

ИДЕНТИФИКАЦИЈА И ИЗОЛАЦИЈА ПОЛИФЕНОЛА СА ПОТЕНЦИЈАЛНОМ АНТИОКСИДАТИВНОМ И АНТИРАДИКАЛСКОМ АКТИВНОШЋУ

Улетиловић Снежана, Налесник Милада

Катедра за биохемију и хемију, Медицински факултет Универзитет у Бањалуци

Abstract

ULETILOVIĆ, Snežana, Milada NALESNIK: The identification and isolation of polyphenols with a possible antioxidative and antiradical activity. *Skup 3*: 41-47. [The department of biochemistry and chemistry, Medical Faculty University of Banjaluka].

The purpose of this work was to come to the conclusion on basis of number of different kinds of polyphenols presence and its quantity in black currant fruits and grape about its antioxidative and antiradical activity. The isolation of flavonoids were carried out extraction with ethyl acetate and than acid hydrolysis with hydrochloric acid. The identification of polyphenols and the structure characterization were carried out using techniques of column and thin layer chromatography, defining Rf value and comparation with standards, recording UV- spectars, and defining melting point. Final results showed the presence of quercetin, and p-coumaric acid in both sort of fruit, while in grape there are gallic acid and catechin, epicatechin and luteolin and in black currant there are caffeic acid and myricetin. According to a sort of presence of polyphenols and its quantity of participation in fruits of grape, this fruit has an adventage in antioxidative and antiradical activity. Black currant has smaller amount of different sorts of flavonoides, but their structure characteristics are so good that they make safe antioxidative activity.

Key words: polyphenols, chromatographic methods, antioxidative activity

Сажетак

Циљ овог рада је био да се на основу различитих врста и количинске заступљености полифенола у плодовима црне рибизле и црног грожђа изведу закључци о њиховој антиоксидативној и антирадикалној активности. Изолација полифенолних једињења је вршена екстракцијом са етил ацетатом и накнадном хидролизом са хлороводоничном киселином. Идентификација изолованих једињења вршена је техникама танкослојне и колонске хроматографије, одређивањем Rf вриједности и поређењем са Rf вриједностима стандарда, снимањем UV-спектара те одређивањем тачке топљења. Добијени резултати показали су присуство кверцетина и п-кумаринске киселине у обе врсте воћа, док су у грожђу још заступљени гална киселина, катехин, епикатехин и лутеолин а у црној рибизли кафеинска киселина и мирицетин. Према врсти заступљености полифенола те количинском удјелу у плодовима грожђа, грожђе би имало већу антиоксидативну и антирадикалску активност у односу на црну рибизлу. Црна рибизла има мању разноликост полифенола али су њихове структурне карактеристике такве да осигуравају добру антиоксидативну активност.

Кључне ријечи: полифеноли, хроматографске методе, антиоксидацијска активност.

УВОД

По свом хемијском саставу, воће је богат извор разних есенцијалних микронутриената као што су витамини и минерали, али у задње вријеме све се више истиче важност воћа као богатог дјеловања у људском организму. То је велика група полифеноних једињења (Kaur et al., 2001.) која су због своје комплексне хемијске грађе подијељена у бројне групе од којих су најважније флавоноиди и фенолне киселине. Заштитна улога флавоноида у биолошким системима проистиче из њихове јаке антиоксидацијске и антирадикалске активности (Rice-Evans, et al. 1997.). Зато се флавоноидима приписују и многа терапијска дјеловања, нпр. антибактеријско, протуупално, антиалергијско, антимутагено, антивирално и антиканцерогено (Rice-Evans, et al. 1995., Bors et al. 1990., Harborne et al 2000.). Њихово антиоксидацијско дјеловање приписује се њиховој способности спаривања ("хватања") електрона слободног радикала, хелатног везивања јона прелазних метала (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Mg^{2+}) (Ferrali et al 1997.), активирање антиоксидацијских ензима (Elliot et al. 1992.) и инхибирања оксидаза (Cos et al. 1998.).

У сваком организму постоји равнотежа између оксидативног стреса, тј. оштећења које радикали и оксиданси изазивају на површинским мембранама и рецепторима и антиоксидативне репарације. Ако изостане антиоксидацијска заштита против насталих слободних радикала, може доћи до оксидативног стреса на неколико начина због дјеловања одређених токсина или физиолошким стресом (Halliwell et al. 1994.). Слободни радикали су најчешће реактивне врсте кисеоника (РОС) као што су пероксидни радикал анион (O_2^-), хидроксилни радикал (OH^\cdot), хидропероксидни радикал (HO_2^\cdot), водоник пероксид (H_2O_2) али се у задње вријеме све чешће спомињу и реактивне врсте азота (HONO , NO , NO_3 радикали и др.) као и радикали из спољашње средине настали под утицајем UV-зрачења, X-зрака, дуванског дима и загађења из зрака (Friedman et al. 2000.). Они су укључени у развојне процесе бројних болести, као што су: тумори, кардиоваскуларне болести, катаракта, дијабетес мелитус, гастроинтестиналне упалне болести, болести јетре, макуларна дегенерација и други упални процеси. Они доприносе старењу ћелија, мутагенизи, оштећењу ДНК и оксидацији липопротеина ниске густине (ЛДЛ). Слободни радикали су јако реактивни (због неспереног електрона) и оштећењем липидне мембране започиње једна ланчана реакција пероксидације липида која је основни узрок атеросклерозе. Управо због потенцијално штетне природе слободних радикала у тијелу постоје различити антиоксидацијски механизми одбране укључујући ензиме, протеине, витамине те и флавоноиде као хватаче слободних радикала.

Количином полифенола се, између различитих врста воћа, посебно истиче тамно обојено бобичасто јагодасто воће из породица *Ericaceae* (боровнице), *Rosaceae* (купина, малина, трешња, вишња, грожђе, јагода) те *Caprifoliaceae* (црна рибизла и бобице базге) (Määttä-Riihinen et al. 2004.). Најважнији полифеноли присутни у овом воћу су фенолне киселине, флавоноли, флаван-3-оли, антоцијанини и проантоцијанидини. Редовном конзумацијом тог воћа и њихових производа знатно се смањује ризик од настанка различитих болести (Bermudez-Soto et al. 2007., Olsson M.E. et al. 2004., Seeram N.P. et al. 2006., Garcia-Alonso J. et al. 2006.) што се приписује високом садржају полифенолних једињења у воћу.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Црно грожђе (Сорта мирисавка) и црна рибизла (*Ribes nigrum*) убрани су на подручју бањалучке регије у стадијуму конзумне зрелости, замрзнути на -20°C и чувани до анализе. Анализа узорака рађена је у паралелама.

Стандарди: гална киселина, кафена киселина, п-кумаринска, кверцетин, катехин, лутеолин и мирицетин набављени су у фирми Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD). Стандарди су припремани у концентрацијама од 125mg/L.

Посебна пажња посвећена је избору погодног растварача за екстракцију. Као екстракциона средства кориштени су етанол, ацетон и етил ацетат. Најбољи резултати добијени су примјеном етил ацетата тако да су слободне и коњугиране форме флавонола и фенолних киселина екстрахиране из воћа етил ацетатом према поступку већ раније описаном у литератури (M ä ä t t ä -R i i h i n e n et al. 2004.). Прије екстракције смрзнуто воће је хомогенизирано, уситњено и за анализу је одвагано ~5g воћа. Екстракција са етил ацетатом (5 x 5mL) вршена је уз помоћ лијевка за одвајање. Сви екстракти су спојени и подвргнути хидролизаци да би се из гликозида полифенолних једињења издвојили агликони. Хидролиза је изведена са концентрованом HCl киселином до 0,6 mol/L коначне конц., загријавањем на воденој купели на температури $70-80^{\circ}\text{C}$ у времену од 30 минута. Након завршене хидролизе закисељени екстракт је упарен до суха на ротационом вакуум упаривачу, осушен и до анализе чуван у добро затвореним тамним посудицама заштићеним од свјетлости.

Идентификација полифенолних једињења урађена је уз помоћ танкослојне хроматографије.. Као стандардна фаза за TLC хроматографију кориштене су плоче DC-Fertigplatten RP-18F_{254s} (10 x 20 cm) фирме Merck, са слојем силикагела дебљине 0,25mm. Као мобилна фаза кориштени су различити системи растварача:

- a) бензен : етил ацетат : мравља киселина = 30 : 15 : 5 (в/в)
- b) етил ацетат : мравља киселина : оцтена киселина : вода = 100 : 11 : 11 : 27 (в/в)
- c) бензен : етил ацетат : метанол = 5 : 5,3 : 1,5 (в/в)
- d) етил ацетат : мравља киселина : етилметил кетон : вода = 50 : 10 : 30 : 10 (в/в)
- e) толуен : метанол = 9 : 1 (в/в)

Сви употребљени растварачи су п.а. чистоће. Добијени хроматограми су посматрани под UV-свјетлом $\lambda=254\text{nm}$ и $\lambda=360\text{nm}$, у циљу идентификације полифенолних једињења.

За одређивање количине присутних флавоноида и фенолних киселина кориштена је колонска хроматографија (стаклена колона 20x200cm, пуњена слојем силикагела Kiesielgur). Као средство за испирање колоне кориштен је систем растварача; бензен : етил ацетат : мравља киселина = 30 : 15 : 5 (в/в). Издвојени елуати исте Rf вриједности су сакупљани, отпарени на вакуум упаривачу, сушени до константне масе и вагани. Рачунати су приноси за свако издвојено полифенолно једињење.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У овом раду за издвајање полифенолних једињења из узорака црног грожђа и црне рибизле кориштена су три различита екстракциона средства етанол, ацетон и етил ацетат. Најбољи резултати су добијени примјеном етил ацетата који је и иначе у литератури најчешће предлаган (Jakobek et al. 2008.).

Раздвајање полифенола и њихова идентификација вршена је методом танкослојне хроматографије. Највећи проблем у хроматографској анализи је

вредновање ефикасности покретних фаза као и избор њихове оптималне комбинације за доказивање одређене групе једињења. Најбоља комбинација покретне фазе је она која омогућује највеће разлике у R_f вриједностима. У сврху квалитативне анализе полифенола у екстрактима црног грожђа и црне рибизле испитана је ефикасност пет покретних фаза а за најприкладнију је одабрана комбинација бензен : етил ацетат : мравља киселина = 30 : 15 : 5 (в/в). Након проведене хроматографске технике а уз помоћ стандардних супстанци и израчунатих R_f вриједности доказана је присутност кверцетина и п-кумаринске киселине у обе врсте воћа док су у грожђу још присутни гална киселина, катехин и лутеолин а у црној рибизли кафена киселина и мирицетин.

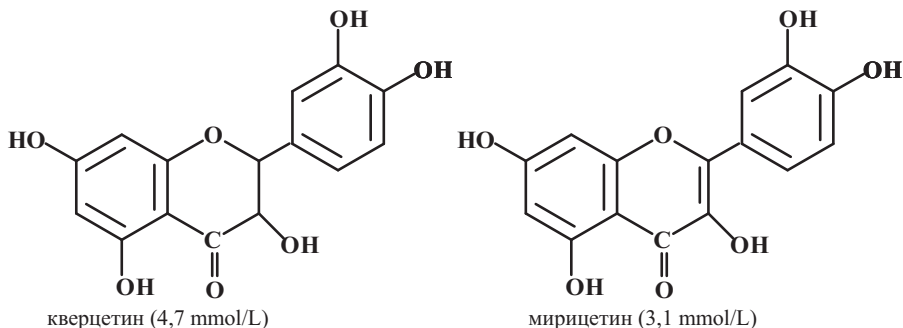
За квантитативно одређивање полифенолних једињења у воћном материјалу кориштена је техника колонске хроматографије. Након упарвања и сушења издвојених елуата добијени су резултати који су приказани у Табели 1.

Таб. 1: Количина полифенолних једињења у црном грожђу и црној рибизли израженим у процентима

полифенолно једињење	црно грожђе	црна рибизла
кверцетин	40	14
п-кумаринска киселина	10	19
гална киселина	20	-
катехин	1	-
епикатехин	1	-
лутеолин	2	-
кафеинска киселина	-	10
мирицетин	-	35

Из ових резултата може се видјети да кверцетина има за 65% више у грожђу него у црној рибизли, док мирицетина којег има око 35% у црној рибизли у узорку грожђа није било ни у траговима. Већи проценат галне киселине 20% нађен је у грожђу (гална киселина је једињење којем се приписује највећа антиоксидативна активност од свих полифенолних једињења) а у црној рибизли није нађена.

На основу добијених вриједности за количине полифенолних једињења у црном грожђу и црној рибизли може се закључити да по количинској заступљености и врсти полифенолних једињења предњачи грожђе. За очекивати је да би грожђе имало и већу антиоксидативну активност у односу на црну рибизлу због већег процентуалног удјела кверцетина који је најјачи антиоксиданс од свих флавоноида што је и доказано у многим радовима (B u r d a et al. 2001.). Кверцетин има хидроксилну групу у положају 3, двоструку везу између другог и трећег С атома и катехолну структуру прстена В те кето групу на четвртном С атому што га чини далеко јачим "хватачем" слободних радикала. Супериорност кверцетина у инхибицији оксидативних оштећења у односу на мирицетин приписује се постојању двоструке везе између другог и трећег С атома. Коњугација двоструких веза између прстена А и В омогућава резонанцијску стабилизацију преко већег броја ароматских језгара, што повећава стабилност флавоноидних радикала. Тако кверцетин који има у прстену С 2,3 двоструку везу и 4-кето групу показује и највишу антиоксидативну активност (ТЕАС-вриједност 4,7 mmol/L), док мирицетин који у прстену С нема двоструке везе (што узрокује мању стабилност флавоноидног радикала) има антиоксидацијску активност 3,1 mmol/L (R o b a k et al. 1988.).



У принципу агликони су много снажнији антиоксиданси од одговарајућих гликозида, а антиоксидативна активност флавоноидских гликозида се смањује с порастом гликозидних група. Осим саме присутности и укупног броја гликозидних група важну улогу има и положај у ком се налази гликозидна група као и структура шећера (Ratty et al.1988.).

Присутност појединих флавоноида доказивана је не само танкослојном хроматографијом односно поређењем R_f вриједности изолованих једињења са R_f вриједностима стандарних супстанци него и одређивањем тачке топљења те снимањем UV- спектра датих једињења. Најбоље слагање са референтним једињењем имао је кверцетин који је имао Т.Т. 150-160⁰С док је код лутеолина Т.Т. била већа од 300⁰С (није имала тачно дефинисан интервал) што се може приписати присутном онечишћењу које је немогуће избјећи овом техником изолације јер би се вишеструком прекристализацијом губило на приносу реакције. Постигнута је добра сагласност између UV-спектра кверцетина изолованог из грозђа и стандарда кверцетина. Оба спектра имају апсорпционе врпце у подручју 250-270 nm (трака I) и у подручју 320-390 nm (трака II).

ЗАКЉУЧАК

У сврху сепарације, идентификације и квантификације полифенола у воћу развијене су бројне хроматографске методе, а избор технике највише зависи од врсте истраживања, групе полифенола која се жели анализирати те опремљености лабораторија.

Танкослојна и колонска хроматографија су најједноставније и најјефтиније технике које су биле дјелимично истиснуте из примјене због поступног увођења HPLC-методе (течна хроматографија под високим притиском). Данас се ове технике могу доста успјешно користити као прегледне методе (енгл.сcreening) анализе полифенола у воћу. У овом раду тим техникама идентификована су четири флавоноида и 3 фенолне киселине. Метода је обезбједила добру репродуктивност резултата.

Употреба црног грозђа и црне рибизле у прехрани је веома значајна. Досадашња сазнања указују на позитивно и заштитно дјеловање ове врсте воћа на људско здравље због велике количине природних антиоксидативних компонената међу којима су полифенолна једињења. У овом раду показало се да и грозђе и црна рибизла имају значајне количине антиоксидативних полифенолних једињења, али да је количином и разноврсношћу знатно богатије грозђе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaur, C., H.C. Kapoor: Antioxidants in fruits and vegetables –the millenium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703-725. (2001)
2. Rice-Evans, C., N.J. Miller, G. Paganga: Antioxidant properties of phenolic compouds. *Trends in plant science*, 2: 152-159. (1997)
3. Rice-Evans, C., N.J., Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res.*, 22: 375-83. (1995)
4. Bors W., W. Heller, C. Michel, M. Saran: Flavonoids as antioxidant: Determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186: 343-55. (1990)
5. Harborne, J.B., C.A. Williams: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55:481-504. (2000)
6. Ferrali, M., C. Signorini, B. Caciotti, L. Sugherini, L. Ciccoli, D. Giachetti, M. Comporti: Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett*, 416: 123-9. (1997)
7. Elliot, A.J., S.A. Scheiber, C. Thomas, R.S. Pardini: Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochem Pharmacol.*, 44: 1603-8. (1992)
8. Cos P., L. Ying, M. Calomme, Jp. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A.J. Vlietinck, V. Vander-Berghe: Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod*, 61: 71-6. (1998)
9. Halliwell, B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequences? *Lancet*, 344: 721-4. (1994)
10. Friedman, M., S. Kazazić, N. Kezele, L. Klasnić, S.P. McGlynn, S. Pečur, W.A. Pryor: Role of nitrogen oxides in ozone toxicity. *Croat Chem Acta*, 73: 1141-51. (2000)
11. Määttä-Riihinen, K.R., A. Kamal-Eldin, P.H. Mattila, A.M. Gonzales-Paramas, A.R. Törrönen: Distribution and content of phenolic compoundsin eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4477-4486. (2004)
12. Bermudez-Soto, M.J., M. Larossa, J.M. Garcia-Cantalejo, J.C. Espin, F.A. Tomas-Barberan, M.T. Garcia-Conesa: Up-regulation of tumor suppressors carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18: 259-271. (2007)
13. Olsson, M.E., K.E. Gustavsson, S. Andersson, A. Nilsson, R.D. Duan: Inhibition of cancer cell proliferaton in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7264-7271. (2004)
14. Seeram, N.P., L.S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H.S. Scheuller, D. Heber: Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:9329-9339. (2006)
15. Garcia-Alonso, J., G. Ros, M.L. Vidal-Guevara, M.J. Periago: Acute intake of phenolic-rich juice improves, antioxidant status in healthy subjects. *Nutrition Research*, 26: 330-339. (2006)
16. Jakobek, L., M. Šeruga, I. Novak, M. Medvidović-Kosanović, I. Lukačević: Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode, *Pomologia Croatica*, 4. (2008)
17. Burda, S., W. Oleszek: Antioxidant and antiradical activities of flavanoids. *J. Agric. Food Chem*, 49:2774-9. (2001)
18. Robak, J., Gryglewski R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, 37: 837-41. (1988)
19. Ratty, A.K., N.P. Das: Effects of flavonoids on nonenzymathic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol.*, 39: 69-79. (1988)

Примљено: 13.5.2010.
Одобрено: 19.5.2011.