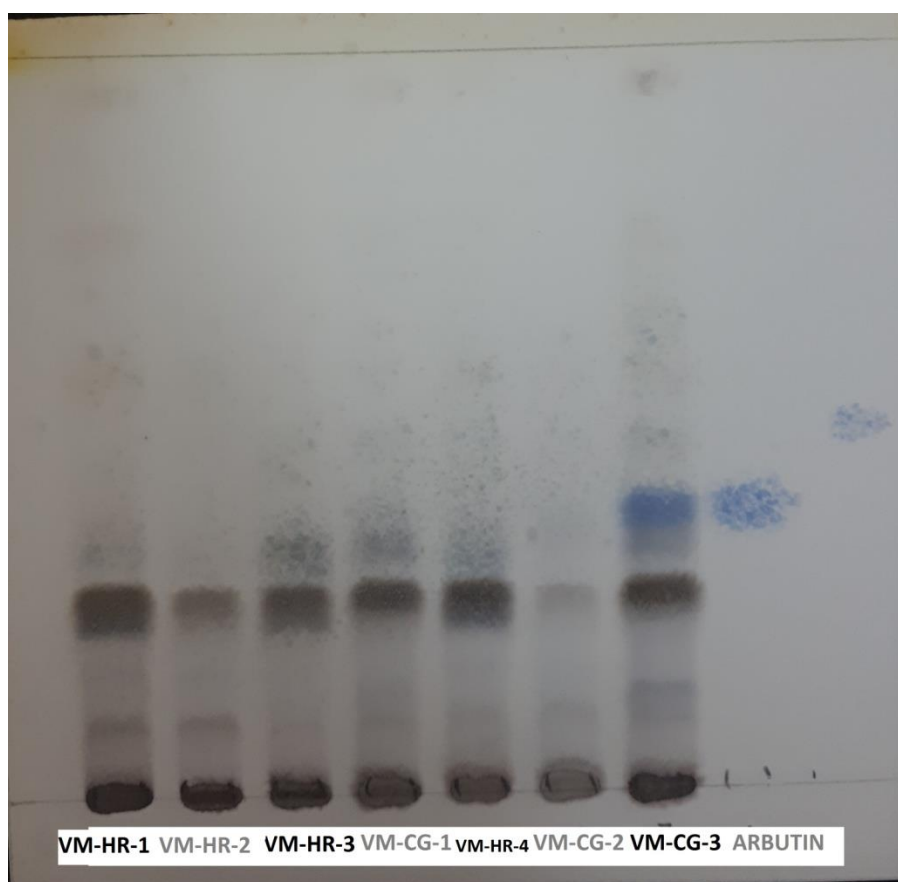
4.9. TLC analiza arbutina

Kako bi se utvrdili rezultati HPLC analize, provedena je i TLC analiza arbutina. Metoda se zasniva na raspodjeli tvari između krutog adsorbensa (nepokretne faze) i tekuće pokretne faze. Uzorak se na tanki sloj adsorbensa nanosi kao točka ili linija, a razvijanje se provodi u zatvorenoj komori. Pokretna faza prolazi kroz tanki sloj adsorbensa nošena kapilarnim silama. Do razlučivanja sastojaka smjese dolazi zbog različitog afiniteta pojedinih sastavnica smjese prema nepokretnoj i pokretnoj fazi, što uzrokuje različite faktore zaostajanja odijeljenih tvari (R_f -vrijednosti). R_f vrijednost predstavlja odnos udaljenosti koju prijeđe supstancija i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza. Karakterizacija odijeljenih sastavnica provodi se pomoću R_f -

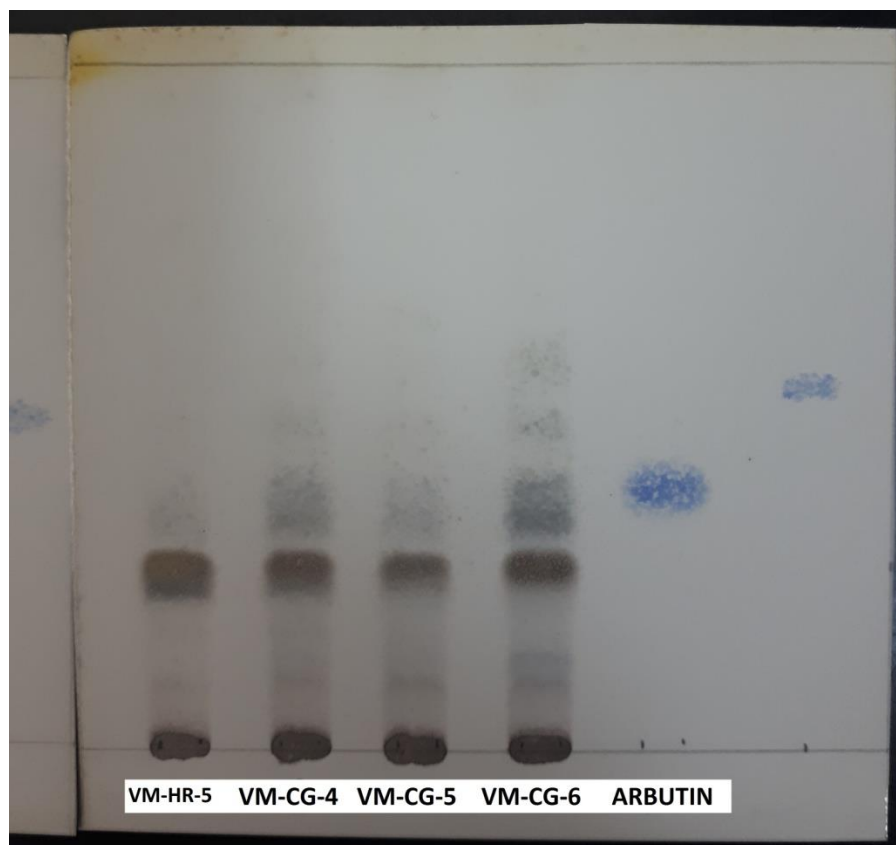
vrijednosti i/ili usporedbom s kromatogramom poredbene tvari (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2015).

Pri ispitivanju flavonoida tankoslojnom kromatografijom kao nepokretna faza najčešće se koristi silikagel. Pokretna faza je smjesa prikladnih otapala u određenim volumnim omjerima, a često sadrži etilacetat, mravlju kiselinu i vodu (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2015).

Razvijene su dvije kromatografske ploče. Na obje su nanjeti vodeni ekstrakti uzoraka i poredbena otopina arbutina 1 mg/mL. Rezultati analize prikazani su na Slikama 15 i 16.



Slika 15. TLC analiza prisutnosti arbutina u uzorcima (ploča 1).



Slika 16. TLC analiza prisutnosti arbutina u uzorcima (ploča 2).

TLC analizom potvrđena je prisutnost arbutina u uzorku VM-CG-3 što je vidljivo kao plava linija na kromatogramu koja se podudara s linijom standarda arbutina. Iako je HPLC analizom arbutin pronađen i u uzorcima VM-HR-4 i VM-HR-5, TLC analizom to nije potvrđeno. Pretpostavlja se da su razlog premale količine arbutina u tim uzorcima koje se prskanjem reagensima nisu mogle identificirati. Jačim prskanjem linije su se počele prelijevati te se sastavnice nisu mogle sa sigurnošću identificirati. Iako se na temelju TLC analize sumnjalo na prisutnost arbutina u uzorku VM-CG-6, HPLC-om je utvrđeno da u tom uzorku arbutina nema.

5. ZAKLJUČAK

Pretpostavljajući da su polifenoli, naročito flavonoidi i fenolne kiseline, glavni nosioci antioksidativne aktivnosti spektrofotometrijski je određen njihov sadržaj u ekstraktima. Ispitivana je ovisnost antiradikalne aktivnosti o količini navedenih spojeva. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ispitana je pomoću DPPH slobodnog radikala. Prema rezultatima ispitivanja zaključeno je da se pojedini uzorci značajno razlikuju u fitokemijskom sastavu te da najveći udio ukupnih polifenola ne prati analogno i najveći udio flavonoida odnosno fenolnih kiselina za sve uzorke. Također je utvrđeno da su općenito listovi borovnice jako dobri hvatači slobodnih radikala, sa manjim razlikama među uzorcima u antiradikalnoj aktivnosti.

Ispitivanjem inhibicije tirozinaze pokazano je da ekstrakti lista borovnice imaju određenu blagu sposobnost inhibicije te se na taj način mogu koristiti kod problema s hiperpigmentacijom. Također se pretpostavlja da je veći inhibicijski učinak povezan s većim sadržajem fenolnih kiselina, naročito *p*-kumarne kiseline, budući da su uzorci s većim sadržajem fenolnih kiselina pokazali jaču inhibiciju, ali potrebna su dodatna istraživanja da bi se to zaključilo.

HPLC analizom zaključeno je da je klorogenska kiselina najzastupljenija fenolna sastavnica. Hiperoxid se nalazi svim uzorcima, dok je *p*-kumarna kiselina pronađena samo u jednom uzorku lista. Također je zaključeno da većina uzoraka ne sadržava ili sadržava vrlo malo arbutina. Stoga je potrebna dodatna botanička analiza kako bi se utvrdilo radi li se u tim slučajevima o predstavniku vrste *V. myrtillus* ili o hibridu.

6. LITERATURA

1. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity prairies. *Food Chem*, 2004, 84, 551-562.
2. Biswajit B, Hiranjit C, Pramod T, Suman K. Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis accuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 173, 686-695.
3. Bljajić K. Fitokemijski sastav i biološki učinci biljnih antidijabetika hrvatske etnomedicine (doktorski rad). Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018, str. 58-64.
4. Bljajić K, Petlevski R, Vujić L, Čačić A, Šoštarić N, Jablan J, Saraiva de Carvalho I, Zovko Končić M. *Molecules*, 2017, 22(5), 703
5. Boqiang F, Huan L, Xiaoru W, Frank S. C. Lee, Shufen Cui. Isolation and Identification of Flavonoids in Licorice and a Study of Their Inhibitory Effects on Tyrosinase. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 7408–7414.
6. Brasanac-Vukanovic S, Mutic J, Stankovic DM, Arsic I, Blagojevic N, Vukasinovic-Pesic V, Tadić 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
7. Bruneton J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants. Paris, Lavoisier Publishing, 1999, str. 309.
8. Bujor OC, Le Bourvellec C, Volf I, Popa VI, Dufour C. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chem*, 2016, 213, 58-68.
9. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22, 749-760.
10. Czaplinska M, Czepas J, Gwozdzinski K. Structure, antioxidative and anticancer properties of flavonoids. *Postepy Biochem*, 2012, 58, 235-244.
11. Dujmović Purgar D, Šindrak Z, Mihelj D, Voća S, Duralija B. Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. *Pomologia Croatica*, 2007, 13, 219-228.

12. Group of authors. European Pharmacopoeia 9.5 Ed. Council of Europe, 1918.
13. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 1995, 41, 1819-1828.
14. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 2007, 35, 1147-1150.
15. Havesteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32, 1141-1148.
16. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 2002, 13, 572-584.
17. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2004, 55, 279-290.
18. Kumazawa S, Hasamaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*, 2004, 84, 329-339.
19. Kuštrak, D., 2005. Farmakognozija fitofarmacije. Tehnička knjiga, Zagreb
20. Medić-Šarić M, Buhač I, Bradamante V. Vitamini i minerali-istine i predrasude. Zagreb, F. Hoffmann - La Roche, 2000, str. 295-297.
21. Singelton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 1999, 299, 152-178.
22. Toplak Galle K. Domaće ljekovito bilje. Zagreb, Mozaik knjiga, 2005, str. 60-61, 212-213.
23. Vladimir –Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz farmakognozije I, 2015.
24. Willfort R, Ljekovito bilje i njegova upotreba. Izdavačko knjižarsko poduzeće Mladost, Zagreb, 1974.
25. Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agr Food Chem*, 1995, 43, 27-37.

7. SAŽETAK

Biljni polifenolni spojevi intenzivno se istražuju zbog svojih mnogobrojnih i dobro poznatih korisnih učinaka na ljudski organizam. U ovom diplomskom radu ispitani su listovi jedanaest uzoraka biljne vrste *Vaccinium myrtillus*. Cilj je bio utvrditi antiradikalnu aktivnost ekstrakata, sposobnost inhibicije tirozinaze te sadržaj dvije glavne skupine polifenola: flavonoida i fenolnih kiselina, za koje se smatra da su glavni nosioci tih aktivnosti u biljkama. Nadalje, ispitana je prisutnost arbutina u uzorcima. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u uzorcima određen je spektrofotometrijski. Antiradikalna aktivnost ekstrakata ispitana je pomoću DPPH slobodnog radikala, a inhibicija tirozinaze koristeći enzim iz gljiva. HPLC analizom utvrđen je sadržaj određenih fenolnih kiselina i flavonoida te identifikacija arbutina za koji je još provedena i TLC analiza. Ispitivanja su pokazala da se pojedini ekstrakti međusobno značajno razlikuju u sadržaju ispitivanih spojeva, antiradikalnoj aktivnosti i inhibiciji tirozinaze. Općenito svi uzorci su dobri hvatači slobodnih radikala, dok je učinak na inhibiciju tirozinaze puno slabiji, ali je ipak prisutan. HPLC analizom utvrđena je prisutnost klorogenske kiseline i hiperozida u svim uzorcima, a *p*-kumarna kiselina je pronađena samo u jednom uzorku i to onom koji je pokazao najveću inhibiciju tirozinaze. Arbutin je detektiran u tri uzorka, ali u jako malim količinama.

8. SUMMARY

Herbal polyphenol compounds are intensively investigated due to their numerous and well-known beneficial effects on the human body. In this thesis, eleven samples of leaves of *Vaccinium myrtillus* were examined. The aim was to determine the antiradical activity of extracts, the ability to inhibit tyrosinase and the content of the two main groups of polyphenols: flavonoids and phenolic acids, which are considered to be the main carriers of these activities in plants. Furthermore, the presence of arbutin in the samples was tested. The content of total polyphenols, flavonoids and phenolic acids in samples was determined spectrophotometrically. The antiradical activity of the extracts was tested by DPPH free radical, while for tyrosinase inhibition the enzyme from mushrooms was used. The content of certain phenolic acids, flavonoids and arbutin was determined by HPLC analysis. In addition arbutin was analysed using TLC. Results have shown that the extracts differ in the content of the tested compounds, as well as in antiradical activity and inhibition of tyrosinase. Generally, all the samples were good free radical blockers, while the effect on tyrosinase inhibition was much weaker. HPLC analysis determined the presence of chlorogenic acid and hyperoside in all samples, while *p*-coumaric acid was found only in one sample, the same one that showed the highest inhibition of tyrosinase. Arbutin was detected in three samples, but in very small amounts.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

FITOKEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKI UČINCI EKSTRAKATA LISTOVA BOROVNICE

Ana Ingula

SAŽETAK

Biljni polifenolni spojevi intenzivno se istražuju zbog svojih mnogobrojnih i dobro poznatih korisnih učinaka na ljudski organizam. U ovom diplomskom radu ispitani su listovi jedanaest uzoraka biljne vrste *Vaccinium myrtillus*. Cilj je bio utvrditi antiradikalnu aktivnost ekstrakata, sposobnost inhibicije tirozinaze te sadržaj dvije glavne skupine polifenola: flavonoida i fenolnih kiselina, za koje se smatra da su glavni nosioci tih aktivnosti u biljkama. Nadalje, ispitana je prisutnost arbutina u uzorcima. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u uzorcima određen je spektrofotometrijski. Antiradikalna aktivnost ekstrakata ispitana je pomoću DPPH slobodnog radikala, a inhibicija tirozinaze koristeći enzim iz gljiva. HLPC analizom utvrđen je sadržaj određenih fenolnih kiselina i flavonoida te identifikacija arbutina za koji je još provedena i TLC analiza. Ispitivanja su pokazala da se pojedini ekstrakti međusobno značajno razlikuju u sadržaju ispitivanih spojeva, antiradikalnoj aktivnosti i inhibiciji tirozinaze. Općenito svi uzorci su dobri hvatači slobodnih radikala, dok je učinak na inhibiciju tirozinaze puno slabiji, ali ga ipak prisutan. HPLC analizom utvrđena je prisutnost klorogenske kiseline i hiperozida u svim uzorcima, a *p*-kumarna kiselina je pronađena samo u jednom uzorku i to onom koji je pokazao najveću inhibiciju tirozinaze. Arbutin je detektiran u tri uzorka, ali u jako malim količinama.

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

Rad sadrži: 44 stranica, 16 grafičkih prikaza, 5 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: borovnica, antiradikalna aktivnost, tirozinaza, arbutin

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

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

Dr. sc. Živka Juričić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Jasna Jablan, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2019..

Basic documentation card

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

Diploma thesis

PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF BILLBERRY LEAVES EXTRACTS

Ana Ingula

SUMMARY

^{9.}
Herbal polyphenol compounds are intensively investigated due to their numerous and well-known beneficial effects on the human body. In this thesis, eleven samples of leaves of *Vaccinium myrtillus* were examined. The aim was to determine the antiradical activity of extracts, the ability to inhibit tyrosinase and the content of the two main groups of polyphenols: flavonoids and phenolic acids, which are considered to be the main carriers of these activities in plants. Furthermore, the presence of arbutin in the samples was tested. The content of total polyphenols, flavonoids and phenolic acids in samples was determined spectrophotometrically. The antiradical activity of the extracts was tested by DPPH free radical, while for tyrosinase inhibition the enzyme from mushrooms was used. The content of certain phenolic acids, flavonoids and arbutin was determined by HPLC analysis. In addition arbutin was analysed using TLC. Results have shown that the extracts differ in the content of the tested compounds, as well as in antiradical activity and inhibition of tyrosinase. Generally, all the samples were good free radical blockers, while the effect on tyrosinase inhibition was much weaker. HPLC analysis determined the presence of chlorogenic acid and hyperoside in all samples, while *p*-coumaric acid was found only in one sample, the same one that showed the highest inhibition of tyrosinase. Arbutin was detected in three samples, but in very small amounts.

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

Thesis includes: 44 pages, 16 figures, 5 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: bilberry, antiradical activity, tyrosinase, arbutin

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

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2019.