

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST METANOLSKOG EKSTRAKTA LISTA BILJKE *SAXIFRAGA ROTUNDIFOLIA* L.

M. Koraćević-Maslak¹, J. Katanić¹, V. Mihailović¹, M. Stanković²

Izvod: Cilj rada je bio da se ispita potencijalna antioksidativna aktivnost metanolskog ekstrakta lista biljke *Saxifraga rotundifolia* L. u zavisnosti od ukupne količine fenola, flavonoida i flavonola. Ispitivani ekstrakt pokazao je visok sadržaj fenola (324,39 mg GA/g) i manje količine flavonoida (36,81 mg RU/g) i flavonola (11,52 mg RU/g). Antioksidativna aktivnost određena je serijom *in vitro* metoda. Ispitivani ekstrakt pokazuje visok nivo ukupne antioksidativne aktivnosti (509,78 mg AA/g), kao i visok stepen ABTS⁺ i DPPH „skevindžer“ aktivnosti sa IC₅₀ vrednošću od 48,76 µg/mL za ABTS⁺ i 30,39 µg/mL za DPPH metodu. Dobijeni rezultati ukazuju da ispitivani ekstrakt poseduje značajnu antioksidativnu aktivnost i može biti izvor prirodnih antioksidanata.

Gljučne reči: *Saxifraga rotundifolia* L., antioksidativna aktivnost, *in vitro*, fenoli, flavonoidi

Uvod

Biljka *Saxifraga rotundifolia* L. pripada rodu *Saxifraga*, familiji Saxifragaceae, čije ime vodi poreklo od reči saxum-stena i fragere-lomiti, drobiti (Zhou i sar., 2007.). Samo ime govori da biljke ove familije mogu da rastu u ekstremnim uslovima kao što su stenovita staništa, litice, ali je takođe povezano i sa njihovom upotrebom u narodnoj medicini gde se koriste za razbijanje kamena u mokraćnim putevima. *S. rotundifolia* je samonikla, sukulentna, višegodišnja, zeljasta biljka.

Cilj rada bio je da se ispita potencijalna antioksidativna aktivnost metanolskog ekstrakta lista biljke *S. rotundifolia*. Zbog čega su značajni antioksidanti? Antioksidanti su grupe različitih prirodnih i sintetskih jedinjenja koje imaju osobinu da štite ćelije od štetnog delovanja slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Antioksidanti brane organizam od mnogih bolesti, ali značajno je i to da sprečavaju kvarenje hrane izazvane oksidacijom lipida, ugljenih hidrata i proteina. Dok je upotreba sintetičkih antioksidanata ograničena u prehrambenoj i farmaceutskoj praksi zbog njihove moguće toksičnosti, interes za korišćenje prirodnih antioksidanata kao što su vitamin C, vitamin E, polifenoli, flavonoidi, značajno raste. Biljke su bogat izvor prirodnih antioksidanata. Antioksidanti u biljkama deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala i vrše njihovu neutralizaciju ili ih pretvaraju u manje reaktivna jedinjenja. Zbog kompleksnih oksidacionih procesa potrebno je više metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti

¹Institut za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (mirakoracevic@gmail.com)

²Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija

biljaka, jer na osnovu samo jedne metode, dobijene rezultate ne možemo sa sigurnošću interpretirati i konačno ih potvrditi.

Materijal i metode rada

Biljni materijal i priprema ekstrakta

Biljni materijal je sakupljen u julu 2013. godine u fazi cvetanja sa lokaliteta Goč, Dobre vode. Sistematizacija i identifikacija biljke (broj vaučera 110/013) izvršena je u Institutu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu. Osušen biljni materijal je ekstrahovan metanolom, dobijeni ekstrakt je filtriran i koncentrovan pod vakuumom.

Određivanje sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i flavonola

Količina ukupnih fenola određena je Folin–Ciocalteu metodom (Singleton i sar., 1999.). Ukupni fenoli su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GA/g ekstrakta). Ukupne količine flavonoida i flavonola određene su spektrofotometrijskim metodama pomoću AlCl_3 . Sadržaj flavonoida u ekstraktima određen je po metodi koju su opisali Brighente i sar. (2007.), a flavonola po metodi koju su opisali Kumaran i Karunakaran (2007.). Količina flavonoida i flavonola izražena je u ekvivalentima rutina (mg RU/g ekstrakta). Sva određivanja vršena su u tri ponavljanja, a rezultati su dati kao srednja vrednost tri merenja (\pm standardna devijacija).

Antioksidativna aktivnost ekstrakta

In vitro antioksidativna aktivnost ekstrakta ispitivana je metodom ukupne antioksidativne aktivnosti, ABTS^+ radikal katjon metodom i DPPH radikal metodom.

Ukupna antioksidativna aktivnost određivana je metodom pomoću fosformolibdena (Prieto i sar., 1999.). Metoda se zasniva na redukciji Mo (VI) do Mo (V) pomoću antioksidanata pri čemu dolazi do formiranja fosfat/Mo (V) kompleksa u kiseloj sredini. 0,3 mL uzorka ekstrakta (1 mg/mL) pomeša se sa 3 mL reagens rastvora (0,6 M sumporna kiselina, 28 mM natrijum fosfat i 4 mM amonijum molibdat). Dobijene smeše inkubiraju se na 95 °C u toku 90 minuta. Nakon hlađenja uzoraka do sobne temperature, meri se apsorbanca na 695 nm na spektrofotometru, u odnosu na slepu probu. Kod slepe probe umesto ekstrakta dodat je metanol (0,3 mL). Askorbinska kiselina (AA) korišćena je kao standard, a ukupna antioksidativna aktivnost izražena je u miligramima AA po gramu suvog ekstrakta.

Antioksidativna aktivnost ispitivanog ekstrakta u ovom radu određena je ABTS^+ radikal katjon metodom koju su opisali Re i sar. (1999.). ABTS^+ se dobija reagovanjem 7 mM vodenog rastvora ABTS sa 2,45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ u mraku na sobnoj temperaturi u periodu od 16 h. Za merenje antioksidativne aktivnosti, rastvor dobijenog ABTS^+ se razblaži metanolom da bi se dobio rastvor čija je apsorbanca 0,7 na 734 nm. Zatim se napravi serija duplih razblaženja uzorka (rastvora ekstrakta) i referentnih standarda (galna

kiselina, rutin i BHT) i 100 µL pomeša sa 900 µL rastvora ABTS⁺. Smeša se inkubira 30 min na sobnoj temperaturi u mraku, a zatim meri apsorbanca na 734 nm. Antioksidativna aktivnost se izračunava prema jednačini:

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_k - A_u) / A_k) \times 100$$

Ak je apsorbanca kontrole, koja se priprema kao i uzorci, samo što se umesto ispitivanog rastvora dodaje ista zapremina metanola, a Au predstavlja apsorbanca uzorka.

DPPH „skevindžer“ aktivnost ekstrakta određena je po metodi koju su opisali Kumarasamy i sar. (2007.). DPPH je rastvoren u metanolu u koncentraciji od 80 µg/mL. Napravljena je serija duplih razblaženja ekstrakta u metanolu od osnovnog rastvora koncentracije 1 mg/mL. 2 mL rastvora ekstrakta pomešano je sa 2 mL DPPH i nakon 30 min izmerene su apsorbanca na 517 nm. Kontrolni uzorak je pripremljen kao i uzorci samo što umesto rastvora ekstrakta ili standarda sadrži 2 mL metanola. DPPH radikal „skevindžer“ aktivnost (%) izračunava se prema gore navedenoj jednačini. Galna kiselina, rutin i BHT su korišćeni kao referentni standardi.

Vrednosti IC₅₀, koje se definišu kao koncentracije ispitivanog uzorka koje redukuju koncentraciju ABTS⁺ i DPPH radikala za 50%, izražene kao µg/mL ekstrakta, izračunate su preko sigmoidne „dose-response“ krive postupkom nelinearne regresije, korišćenjem softvera za analizu podataka Origine 8. Svi rezultati su dati kao srednja vrednost tri merenja (± standardna devijacija).

Rezultati istraživanja i diskusija

Fenolna jedinjenja su najrasprostranjeniji sekundarni biomolekuli, koji u biljkama imaju više značajnih funkcija. Fenolna jedinjenja su našla primenu u farmaceutskoj industriji zbog određenih fizioloških efekata na ljude i životinje, a od interesa su i za prehrambenu industriju kao antioksidanti i pigmenti. Mnoga istraživanja govore o vezi antioksidativne aktivnosti prirodnih proizvoda sa količinom prisutnih fenolnih jedinjenja (Velioglu i sar., 1998.). Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i flavonola u ekstraktu lista biljke *S. rotundifolia*, kao i rezultati ukupne antioksidativne aktivnosti dati su u Tabeli 1. Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da ispitivani ekstrakt ima visok sadržaj ukupnih fenola (324,39 mg GA/g) i manje količine flavonoida (36,81 mg RU/g) i flavonola (11,52 mg RU/g). Ukupna antioksidativna aktivnost određena je pomoću fosfomolibdenske metode i iznosi 509,78 mg AA/g. Dobijena vrednost ukazuje na značajnu ukupnu antioksidativnu aktivnost ekstrakta lista biljke *S. rotundifolia*. Sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala od strane ispitivanog ekstrakta određena je ABTS⁺ radikal katjon metodom i DPPH „scavenging“ metodom. ABTS radikal katjon, ima karakterističan maksimum apsorpcije na 734 nm čija se vrednost smanjuje njegovim neutralisanjem.

Tabela 1. Količina ukupnih fenola, flavonoida i flavonola i ukupna antioksidativna aktivnost metanolskog ekstrakta lista biljke *S.rotundifolia*

Table 1. The total phenolic, flavonoid and flavonol content and total antioxidant activity of methanolic leaf extract of *S.rotundifolia*

Metanolski ekstrakt <i>Methanolic Extract</i>	Ukupni fenoli (mg GAE/g ekstrakta) <i>Total phenolic content (mg GAE/g extract)</i>	Ukupni flavonoidi (mg RU/g ekstrakta) <i>Flavonoid content (mg RU/g extract)</i>	Ukupni flavonoli (mg RU/g ekstrakta) <i>Flavonol content (mg RU/g extract)</i>	Ukupna antioksidativna aktivnost (mg AA/g ekstrakta) <i>Total antioxidant activity (mg AA/g extract)</i>
<i>S.rotundifolia</i>	324.39±4.23	36.81±0.02	11.52±0.12	509.78±2.75

Ispitivani ekstrakt pokazuje izuzetno visok stepen ABTS⁺ „skevindžer“ aktivnosti sa IC₅₀ vrednošću od 48,76 µg/mL. DPPH je stabilan radikal koji se često koristi za procenu antioksidativne aktivnosti prirodnih proizvoda. Stepent dekolozacije ljubičaste boje DPPH radikala i smanjenje apsorbancije na 517 nm ukazuje na „skevindžer“ potencijal ispitivanog uzorka. Rezultati DPPH „skevindžer“ aktivnosti sa IC₅₀ vrednošću od 30,39 µg/mL ukazuju na izuzetno visok antioksidativni potencijal ispitivanog ekstrakta. Dobijeni rezultati antiradikalne aktivnosti ispitivanog ekstrakta predstavljani su u Tabeli 2.

U poređenju sa rutinom, prirodnim fenolnim jedinjenjem, ekstrakt pokazuje znatno niže IC₅₀ vrednosti za obe metode, samim tim i znatno bolju antioksidativnu aktivnost, dok u poređenju sa galnom kiselinom kao prirodnim antioksidantom i BHT kao sintetičkim antioksidantom, IC₅₀ vrednosti ispitivanog ekstrakta su nešto više.

Tabela 2. IC₅₀ vrednosti metanolskog ekstrakta lista biljke *S.rotundifolia* L.

Table 2. IC₅₀ values of methanol leaf extract of *S.rotundifolia* L.

Ekstrakt i standardi <i>Extract and standars</i>	IC ₅₀ (µg/mL)	
	ABTS ⁺	DPPH
<i>S.rotundifolia</i>	48.76±0.23	30.39±0.17
Galna kiselina	7.73±0.01	11.52±0.56
Rutin	76.80±1.12	127.33±12.52
BHT	7.00±0.02	16.00±0.61

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da metanolski ekstrakt lista biljke *S.rotundifolia* poseduje značajnu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa korišćenim standardnim antioksidantima. Antioksidativna aktivnost se može dovesti u vezu sa

visokim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu. Dobijeni rezultati daju povoda da se nastavi sa daljim istraživanjima sa ciljem da se ispitivani ekstrakt definiše i komercijalno koristi kao izvor prirodnih antioksidanata u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta broj III 43004, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Brighente I.M.C., Dias M., Verdi L.G., Pizzolatti M.G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm. Biology* 45, 156–161.
- Kumaran A., Karunakaran R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40, 344–352.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D., (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytotherapy Research* 21, 615–621.
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E1. *Anal. Biochemistry* 269, 337–341.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., RiceEvans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS adical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26, 1231–1237.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent oxidants and antioxidants. *Methods in Enzymology* 299, 152–178.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4113–4117.
- Zhou G.Y., Li W.C., Guo F.G. (2007). Resource investigation and observation of biological characteristics of *Bergenia purpurascens*. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 23, 390–392.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE METHANOL LEAF EXTRACT OF *SAXIFRAGA ROTUNDIFOLIA* L.

M. Koraćević-Maslak¹, J. Katanić¹, V. Mihailović¹, M. Stanković²

Abstract

The aim of this study was to investigate the potential antioxidant activity of the methanol leaf extract of *Saxifraga rotundifolia* L., depending on the total quantity of phenols, flavonoids and flavonol. The tested extracts showed high phenolic content (324.39 mg GA/g) and small amounts of flavonoids (36.81 mg RU/g) and flavonols (11.52 mg RU/g). The antioxidant activity was determined by a series of *in vitro* methods. The tested extracts showed high level of total antioxidant activity (509.78 mg AA/g), and high degree of ABTS⁺ and DPPH "scavenger" activity with IC₅₀ value of 48.76 µg/mL for ABTS⁺ method and 30.39 µg/mL for DPPH method. The results indicate that the tested extract has significant antioxidant activity and can be a source of natural antioxidants.

Key words: *Saxifraga rotundifolia* L., antioxidant activity, *in vitro*, phenols, flavonoids

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia (mirakoracevic@gmail.com)

²Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia