

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTET U ČAČKU

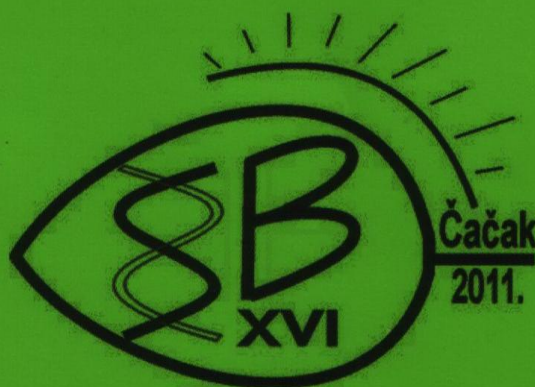


UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF AGRONOMY ČAČAK

XVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA -



Vol. 16. (18), 2011.

Čačak, 4 - 5. Mart 2011. godine

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

63(082)

60(082)

SAVETOVANJE o biotehnologiji sa međunarodnim
učešćem (16 ; 2011 ; Čačak)

Zbornik radova / XVI savetovanje o
biotehnologiji sa međunarodnim učešćem,
Čačak, 4-5. mart 2011. godine ; [organizator]
Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet
u Čačku = [organized by] University of
Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cacak. -
Čačak : Agronomski fakultet, 2011 (Čačak :
Svetlost). - 668 str. : graf. prikazi, tabele
; 24 cm

Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 150. -
Napomene uz tekst. - Bibliografija uz svaki
rad. - Abstracts.

ISBN 978-86-87611-15-3

1. Agronomski fakultet (Čačak)

a) Poljoprivreda - Zbornici

b) Biotehnologija - Zbornici

COBISS.SR-ID 182201356

XVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- Zbornik radova -

Vol. 16. (18), 2011.

ORGANIZATOR I IZDAVAČ:

Agronomski fakultet, Čačak

Organizacioni odbor:

prof. dr Nikola Bokan, prof. dr Drago Milošević,
prof. dr Goran Dugalić, prof. dr Radojica Đoković, dr Mirča Balan doc.

Programski odbor:

prof. dr Dragutin Đukić, dr Radoslav Cerović, prof. dr Miroslav Spasojević,
prof. dr Aleksandar Paunović, Snežana Pašalić, prof. dr. Snežana Bogosavljević-Bošković,
prof. dr Tomo Milošević, prof. dr Vladeta Stevović, prof. dr Leka Mandić,
prof. dr Milena Đurić, prof. dr Milica Cvijović, prof. dr Gordana Šekularac, prof. dr Nikola
Bokan, dr Mirče Balan, dr Vladimir Kurčubić,

Tehnički urednik:

prof. dr Nikola Bokan

Kompjuterska obrada i slog:

Dušan Marković, dipl. ing.

Tiraž: 150 primeraka

Štampa:

Štamparija „Svetlost“ Čačak

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST RAZLIČITIH EKSTRAKATA BILJKE GENTIANA ASCLEPIADEA L.

V. Mihailović¹, Neda Nićiforović¹, Slavica Solujić¹,
M. Stanković¹, M. Mladenović¹, Violeta Ninković²

Izvod: U ovom radu ispitivana je antioksidativna aktivnost metanolskog, hlороformskog, etil acetatnog i *n*-butanolskog ekstrakta korena biljke *G. asclepiadea*, kao i količina ukupnih fenola, flavonoida i flavonola. Najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonola određen je u etil acetatnom ekstraktu, dok najveću količinu flavonoida sadrži metanolski ekstrakt. Etil acetatni ekstrakt pokazuje najveću ukupnu antioksidativnu aktivnost koja iznosi 401,3 mgAA/g, kao i najveći stepen inhibicije lipidne peroksidacije sa vrednošću IC₅₀ od 40,9 µg/mL. Dobijeni rezultati ukazuju da etil acetatni ekstrakt može biti izvor prirodnih antioksidanata i može naći primenu u biološkim sistemima i prehrambenim proizvodima.

Ključne reči: *Gentiana asclepiadea* L., antioksidativna aktivnost, lipidna peroksidacija, ukupna antioksidativna aktivnost, fenolna jedinjenja

Uvod

Autooksidacija nezasićenih masti u prisustvu molekuskog kiseonoka dovodi do hemijske modifikacije lipida i promene kvaliteta lipida. Ovaj proces je iniciran enzimom lipooksigenazom, zagrevanjem, jonizujućim zračenjem, svetlošću, metalnim jonima i katalizom metalo-proteinima (Shahidi i Wanasundara, 1992). Oksidativno kvarenje masti i ulja u prehrambenim proizvodima sprečava se sintetičkim antioksidansima kao što su butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT) i *terc*-butilovani hidroksihinon (TBHQ) (Daker i sar., 2008). Novija istraživanja pokazuju toksičnost sintetičkih antioksidanasa, kao što su BHA i TBHQ, stoga, sve veći interes se pokazuje za primenom prirodnih antioksidanasa kao neškodljivih aditiva (Gharavi i sar., 2007). Istraživanja su pokazala da ekstrakti začinskih, aromatičnih i drugih biljaka su bogati izvori polifenola koji usporavaju oksidativne degradacije lipida i značajno poboljšavaju kvalitet i nutritivne vrednosti hrane (Amarowicz i sar., 2004) što je osnova njihove primene u industriji prehranbenih proizvoda.

Gentiana asclepiadea L. pripada rodu *Gentiana* (Gentianaceae) koji se odlikuje prisusvom sekoiridoida kao gorkih komponenti (svercijamarin, genciopikrozid, sverozid i amarogencin, Jiang i sar., 2005) a primenu nalaze u alkoholnim i bezalkoholnim pićima (Aberham i sar., 2011). *Gentiana asclepiadea* u narodu je poznata kao „trava od žutice“ a njen koren tradicionalno se upotrebljava kao lek za žuticu (Sarić, 1989). Cilj ovog rada je da se odredi antioksidativna aktivnost metanolskog ekstrakta korena biljke

¹ Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (vladam@kg.ac.rs)

² Institut za javno zdravlje Kragujevac, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Srbija

G. asclepiadea, kao i hloroformske, etil acetatne i *n*-butanolske frakcije ovog ekstrakta. Takođe, određene su količine ukupnih fenola, flavonoida i flavonola.

Materijal i metode rada

Biljni materijal i priprema ekstrakata

Biljka je sakupljena na planini Jadovnik (Gostun-Kumanica, na granici Srbije sa Crnom Gorom), u oktobru 2008. godine. Sistematizacija i identifikacija biljke (broj vaučera 16337) izvršena je u Botaničkoj bašti Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Osušen koren biljke (105 g) ekstrahovan je metanolom u Soksletovom aparatu za ekstrakciju, u toku 12 h. Dobijeni ekstrakt je koncentrovan pod vakuumom, pri čemu je dobijeno 105 g ekstrakta (MeOH). Tako dobijeni ekstrakt (16,3 g) rastvoren je u 500 mL destilovane vode, a zatim sukcesivno ekstrahovan hloroformom (3 x 100 mL), etil acetatom (3 x 100 mL) i na kraju *n*-butanolom (3 x 100 mL). Ekstrakti su koncentrovani na vakumu do suvog ostatka, pri čemu je dobijeno 0,45 g hloroformskog (CHCl₃), 0,16 g etil acetatnog (AcOEt) i 2,17 g *n*-butanolskog (*n*-BuOH) ekstrakta. Ekstrakti su ostavljeni na tamnom mestu na 4 °C do daljeg korišćenja.

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, tj. mg GA/g ekstrakta.

Ukupne količine flavonoida i flavonola određene su spektrofotometrijskim metodama pomoću AlCl₃. 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 (± standardna devijacija).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata

In vitro antioksidativna aktivnost ekstrakata ispitivana je metodama ukupne antioksidativne aktivnosti i inhibicije lipidne peroksidacije.

Ukupna antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata određena je metodom pomoću fosformolibdena (Prieto i sar., 1999). Metoda se zasniva na redukciji Mo (VI) do Mo (V) pomoću antioksidanasa 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 apsorbancu 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.

Metoda inhibicija lipidne peroksidacije se zasniva na gvožđe katalizovanoj reakciji razlaganja hidroperoksida, pri kojoj se Fe²⁺ oksiduje do Fe³⁺, čija se koncentracija može odrediti merenjem apsorbance na 500 nm uz dodatak NH₄SCN (Hsu i sar., 2008). Napravi se serija dvostrukih razblaženja uzorka. U 0.5 mL uzorka se doda

2,5 mL emulzije linoleinske kiseline (0,2804 g linoleinske kiseline i 0,2804 g Tween 40 u 50 mL fosfatnog pufera, pH=7,0) i smeša se inkubira u mraku na temperaturi od 50 °C u toku 72 h. Nakon toga se 0,1 mL smeše pomeša sa 4,7 mL etanola (75%), 0,1 mL NH₄SCN (30%) i 0,1 mL FeSO₄ (20mM), meša 3 min i meri apsorbancu na 500 nm (u odnosu na slepu probu koja umesto uzoraka i emulzije linoleinske kiseline sadrži iste zapremine etanola). Inhibicija lipidne peroksidacije se izračunava prema jednačini:

$$\%inhibicije = ((Ak - Au) / Ak) \times 100$$

Ak je apsorbancu kontrole, koja se priprema kao i uzorci, samo što se umesto ispitivanog rastvora dodaje ista zapremina etanola, a *Au* predstavlja apsorbancu uzorka. Vrednost IC₅₀, koja se definiše kao koncentracija ispitivanog uzorka koja lipidnu peroksidaciju inhibira za 50%, izražena kao µg/mL ekstrakta, izračunata je 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 predstavljaju veliku grupu sekundarnih metabolita biljaka, počev od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline, do kompleksnih jedinjenja kao što su flavonoidi, flavonoli, proantocijanidini. Antioksidativne osobine ove grupe jedinjenja uzrokovane su njihovim redoks osobinama, mogućnošću helatizacije metala ili „hvatanja” radikalnog kiseonika (Xu i sar., 2010). Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i flavonola u ekstraktima korena biljke *G. asclepiadea* dat je u Tabeli 1. Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da se najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonola nalazi u etil acetatnom ekstraktu korena biljke i iznosi 146,6 mgGA/g ukupnih fenola i 22,7 mgRU/g flavonola. Najveća količina ukupnih flavonoida od 52,0 mgRU/g zabeležena je u metanolskom ekstraktu korena biljke.

Rezultati antioksidativne aktivnosti različitih ekstrakata korena *G. asclepiadea* ispitivanih *in vitro* metodama dati su u Tabeli 2. Među ispitivanim ekstraktima etil acetatni ekstrakt je pokazao najveći ukupni antioksidativni kapacitet koja iznosi 401,3 mgAA/g, kao i najveći stepen inhibicije lipidne peroksidacije sa vrednošću IC₅₀ od 40,9 µg/mL.

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i flavonola u ekstraktima korena biljke *G. asclepiadea*

Table 1. The total phenolic, flavonoid and flavonols contents in root extracts of *G. asclepiadea*

Ekstrakti <i>Extraks</i>	Ukupni fenoli mg GAE/g ekstrakta <i>Total phenolic content mg GAE/g dry extract</i>	Ukupni flavonoidi mg RU/g ekstrakta <i>Flavonoid content mg RU/g dry extract</i>	Ukupni flavonoli mg RU/g ekstrakta <i>Flavonols content mg RU/g dry extract</i>
MeOH	27,8 ± 2,5	52,0 ± 2,0	5,2 ± 0,4
CHCl ₃	76,6 ± 2,6	17,5 ± 1,6	4,5 ± 0,7
AcOEt	146,6 ± 7,5	44,6 ± 0,2	22,7 ± 1,4
<i>n</i> -BuOH	73,5 ± 1,5	29,4 ± 0,2	15,3 ± 1,0

Pored AcOEt frakcije značajnu antioksidativnu aktivnost pokazali su i CHCl_3 i *n*-BuOH frakcije, ispoljavajući približno isti nivo inhibicije lipidne peroksidacije. Visok antioksidativni potencijal AcOEt ekstrakta može se dovesti u vezu sa visokim sadržajem fenola i flavonola u ispitivanom ekstraktu. Antioksidativna aktivnost ekstrakata komparirana je sa prirodnim antioksidansima, galnom kiselinom i α -tokoferolom, pri čemu je zapaženo da su CHCl_3 , AcOEt i *n*-BuOH ekstrakti pokazali veći stepen inhibicije lipidne peroksidacije (manje IC_{50} vrednosti) od galne kiseline, a znatno slabiju aktivnost od α -tokoferola.

Tabela 2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata korena biljke *G. asclepiadea*
Table 2. Antioxidative activity of root extracts of *G. asclepiadea*

Ekstrakti i standardi <i>Extraks and standars</i>	Ukupni antioksidativni kapacitet (mg AA/g ekstrakta) <i>Total antioxidant capacity (mg AA/g dry extract)</i>	Inhibicija lipidne peroksidacije, IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) <i>Inhibitory activity toward lipid peroxidation, IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)</i>
MeOH	68,5 ± 0,5	439,3 ± 18,0
CHCl_3	325,8 ± 12,8	183,2 ± 11,5
AcOEt	401,3 ± 22,5	41,0 ± 3,6
<i>n</i> -BuOH	318,7 ± 15,1	116,9 ± 8,9
Galna kiselina	-	255,4 ± 11,7
α -Tokoferol	-	0.5 ± 0.1

Zaključak

U ovom radu prikazani su originalni rezultati, po prvi put, antioksidativne aktivnosti ekstrakata korena biljke *G. asclepiadea*, u cilju selektivne analize antioksidativne aktivnosti ekstrakata različite polarnosti.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani ekstrakti, posebno etil acetatni ekstrakt, poseduju visok stepen antioksidativne aktivnosti što daje povoda daljim istraživanjima ove biljke u svrhu određivanja obima primene kao prirodnog antioksidansa u prehranbenim proizvodima.

Napomena: Istraživanja u ovom radu deo su projekta STAR AAP 024 koji finansira Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Republike Srbije.

Literatura

- Aberham A., Pieri V., Croom Jr. E.M., Ellmerer E., Stuppner H. (2011). Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 54, 517-525.
- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry 84, 551-562.

- Brighente I.M.C., Dias M., Verdi L.G., Pizzolatti M.G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology* 45, 156–161.
- Daker M., Abdullah N., Vikineswary S., Goh P.C., Kuppusamy U.R. (2008). Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. *Food Chemistry* 107, 1092–1098
- Gharavi N., Haggarty S., El-kadi A.O.S. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Current Drug Metabolism* 8(1), 1–7.
- Hsu C.K., Chiang B.H., Chen Y.S., Yang J.H., Liu C.L. (2008). Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry* 108, 633–641.
- Jiang R.W., Wong K.L., Chan Y.M., Xu H.X., But P.P.H., Shaw P.C. (2005). Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis. *Phytochemistry* 66, 2674–2680.
- Kumaran A., Karunakaran R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40, 344–352.
- 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. *Analytical Biochemistry* 269, 337–341.
- Sarić M. (1989). *Lekovite biljke SR Srbije*, 278–279. Beograd, Srbija: SANU.
- Shahidi F., Wanasundara P. K. J. P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32(1), 67–103.
- 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.
- Xu F., Li L., Huang X., Cheng H., Wang Y., Cheng S. (2010). Antioxidant and antibacterial properties of the leaves and stems of *Premna microphylla*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(23), 2544–2550.

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DIFFERENT EXTRACTS *GENTIANA ASCLEPIADEA* L.

V. Mihailović¹, Neda Nićiforović¹, Slavica Solujić¹,
M. Stanković¹, M. Mladenović¹, Violeta Ninković²

Abstract

In this study was investigated antioxidant activity of methanol, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol roots extracts of *G. asclepiadea*, as well as the amounts of total phenols, flavonoids and flavonols. The highest content of total phenols and flavonols was determined in the ethyl acetate extract, while the methanol extract contained the largest amount of flavonoids. Ethyl acetate extract showed the highest total antioxidant activity of 401.3 mgAA/g and the highest inhibitory activity toward lipid peroxidation with IC₅₀ value of 40.9 µg/mL. These results showed that ethyl acetate extract can be a source of natural antioxidants and may find application in biological systems and food products.

Key words: *Gentiana asclepiadea* L., antioxidant activity, lipid peroxidation, total antioxidant activity, phenolic compounds

¹ Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia (vladam@kg.ac.rs)

² Institute for Public Health, Kragujevac, Nikole Pašić 1, 34000 Kragujevac, Serbia