

Mėlynės (*Vaccinium myrtillus* L.) vaisių vaistinės augalinės žaliavos antocianų tyrimas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Deividas Burdulis, Liudas Ivanauskas¹, Valdas Jakštas, Valdimaras Janulis

Kauno medicinos universiteto Farmacinės chemijos ir farmakognozijos katedra,

¹Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra

Raktažodžiai: antocianai, chromatografija, vaisiai, farmakopėja, mėlynė.

Santrauka. Mėlynės vaisiuose nustatyta flavonoidų (didžioji dalis antocianai), taninų, fenolinių, organinių rūgščių ir kitų biologiškai aktyvių junginių. Terapinį mėlynės vaisių poveikį apsprendžia biologiškai aktyvūs junginiai antocianai. Farmakologinį poveikį sąlygojančių antocianų kiekio įvairavimas mėlynės vaisiuose reikšmingas optimizuojant vaistinės žaliavos rinkimo sąlygas.

Mėlynės (*Vaccinium myrtillus* L.) vaisių pavyzdžiai surinkti 2006 m. liepos – rugsėjo mėnesiais iš Lietuvos teritorijoje esančių natūralių augaviečių. Atlikta ekstrakcija ultragarsu naudojant metanolį kaip tirpiklį. Vykdyta rūgštinė hidrolizė ir, panaudojus atvirkštinių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos metodą, įvertinta cianidino, delfinidino, petunidino, peonidino ir malvidino antocianidinių kokybinė ir kiekinė sudėtis. Tirtuose vaistinės žaliavos pavyzdžiuose nustatytas vyraujantis antocianidinas – cianidinas. Tyrimo metu įvertinta antocianidinių kokybinės ir kiekinės sudėties kitimo dinamika vegetacijos tarpsniais ir nustatytas ryškus antocianidinių kiekio padidėjimas vaisių nokimo pabaigoje. Įvertintas antocianidinių kokybinės ir kiekinės sudėties variavimas mėlynės vaisiuose, rinktuose skirtinguose Lietuvos regionuose. Didžiausias suminis antocianidinių kiekis aptiktas pavyzdžiuose, rinktuose Krikštonių miške (1,78 proc.) ir Prienuų šile (2,13 proc.), o mažiausias Balkasodžio miške (1,14 proc.) ir Ryliškių miške (0,99 proc.) rinktuose ėminiuose. Nustatytas ryškus antocianidinių kiekio įvairavimas, siekiantis iki 28,40 proc. (delfinidino), kuris reikšmingas mėlynės vaisių žaliavos standartizavimui.

Įvadas

Mėlynė (*Vaccinium myrtillus* L.) – puskrūmis, priklausančias *Ericaceae* šeimai, augantis daugelyje Lietuvos miškų (1, 2). Mėlynės vaisiuose nustatyta flavonoidų (didžioji dalis antocianai), taninų, fenolinių ir organinių rūgščių, cukrų, B grupės vitaminų, vitamino C. Daugeliu atvejų gydomąjį mėlynės vaisių poveikį apsprendžia biologiškai aktyvūs junginiai – antocianai (3–8). Vaisiuose nustatyti delfinidino, cianidino, petunidino, peonidino ir malvidino glikozidai gliukozidų, galaktozidų ir arabinozidų pavidalo, kurie ne tik suteikia būdingą spalvą, bet pasižymi ir plačiu farmakologiniu poveikiu (2, 3, 9). Atliktais tyrimais įrodyta, jog mėlynės vaisių preparatai mažina kapiliarų trapumą, pagerina mikrocirkuliaciją, pasižymi stipriu antioksidantiniu poveikiu, gerina naktinį matymą, vartojami diarejos bei uždegiminių burnos ir gerklės ligų, cukrinio diabeto ir hipertenzijos sukeltos retinopatijos gydymui (2, 5, 10–12). Ypač stipriu antioksidantiniu poveikiu pasižymi pagrindinis mėlynės vaisių antocianidinas – cianidinas. Moksliniais tyrimais įrodyta, jog

cianidinas yra net keturis kartus stipresnis antioksidantas už vitaminą E (13). Antocianų kiekinė sudėtis apsprendžia žaliavos kokybę. Europos farmakopėja reglamentuoja minimalų antocianų kiekį šviežiuose ir šaldytuose mėlynės vaisiuose ($\geq 0,30$ proc. paskaičiuota cianidin-3-glikozidu) (14). Ruošiant vaistinių augalinių žaliavų paruošas, labai svarbu parinkti optimaliausią žaliavos rinkimo laiką, kai susikaupęs maksimalus biologiškai aktyvių junginių kiekis.

Tyrimo tikslas. Nustatyti mėlynės vaisių antocianų kokybinės ir kiekinės sudėties kitimo dinamiką vaisių nokimo tarpsniais bei įvertinti mėlynės vaisių antocianidinių sudėties įvairavimą skirtinguose Lietuvos regionuose rinktuose pavyzdžiuose.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Augalinė žaliava. Prinokusių mėlynės vaisių pavyzdžiai surinkti 2006 m. liepos – rugsėjo mėnesiais iš Lietuvos teritorijoje esančių natūralių augaviečių. Ėminiai rinkti Alytaus, Lazdijų, Prienuų, Plungės bei Varėnos rajonuose (lentelė). Surinkti vaisiai nedelsiant

Lentelė. Lietuvos regionuose rinktų pavyzdžių antocianidinų sudėties rodmenys ir jų statistinis įvertis

Pavyzdžio rinkimo vietovė	Rinkimo data	Antocianidiniai, proc.					suma
		delfinidinas	cianidinas	petunidinas	peonidinas	malvidinas	
1 Krikštonių miškas (Lazdijų r.)	06 07 11	0,27	0,83	0,29	0,21	0,18	1,78
2 Ryliškių miškas (Alytaus r.)	06 07 11	0,14	0,47	0,16	0,12	0,10	0,99
3 Balkasodžio miškas (Alytaus r.)	06 07 11	0,19	0,43	0,23	0,09	0,09	1,14
4 Nemunaičio miškas (Alytaus r.)	06 07 11	0,26	0,54	0,18	0,11	0,12	1,28
5 Puzonių miškas (Prienu r.)	06 07 10	0,27	0,84	0,28	0,19	0,16	1,74
6 Prienu šilas (Prienu r.)	06 07 10	0,37	1,01	0,37	0,19	0,19	2,13
7 Merkinės miškas (Varėnos r.)	06 07 11	0,23	0,76	0,26	0,20	0,16	1,61
8 Druskininkų miškas (Varėnos r.)	06 07 13	0,20	0,74	0,23	0,20	0,14	1,51
9 Potyrio miškas (Plungės r.)	06 07 11	0,27	0,58	0,37	0,16	0,18	1,56
M		0,24	0,69	0,26	0,16	0,15	
Min.		0,14	0,43	0,16	0,09	0,09	
Maks.		0,37	1,01	0,37	0,21	0,19	
$S_{\bar{x}}$		0,02	0,06	0,03	0,02	0,01	
CV (proc.)		28,40	24,76	25,44	21,04	18,74	

M – vidurkis, Min. – minimali reikšmė, Maks. – maksimali reikšmė, $S_{\bar{x}}$ – vidurkio standartinė paklaida, CV (proc.) – variacijos koeficientas.

užšaldyti ir laikyti $-19 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Nuodžiūvis nustatytas Europos farmakopėjos nurodytu metodu (14).

Ekstrakcija. Apie 50 g šaldytų vaisių sutrinama grūstuvėje. 5 g (tiksliai masė) susmulkintų vaisių supilama į plačiadugnę kolbą, užpilama 95 ml metanolio ir ekstrahuojama ultragarso vonelėje 10 minučių. Gauta ištrauka filtruojama per popierinį filtrą į 100 ml matavimo kolbą, pripilama metanolio iki žymės (14).

Naudoti tirpikliai, reagentai ir standartai yra analitinio švarumo. Acetonitrilas ir 85 proc. fosforo rūgštis įsigyta iš „Sigma – Aldrich GmbH“, (Buchs, Šveicarija), metanolis iš „Roth“ (Karlsruhe, Vokietija), 35 proc. vandenilio chlorido rūgštis iš „Lachema“ (Neratovice, Čekija). Antocianidinų standartai (malvidino, cianidino, delfinidino, petunidino, peonidino) pirkti iš „Roth“ (Karlsruhe, Vokietija) ir „Chromadex“ (Santa Ana, JAV). Naudotas dejonizuotas vanduo, ruo-

šiamas „Millipore“ (JAV) vandens valymo sistema.

Rūgštinė hidrolizė. Į 25 ml ekstrakto, gauto ekstrakcijos metu, įpilta 8,5 ml koncentruotos vandenilio chlorido rūgšties ir kaitinta vandens vonioje su grįžtamuoju šaldytuvu 2 valandas.

ESC. Antocianidinams nustatyti ESC imta 2 ml gauto ekstrakto, praskiesta metanolio iki 10 ml ir filtruota per membraninius $0,22 \mu\text{m}$ porų dydžio filtrus („Carl Roth GmbH“, Karlsruhe, Vokietija). Analizei atlikti naudotas chromatografas „Waters 2690“ su dviem detektoriais: „Waters 2487 UV/Vis“ ir „Waters 996 PDA“ (Waters, Milford, JAV). Kolonėlė SUPELCO HYPERSIL ODS (C18) $100 \times 3 \text{ mm}$, su prieškolonėle, sorbento dalelių dydis – $3 \mu\text{m}$. Detekcija atlikta prie 520 nm bangos ilgio. Injekuota 20 μl tiriamojo ekstrakto. Tėkmės greitis – 1 ml/min. Eliuavimas – gradientinis. Eliuentas A – acetonitrilas (ACN), eliuentas B – ortofosforo rūgštis 4 proc. (H_3PO_4). Taikytas

šis gradiento kitimas: 0 min. – 7 proc. A (93 proc. B), 37 min. – 25 proc. A (75 proc. B), 40 min. – 7 proc. A (93 proc. B), 45 min. – 7 proc. A (93 proc. B). Analizė atlikta kambario temperatūroje. Antocianidinų tapatybė nustatyta palyginus analizių sulaikymo trukmes su standartų sulaikymo trukmėmis ir spektrais, gautais su PDA detektoriumi. Kiekybiniam nustatymui sudaryti antocianidinų standartų kalibraciniai grafikai. Standartų koncentracijų ribos: delfinidino – nuo 0,016 iki 0,048 mg/ml ($r^2=0.9992$), cianidino – nuo 0,044 iki 0,13 mg/ml ($r^2=0.9997$), petunidino – nuo 0,016 iki 0,048 mg/ml ($r^2=0.9991$), peonidino – nuo 0,008 iki 0,024 mg/ml ($r^2=0.9928$), malvidino – nuo 0,008 iki 0,024 ($r^2=0.9744$).

Statistinis duomenų įvertinimas. Statistiniam duomenų įvertinimui naudotas „SPSS“ (Chicago, JAV) statistinis paketas ir „MS Excel“ (Microsoft, JAV) kompiuterinė programa. Hierarchinė klasterinė analizė pritaikyta skirtingose augavietėse rinktų pavyzdžių palyginimui ir grupavimui. Dendrograma sudaryta pagal tolimiausio kaimyno metodą. Grupių sujungimas atliktas remiantis euklidiniu atstumu.

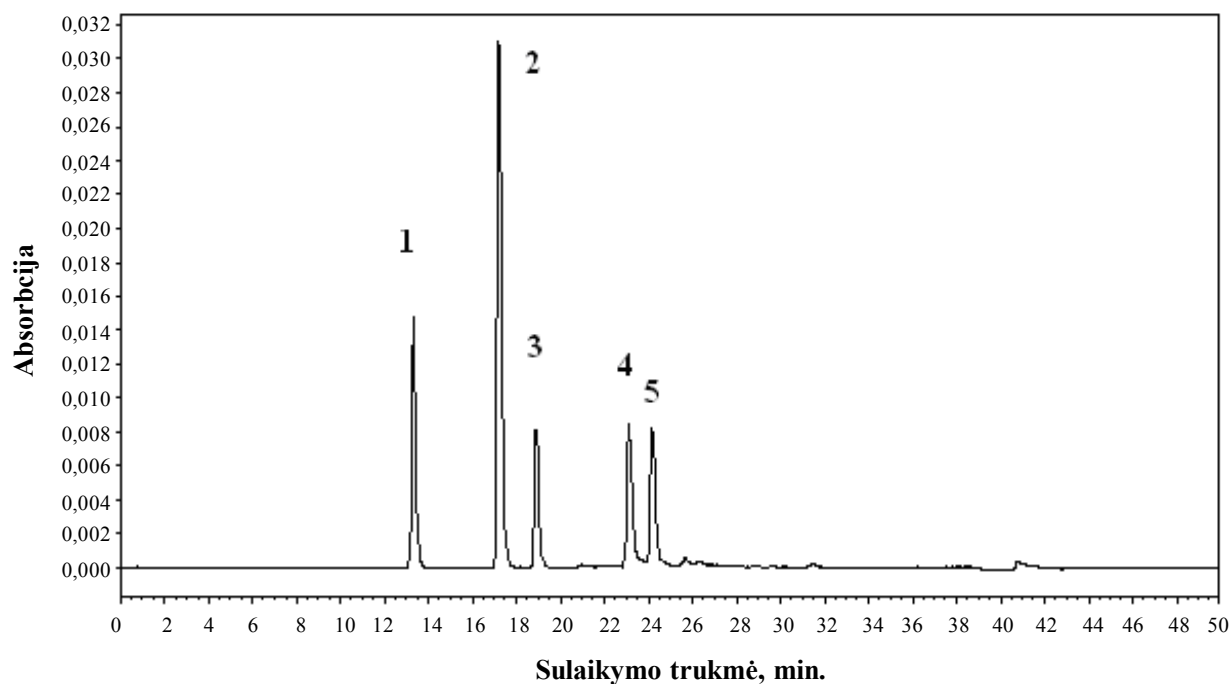
Rezultatai ir jų aptarimas

Antocianų kiekybiniam nustatymui vaistinių augalinių žaliavų ekstraktuose dažniausiai naudojami kapiliarinės elektroforezės ir efektyviosios skysčių chromatografijos metodai (15, 16). Spektrofotometrinis metodas, aprašytas Europos farmakopėje, labiau

tinka vaistinės augalinės žaliavos kokybės kontrolei, nes jo kokybė įvertinama perskaičius antocianų sumą pagal pagrindinį antocianų komponentą (cianidin-3-gliukozidą). Mėlynės vaisiuose nustatyti skirtingi glikozidai, kurių absorbcijos maksimumai gali skirtis. Šio darbo metu vykdyta rūgštinė hidrolizė, po kurios atvirkštinių fazių ESC metodu nustatyta mėlynės vaisių antocianidinų sudėtis ir jos kitimo dinamika vaisių nokimo tarpsniais bei įvertintas mėlynės vaisių antocianidinų sudėties įvairavimas skirtinguose Lietuvos regionuose rinktuose pavyzdžiuose. Rūgštinės hidrolizės metodas pasirinktas todėl, kad jis užtikrina efektyvų ir tikslų atskirų mėlynės vaisiuose esančių antocianų aglikonų kiekybinį nustatymą (18). Pirmame paveiksle pateikiama mėlynės vaisių ekstrakto ESC chromatograma.

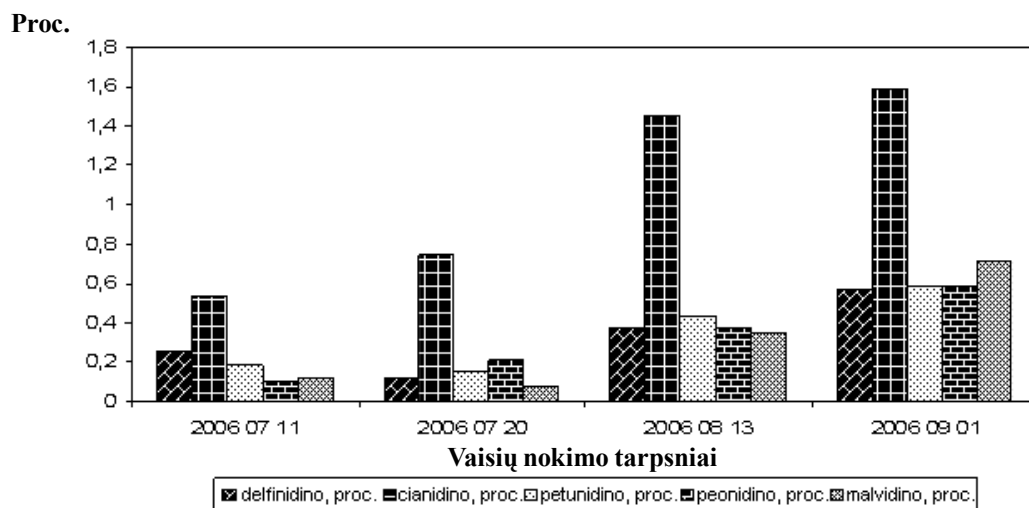
Antocianidinų (delfinidino, cianidino, petunidino, peonidino ir malvidino) kiekiai perskaičiuoti visiškai sausai žaliavai. Antocianidinų kokybinė ir kiekinė sudėtis po rūgštinės hidrolizės bei jos kitimas skirtingais vaisių nokimo tarpsniais rinktuose ėminiuose (Balkasodžio, Nemunaičio ir Potyrio miškuose) pateikiama 2–4 paveiksluose.

ESC metodu nustatytas antocianidinų kiekio didėjimas mėlynės vaisiuose nokimo tarpsniais (liepos – rugsėjo mėnesiais). Suminis antocianidinų kiekis padidėjo daugiau kaip tris kartus. Didžiausias suminis antocianų kiekis visais vaisių nokimo tarpsniais nustatytas pavyzdžiuose, rinktuose Potyrio miške (Plungės

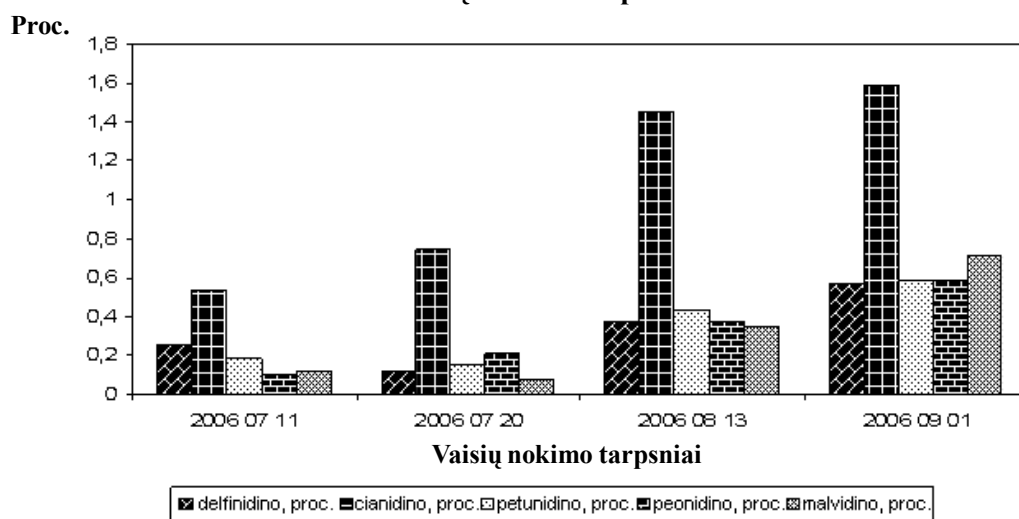


1 pav. Mėlynės vaisių ekstrakto ESC chromatograma

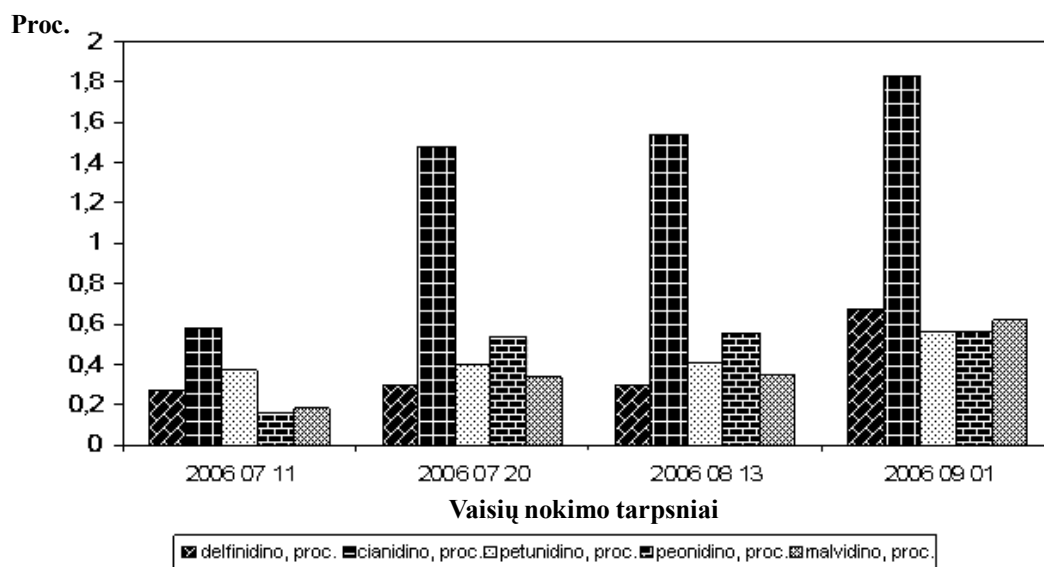
Analitės: 1 – delfinidinas, 2 – cianidinas, 3 – petunidinas, 4 – peonidinas, 5 – malvidinas.



2 pav. Balkasodžio miške rinktų mėlynės vaisių antocianidinių procentinės sudėties pokytis vaisių nokimo tarpsniais



3 pav. Nemunaičio miške rinktų mėlynės vaisių antocianidinių procentinės sudėties pokytis vaisių nokimo tarpsniais



4 pav. Potyrio miške rinktų mėlynės vaisių antocianidinių procentinės sudėties pokytis vaisių nokimo tarpsniais

rajonas), o mažiausias – Balkasodžio miške (Alytaus rajonas) rinktuose ėminiuose. Visuose ėminiuose vyraujantis antocianidinas – cianidinas. Jo kiekinė sudėtis vidutiniškai padidėjo daugiau kaip tris kartus – nuo 0,52 iki 1,73 proc. Delfinidino kiekis vidutiniškai padidėjo nuo 0,24 iki 0,59 proc. Didžiausi delfinidino kiekiai, išskyrus rugpjūčio viduryje (13 diena) rinktame pavyzdyje, nustatyti Potyrio miške rinktuose ėminiuose. Petunidino kiekinė sudėtis kito mažiausiai vaisių nokimo tarpsniais. Jo vidutiniškai nustatyta nuo 0,26 proc. liepos viduryje iki 0,54 proc. rugsėjo pradžioje. Didžiausi petunidino kiekiai nustatyti liepos mėnesio pavyzdžiuose, rinktuose Potyrio miške, o rugpjūčio ir rugsėjo mėnesio ėminiuose, rinktuose Nemunaičio miške. Liepos mėnesį tirtuose ėminiuose vidutinis petunidino kiekis padidėjo tik 0,05 proc., tačiau vaisių nokimo tarpsnio pabaigoje nustatytas dukart didesnis vidutinis jo kiekis (0,54 proc.). Pradiniais vaisių nokimo tarpsniais rinktuose ėminiuose (liepos 11 diena) rasta vidutiniškai 0,12 proc. peonidino ir 0,13 proc. malvidino, tačiau liepos 20 ir rugpjūčio 13 dienomis rinktuose bandiniuose aptikti didesni kiekiai peonidino nei malvidino. Rugsėjo pradžioje rinktuose ėminiuose, kaip ir vaisių nokimo pradžioje (liepos 11 diena), nustatyta vidutiniškai daugiau malvidino (0,65 proc.) nei peonidino (0,53 proc.). Visuose bandiniuose peonidino nustatyti didžiausi kiekiai Potyrio miške rinktuose ėminiuose, išskyrus rugsėjo pradžioje rinktą pavyzdį, kur didžiausias peonidino kiekis rastas Nemunaičio miške rinktame pavyzdyje (0,59 proc.). Liepos mėnesio ėminiuose didžiausi malvidino kiekiai rasti Potyrio miške, o rugsėjo pradžios – Nemunaičio miške rinktuose pavyzdžiuose.

Lietuvoje rinktų mėlynės vaisių ėminių analizės ESC metodu duomenys pateikiami lentelėje. Įvertinti

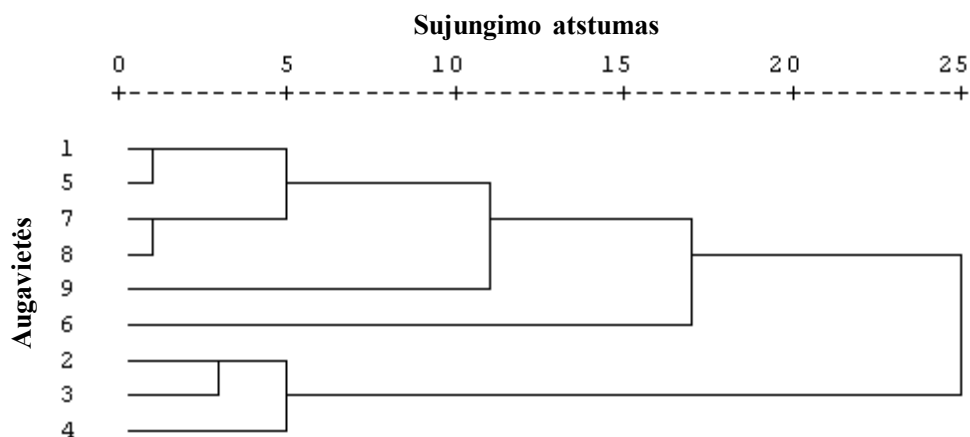
mėlynės vaisių antocianidinų variacijos koeficientai (CV proc.). Nustatytas didžiausias delfinidino kiekis (CV – 28,40 proc.) ir mažiausias malvidino kiekis (CV – 18,74 proc.) įvairavimas mėlynės vaistinės augalinės žaliavos ėminiuose. Didžiausias suminis antocianidinų kiekis aptiktas pavyzdžiuose, rinktuose Krikštonių miške (Lazdijų rajonas) ir Prienų šile (Prienų rajonas), o mažiausias – Balkasodžio ir Ryliškių miškuose (Alytaus rajonas) rinktuose ėminiuose.

Klasterinės analizės dendrograma byloja apie skirtingų Lietuvos regionuose rinktų mėlynės vaisių antocianidinų kiekinės sudėties įvairavimą. Kiekviena linija atspindi analizuojamąjį pavyzdį. Aiškiai išsiskiria keturi pagrindiniai klasteriai (5 pav.). Pirmąjį klasterį sudaro pavyzdžiai rinkti iš keturių regionų (1, 5, 7, 8). Šiems mėlynės vaisių ėminiams būdingi didesni cianidino ir peonidino kiekiai. Antrąjį sudaro šeštasis pavyzdys. Jam būdingi didesni už vidurkius visų antocianidinų kiekiai. Trečiajam klasteriui priskirtas devintasis pavyzdys, kuriame nustatyti didesni už vidurkius delfinidino ir malvidino kiekiai. Ketvirtąjį klasterį sudaro 2, 3 ir 4 pavyzdžiai, kuriuose nustatyti mažesni už vidurkius cianidino, petunidino ir peonidino kiekiai.

Išvados

1. Efektyviosios skysčių chromatografijos metodu įvertinta Lietuvos augavietėse rinktų mėlynės vaisių antocianinų sudėtis. Tirtuose vaistinės žaliavos pavyzdžiuose nustatytas vyraujantis antocianidinas – cianidinas.

2. Tyrimo metu įvertinta antocianidinų kokybinės ir kiekinės sudėties kitimo dinamika vegetacijos tarpsniais ir nustatytas ryškus antocianidinų kiekio padidėjimas vaisių nokimo pabaigoje. Gauti duomenys



5 pav. Mėlynės vaisių antocianidinų sudėties priklausomumas nuo augavietės dendrograma

Dendrogramos augaviečių numeriai atitinka lentelėje pateiktus numerius.

reikšmingi vykdant mėlynės vaisių žaliavos paruošas, optimizuojant vaistinės žaliavos rinkimo laiką.

3. Įvertintas antocianidinų kokybinės ir kiekinės sudėties variavimas mėlynės vaisiuose, rinktuose skirtinguose Lietuvos regionuose. Didžiausias suminis antocianidinų kiekis aptiktas pavyzdžiuose, rinktuose Krikštonių miške (1,78 proc.) ir Prienų šile (2,13 proc.), o mažiausias – Balkasodžio miške (1,14 proc.)

ir Ryliškių miške (0,99 proc.) rinktuose ėminiuose. Nustatytas ryškus antocianidinų kiekio įvairavimas, siekiantis iki 28,40 proc. (delphinidino), kuris reikšmingas mėlynės vaisių žaliavos standartizavimui.

Padėka

Autoriai dėkoja KMU Mokslo fondui už paramą atliekant šiuos tyrimus.

Analysis of anthocyanin content in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit crude drugs by high-performance liquid chromatography method

Deividas Burdulis, Liudas Ivanauskas¹, Valdas Jakštas, Valdimaras Janulis

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy,

¹Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Kaunas University of Medicine, Lithuania

Key words: anthocyanins; chromatography; fruits; pharmacopeia; bilberry.

Summary. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) is rich in flavonoids (major part anthocyanins), tannins, phenolic and organic acids, and other biologically active compounds. Anthocyanins possess a broad spectrum of therapeutic properties. Variation in anthocyanin content of bilberry fruit crude drugs is significant in optimizing collection conditions.

Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) crude drug samples were collected in July–September of 2006 in natural environment in the territory of Lithuania. Ultrasonic extraction was applied using methanol as solvent. Acidic hydrolysis was performed. Qualitative and quantitative composition of five major anthocyanidins (delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin) was estimated by high-performance liquid chromatography in frozen fruits. Cyanidin predominated in all crude drug samples. Dynamics of variation in qualitative and quantitative composition of anthocyanidins was estimated in bilberry fruits collected during vegetation period. The greatest total amount of all analyzed anthocyanidins was determined at the end of investigated period. Variation in qualitative and quantitative content of anthocyanidins in bilberry fruits collected in different regions of Lithuania was estimated as well. The greatest total amounts of anthocyanidins were found in samples collected in Krikštoniai forest (1.78%) and Prienai pinewood (2.13%) and the lowest amounts – in samples collected in Balkasodis forest (1.14%) and Ryliškės forest (0.99%). Significant variation in anthocyanidin content reaching 28.40% (delphinidin) was determined in bilberry fruits. It is important for the standardization of bilberry fruit crude drugs.

Correspondence to D. Burdulis, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 44307 Kaunas, Lithuania. E-mail: deividas.burdulis@gmail.com

Literatūra

1. Monograph *Vaccinium myrtillus* (Bilberry). *Alternative Medicine Review* 2001;6(5):500-4.
2. Bilberry fruit. *American Herbal Pharmacopoeia*. Santa Cruz, CA: HAP; 2001. p. 1-23.
3. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. *Herbal medicine (expanded commission e monographs)* U.S.A. American Botanical Council. Newton, MA: Integrative Medicine Communications; 2000. p. 16-9.
4. Wyk B-E, Wink M. *Medicinal plants of the world (an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses)*. Portland: Timber Press, Inc.; 2004. p. 333.
5. Barrett M. *The handbook of clinically tested herbal remedies (Volume 1)*. Binghamton, NY: The Haworth Herbal Press; 2004. p. 163-83.
6. Chandra A, Rana J, Li Y. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC – MS. *J Agric Food Chem* 2001;49:3515-21.
7. Kahkonen MP, Heinamaki J, Ollilainen V, Heinonen M. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci Agric* 2003;83:1403-11.
8. Wu X, Prior RL. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J Agric Food Chem* 2005; 53:2589-99.
9. Andersen MØ, Markham KR. *Flavonoids (chemistry, biochemistry and applications)*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, LLC; 2006. p. 472-511.
10. Faria A, Oliviera J, Neves P, Gamiero P, Santos-Buelga C, Freitas V, et al. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *J Agric Food Chem* 2005;53:

- 6896-902.
11. Maatta-Riihinen KA, Kahkonen MP, Torronen R, Heinonen IM. Catechins and procyanidins in berries of *Vaccinium* species and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2005;53:8485-91.
 12. Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin – rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)* 2004;69(1):75-80.
 13. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham IB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res* 1995;22(4):3785-93.
 14. European Pharmacopoeia. Strasburg: Council of Europe; 2005. p. 1099-100.
 15. Wang J, Kalt W, Sporns P. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush blueberries. *J Agric Food Chem* 2000;48:3330-5.
 16. Briedis V, Povilaitytė V, Kazlauskas S, Venskutonis PR. Polifenolių ir antocianinų kiekis vynuogėse, vynuogių sultyse ir raudonuose vynuose bei jų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas. (Polyphenols and anthocyanins in fruits, grapes juices and wines, and evaluation of their antioxidant activity.) *Medicina (Kaunas)* 2003;39(2):104-12.
 17. Ichyanagi T, Kashiwada Y, Ikeshiro Y, Hatano Y, Shida Y, Horie M, et al. Complete assignment of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) anthocyanins separated by capillary zone electrophoresis. *Chem Pharm Bull* 2004;52(2):226-9.
 18. Zhang Z, Kou X, Fugal K, McLaughlin J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanidins in bilberry extracts. *J Agric Food Chem* 2004;52:688-91.

Straipsnis gautas 2007 05 11, priimtas 2007 06 28
Received 11 May 2007, accepted 28 June 2007