

Ispitivanje antioksidantnog sinergističkog efekta askorbinske kiseline i ekstrakta pomorandže na model sistemu svinjske jetre

Ispitivana je antioksidantna aktivnost vitamina C i flavonoida, pri pojedinačnom i zajedničkom delovanju. Antioksidantna aktivnost određivana je merenjem inhibicije lipidne peroksidacije na model sistemu svinjske jetre. Ispitivanja su vršena na četiri grupe: kontrolnoj (netretirana), grupi tretiranoj vitaminom C, grupi tretiranoj flavonoidima i grupi kojoj su dodavani i vitamin C i flavonoidi. Dobijeni rezultati ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika između kontrolne grupe i ostalih grupa, kao ni između koncentracije lipidnih peroksida pre i posle stimulisanja u istoj grupi, što je verovatno posledica korišćenja nestandardizovanog model sistema svinjske jetre i malih koncentracija ispitivanih supstanci.

Uvod

Vitamin C (askorbinska kiselina) je derivat furana koji ima bitnu ulogu u organizmu. Neophodan je za sintezu kolagena, važna je gradivna komponenta krvnih sudova, ligamenata i kostiju, ima bitnu ulogu u sintezi neurotransmitera norepinefrina. Jedno od najbitnijih svojstava ove supstance je da učestvuje u redoks procesima u organizmu delujući kao antioksidans. Nalazi se u velikim količinama u citrus voću, a naročito u limunu i pomorandži (53 mg vitamina C u 100 mL soka pomorandže). U pomorandži je pored vitamina C prisutan i kompleks flavonoida, polifenolnih jedinjenja. Njihova snažna antioksidantna aktivnost se objašnjava prisustvom fenolnih hidroksi grupa koje se ponašaju kao donori vodonika koji odstranjuju hidroksilne radikale, superoksidne anjone i

lipidne peroksi radikale. Ranija istraživanja su pokazala da 90% svih flavonoida pomorandže čini hesperetin (Miller ND; Peterson *et al.* 2006). Hesperetin je aglikon hesperidina, a po strukturi hesperetin je (S)-2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-4H-1-benzopiran-4.

Postoje dokazi da vitamin C i flavonoidi pri sinergističkom delovanju imaju mnogo veću i dužu antioksidantnu aktivnost od bilo koja dva pojedinačno. Mehanizam nije otkriven u potpunosti, a jedno od mogućih objašnjenja je da su flavonoidi bolja antioksidantna sredstva od askorbinske kiseline jer imaju niži redoks potencijal. Na pH10 njihovi redoks potencijali se kreću od 0.23 – 0.75 V, dok su na pH7 približno četiri puta niži a redoks potencijal askorbinske kiseline na pH7 je 0.06V. Flavonoidi kao bolja redukciona sredstva reaguju pre vitamina C i tako usporavaju njegovu oksidaciju (Thompson Healthcare 2006; Mira *et al.* 2002; Chauhan 2003; Chinmay *et al.* 1995).

Raniji radovi ukazuju da askorbinska kiselina pokazuje dobra antioksidantna svojstva kako u *in vivo* tako i u *in vitro* modelima (Kováčiková *et al.* 1995; Chinmay *et al.* 1995). Hesperetin se takođe pokazao kao dobar antioksidant u različitim model sistemima (Pietta 2000). Korišćenjem čistog vitamina C i flavonoida, koji se dobijaju izolovanjem iz pomorandže, može se proveriti pretpostavka o sinergističkom delovanju. Model sistem svinjske jetre omogućava ispitivanje antioksidantnih svojstava različitih supstanci. Prooksidantima se može stimulisati lipidna peroksidacija (LPO) na jetri. Dodavanjem ispitivanih antioksidanata inhibira se lipidna peroksidacija. Određivanjem razlike koncentracija lipidnih peroksida pre i posle stimulacije dobija se procenat inhibicije LPO-a koju vrše antioksidanti. što je veći procenat inhibicije ispit-

Marija Janković (1990), Kruševac, 21. srpske divizije 55/8, učenica 1. razreda Gimnazije u Kruševcu

vana supstanca je bolji antioksidant (Čučulanović 2002).

Cilj rada je ispitivanje antioksidantnog sinergističkog efekta čistog vitamina C i izolovanih flavonoida iz pomorandže, koje oko 90% čini hesperetin. Ispitivanje je vršeno na *in vitro* model sistemu svinjske jetre i upoređivane su antioksidantne aktivnosti izolovanih flavonoida, vitamina C i smeše flavonoida sa vitaminom C.

Materijal i metode

Antioksidantna svojstva vitamina C i flavonoida na jetri ispitivana su u *in vitro* sistemu, a kao model korišćena je svinjska jetra. Procenat inhibicije lipidne peroksidacije (u daljem tekstu LPO) izračunat je na osnovu dobijenih koncentracija malondialdehida (MDA), produkta oksidativne degradacije lipidnih peroksida u homogenatu jetre. Jetra je bila izložena kiseoniku (stoji na vazduhu) pa su se i bez stimulisanja u njoj se generisali inicijalni lipidni peroksidi. Stimulisani lipidni peroksidi generisali su se dodavanjem prooksidanata homogenatu jetre. Određivanjem koncentracije inicijalnih LPO i njenim oduzimanjem od koncentracije stimulisanih LPO dobijamo koncentraciju indukovanih LPO, tako zanemarujući početnu koncentraciju MDA koja je nastala usled dejstva sredine (nekontrolisano). Nastali MDA sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) stvara konjugat crvene boje sa maksimumom apsorpcije na 540 nm, što se koristi za njegovu kvantifikaciju.

Postojale su četiri grupe:

- I grupa: kontrolna
- II grupa: flavonoidi (u koju je dodavano po 0.2 mL ekstrakta izolovanih flavonoida)
- III grupa: vitamin c (dodavano je po 0.2 mL koncentracije 0.94 mmol/L)
- IV grupa: hesperetin + vitamin c (dodavano je po 0.1 mL rastvora askorbinske kiseline i 0.1 mL rastvora ekstrakta).

Izolovanje flavonoida iz soka pomorandže

Ukupni flavonoidi koji se koriste za tretiranje grupa su izolovani iz soka pomorandže ekstrakcijom sistemom rastvarača etil acetat/mravlja kiselina/sirćetna kiselina/voda u odnosu 100:11:11:26. Rađena je i kisela hidroliza ekstrakta radi određivanja kon-

centracije flavonoida, pa je pomoću $AlCl_3$ (koji je rastvoren u 5% rastvoru sirćetne kiseline u metanolu) izazivana karakteristična bojena reakcija sa flavonoidima čija je koncentracija određivana spektrofotometrijski merenjem apsorbance na $L_{max} = 425$ nm (Maleš *et al.* 2005). Apsorbanca je merena tri puta. Koncentracija flavonoida je izračunata stehiometrijski. Dobijeno je da koncentracija iznosi 1.32 mmol/L.

Određivanje koncentracije askorbinske kiseline u ekstraktu pomorandže

Koncentracija askorbinske kiseline u pomorandži određivana je titracionom metodom pomoću Tillmans-ovog reagensa (Tillmans-ov reagens je 0.001 M rastvor 2,6-dihlorfenolindofenola). Izračunavanja su rađena stehiometrijski na osnovu podatka da 1 mol Tillmans-ovog reagensa odgovara 1 mol-u askorbinske kiseline. Vršeno je po tri ponavljanja za svaku pomorandžu radi dobijanja rezultata što veće tačnosti. Koncentracija vitamina C je 0.94 mmol/L pomorandže. Dobijena koncentracija je korišćena za pravljenje rastvora askorbinske kiseline kojom su tretirane grupe (Trajković *et al.* 1985).

Antioksidantna svojstva vitamina C i flavonoida na jetri:

Postupak spremanja homogenata. Uzeto je parče jetre težine 1.00 g, stavljeno u avan, preliveno sa 10 mL rastvora kalijum-hlorida ($c = 0.16$ mol/L), homogenizovano je i dodato je još 30 mL kalijum-hlorida. Homogenat je podeljen u 16 epruveta po 2 mL. Slepe probe su pravljene za svaku grupu mešanjem 2 mL KCl i 0.2 mL BHT ($c = 10$ mmol/L) i dodavanjem u zavisnosti od grupe po 0.2 mL rastvora vitamina C, rastvora flavonoida i za treću grupu 0.1 mL rastvora vitamina C i 0.1 mL rastvora flavonoida. Svaka grupa je imala po dve epruvete sa inicijalnim i sa stimulisanim lipidnim peroksidacijama. U inicijalne epruvete je stavljano po 0.2 mL BHT i 2 mL homogenata, a u stimulisane je stavljano po 0.1 mL askorbinske kiseline ($c = 26$ mmol/L), 0.1 mL Morove soli ($c = 0.04$ mmol/L) i 2 mL homogenata. U drugu grupu je stavljano u svaku epruvetu i po 0.2 mL ekstrakta rastvora flavonoida. U treću je dodavano po 0.2 mL rastvora askorbinske kiseline. U četvrtu grupu je dodavano 0.1 mL rastvora flavonoida i 0.1 mL rastvora askorbinske kiseline. Zatim su se epruvete inkubirale 10 min u vodenom kupatilu na 37°C.

Posle inkubiranja je u svaku epruvetu, osim u slepu probu, dodato po 1 mL TBA ($c = 55$ mmol/L, koja je rastvorena u 0.1 M natrijum hidroksidu) i 1 mL TCA (20%). Onda su se epruvete inkubirale 10 min na 100° C. Stavljene su u centrifugu 10 min na 3000 obrtaja. Kada su izvađene iz centrifuge određivana je apsorbance spektrofotometrijski na 540 nm.

Apsorbance su uvrštene u formule (1) i (2) i dobijeni su rezultati za sadržaj inicijalnih lipidnih peroksida i sadržaj lipidnih peroksida nakon stimulisane lipidne peroksidacije.

Sadržaj inicijalnih lipidnih peroksida:

$$K_{\text{ipo}} = \frac{A_k}{e} \times \frac{t_V}{t_P} \times R \times 10 \quad (1)$$

Sadržaj lipidnih peroksida nakon stimulisane lipidne peroksidacije:

$$S_{\text{ipo}} = \frac{A_p}{e} \times \frac{t_V}{t_P} \times R \times 10 \quad (2)$$

Ovde je: A_k – apsorbance dobijene za inicijalnu LP, A_p – apsorbance dobijene za stimulisanu LP, t_V – zapremina uzorka (homogenata), t_P – zapremina probe, R – razblaženje ekstrakta, e – molarni apsorpcioni koeficijent (0.156 mmol/mL), 10 – faktor za preračunavanje na gram tkiva (10% homogenat)

Ispitivanja na jetri su ponovljena četiri puta. Postojala su četiri različita uzorka iste jetre. Za svaki uzorak rađene su po dve inicijalne i dve stimulisane probe (Čučulanović 2002).

Dobijene vrednosti su obrađivane median testom programa *Statistica*. Upoređivani su različite probe istih uzoraka, uzorci iz različitih grupa, posebno pre, posebno posle stimulisanja, kao i uzorci istih grupa pre i posle stimulisanja. U programu *Statistica* su i crtani grafikoni koji prikazuju koncentracije lipidnih peroksida pre stimulisanja u zavisnosti od tretirane grupe i posle stimulisanja.

Rezultati i diskusija

U tabelama 1a i 1b prikazane su koncentracije lipidnih peroksida pre i posle stimulisanja lipidnih peroksida za sva četiri tretmana. I predstavlja inicijalnu, a S stimulisanu koncentraciju lipidnih peroksida. Brojevi 1 i 2 predstavljaju dva ponavljanja u okviru istog uzorka koja su rađena radi dobijanja rezultata što veće tačnosti. Sa “c” označena grupa sa vitaminom C, sa “f” za grupu sa flavonoidima, a

grupa u koju su dodavani i flavonoidi i vitamin C obeležena je sa “fc”.

Tabela 1a. Sadržaj lipidnih peroksida pre stimulisanja (K_{ipo}) u mmol/L

| | uzorak 1 | uzorak 2 | uzorak 3 | uzorak 4 |
|------|----------|----------|----------|----------|
| I1 | 0.8 | 5.1 | 6.1 | – |
| I2 | 1.0 | 4.7 | 5.9 | – |
| I1c | – | 4.3 | 3.1 | 4.3 |
| I2c | – | 5.1 | 2.8 | 4.4 |
| I1f | 2.5 | 6.7 | 4.4 | 14.5 |
| I2f | 1.9 | 6.3 | 4.4 | 6.8 |
| I1fc | 1.1 | 5.7 | 4.1 | 5.9 |
| I2fc | 1.0 | 5.2 | 3.9 | 6.6 |

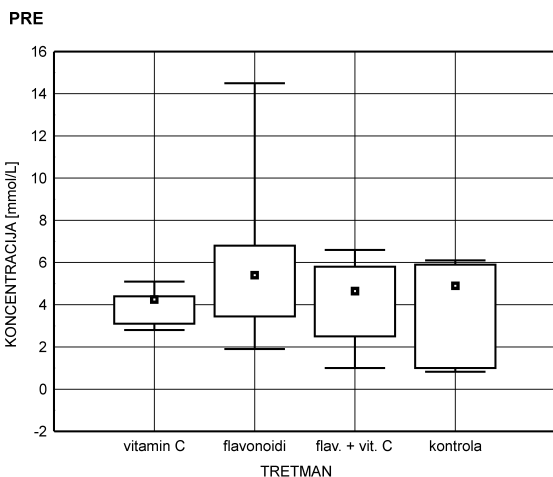
Tabela 1b. Sadržaj lipidnih peroksida posle stimulisanja (S_{ipo}) u mmol/L

| | uzorak 1 | uzorak 2 | uzorak 3 | uzorak 4 |
|------|----------|----------|----------|----------|
| S1 | 4.1 | 4.5 | 6.7 | 5.0 |
| S2 | 6.7 | 3.7 | 3.5 | 5.4 |
| S1c | – | 4.2 | 3.2 | 4.1 |
| S2c | – | 4.8 | 3.1 | 4.8 |
| S1f | 1.8 | 9.6 | 4.8 | 5.7 |
| S2f | 2.5 | 6.5 | 6.3 | 5.1 |
| S1fc | 0.8 | 5.0 | 7.3 | – |
| S2fc | 1.0 | 5.3 | 4.1 | 5.4 |

Stimulsane i inicijalne probe su rađene na različitim delovima istih uzoraka, pa su pri statističkoj obradi tretirane kao vrednosti koje ne zavise jedna od druge. Variranje koncentracije LPO-a povećava se iz uzorka u uzorak, s tim što je za sve grupe najmanja koncentracija LPO kod prvog uzorka, a u svakom sledećem uzorku dolazi do povećanja koncentracije, što se može primetiti kod kontrolne grupe pre stimulisanja. Jetra je bila sveža pri ispitivanju prvog uzorka, pa su tu koncentracije LPO bile niske. Vremenski interval između ispitivanja različitih uzorka bio je oko 20 min, a za to vreme jetra je bila izložena kiseoniku, što je dovelo do povećanja koncentracije lipidnih peroksida.

Dobijeni rezultati prikazani su grafički (slika 1).

Statističkom obradom dobijeno je da nema značajnih razlika (na nivou značajnosti 0.05) između grupa, ni pre ni posle stimulisanja (slike 1 i 2). Sta-



Slika 1.
Koncentracija lipidnih peroksida pre i posle stimulisanja u zavisnosti od tretirane grupe

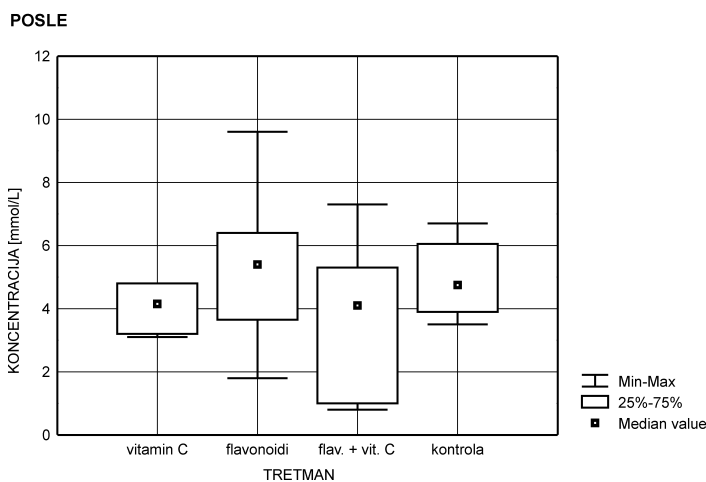


Figure 2.
Concentration of lipid peroxides before (above) and after (below) stimulation in function of treated group

tistički značajna razlika ne postoji ni između količine LPO pre i posle stimulisanja u istim grupama. Moguće objašnjenje je da Morova so i askorbinska kiselina nisu delovali kao prooksidanti i nisu indukovali LPO. Nije došlo do antioksidativnog efekta (inhibicije LPO-a) ispitivanih supstanci, što se može objasniti njihovom malom koncentracijom koja nije mogla da inhibuje LPO. Koncentracije su male jer su korišćenje one pri kojima se date supstance nalaze u pomorandži. Možda bi pri drugim koncentracijama došlo do inhibicije LPO-a. Primećuje se i da su najveća variranja koncentracije LPO-a kod grupe sa flavonoidima i grupe koja sadrži i flavonoide i vitamin C. Varijable se mogu objasniti nestandardizovanim model sistemom i njegovoj izloženosti vazduhu. Međutim, pojava na-

jvećih odstupanja kod grupa koje sadrže flavonoide može se objasniti neadekvatnošću model sistema za rad sa flavonoidima.

Zaključak

Ispitivanja su vršena u cilju određivanja i provere antioksidantne aktivnosti flavonoida i vitamina C pri pojedinačnom i zajedničkom delovanju. Inhibicija lipidnih peroksida nije konstatovana (na nivou stat. Značajnosti 0.05). Jedan od najverovatnijih razloga zbog čega je dobijen ovakav rezultat je nepogodnost korišćenja modela sistema svinjske jetre za određivanje antioksidantnih svojstava flavonoida i askorbinske kiseline. Nije konstatovana statistički značajna razlika ni između koncentracija

LPO-a pre i posle stimulisanja kod istih grupa. Urok je verovatno to što nije došlo do reakcije Morove soli sa askorbinskom kiselinom, pa one nisu reagovale kao prooksidanti. Samim tim nisu stimulisale lipidnu peroksidaciju pa nije došlo do promene koncentracije LPO. Povećanje koncentracija LPO je izazvano uticajem okoline na jetru (stajanje na vazduhu). Možda bi pri drugačijim koncentracijama flavonoida i askorbinske kiseline došlo do nekog njihovog antioksidantnog efekta, jer su koncentracije sa kojima je rađeno veoma male i odgovaraju koncentracijama datih supstanci u pomorandži. Rad bi trebalo ponoviti na boljem model sistemu i sa većim koncentracijama ispitivanih supstanci.

Zahvalnost. Zahvaljujem se mom mentoru Biljani Cvetković na uloženom trudu i strpljenju pri pomaganju da se preskoče prepreke na koje sam nailazila pri izvršavanju ovog rada. Takođe se zahvaljujem Luki Mihajloviću za pomoć pri odabiru teme i usavršavanju iste.

Literatura

- Chauhan G. 2003. Phenoxyl Radicals: Flavonoids. Department of Chemical and Biochemical Engineering, The University of Iowa, B-180 Med Labs, Iowa City, IA 52242-1527
- Chinmay M. K., Ghosh M. K., Chatterjee I. B. 1995. Ascorbic acid prevents lipid peroxidation and oxidative damage of proteins in guinea pig extrahepatic tissue microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **142**: 71
- Čučulanović S. 2002. Antioksidantna svojstva alokoholnih rastvora propolisa. *Petničke sveske*, **54**: 209.
- Fasman G. D. 1976. Physical Chemical Data. *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, edition 3. vol. 1. CRC Press, pp. 122-130.
- Mira F. L., Santos M., Rocha R., Florenco M. H. Jennings K. R. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity; PMID: 12592672 [PubMed – indexed for MEDLINE]
- Kováčiková Z., Ginter E., Madaric A. 1995. The effect of graded ascorbic acid intake on the activity of GSH-Px in the liver of female guinea pigs. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, **34**: 220.
- Maleš Ž., Plazibat M., Bilušić Vundać V., Žuntar I. 2005. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharmaceutica*, **56**: 245.
- Miller A. L. 1996. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. *Alternative Medicine Review*, **1**(2): 103.
- Natural Food-Fruit Copyright 1999, 2000, 2001. Vitamin C Content. The Natural Food Hub. www.naturalhub.com
- PDR Health 2006. *Vitamin C*. Thompson Healthcare Copyright
- Peterson J. J., Dwyer J. T., Beecher G. R., Bhagwat S. A., Gebhardt S. E., Haytowitz D. B., Holden J. M. 2006. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: S66.
- Pietta P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**(7): 1035.
- Mirić J. M., Baras J., Šiler S. 1985. *Analize živonih namirnica*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet
- USDA Database 2006. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2

Marija Janković

Analyze of Synergistic Antioxidant Effect of Ascorbic Acid and Extract of Orange on Pig's Liver Model System

It is well known that vitamin C and flavonoids are antioxidants. Citrus fruit (orange, lemon) contains large amounts of vitamin C. Hesperetin belongs to flavanones, a subgroup of flavonoids that can only be found in citrus fruit. There is some evidence that flavonoids work synergistically with ascorbic acid providing better protection from free radicals. This research was performed to test whether hesperetin and other flavanones that can be found in oranges are better antioxidants than vitamin C and whether vitamin C combined with flavonoids provides better antioxidant activity.

Concentration of vitamin C in oranges was found by Tillmans volumetric method and it was 0.94 mmol/L. Concentration of flavonoids in oranges was found by acid hydrolysis of orange juice extract and it was 1.32 mmol/L. Antioxidant activity was tested by lipid peroxide induction on a pig liver model system. There were four test groups: control group, one group with added vitamin C, one with added flavonoid extract, and one containing both vitamin C and flavonoids.

Statistics show that there is no significant statistical difference between the control group and the other groups ($p < 0.05$). This might be a consequence of an inappropriate model system, because

pig liver is not a standardized model system and it is very easily spoiled. Also there is no significant statistical difference between concentrations of lipid peroxides before and after stimulating in the same group. The explanation might be that Mohr's salt and ascorbic acid did not react properly as prooxidants, inducing lipid peroxidation. It can be seen from the results that vitamin C and flavonoids did not react as antioxidants at all, probably because their concentrations were very low, like the concentrations in orange. This research should be done on a better model system with other concentration of tested substances.