
Minja Jovanović

Ispitivanje inhibicije procesa lipidne peroksidacije ekstraktima kupine, ambrozije, medunike, vrbičice i štavolja

*Polifenoli sadržani u biljkama imaju sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije ćelijske membrane, kao i drugih membrana u organizmu. U ovom radu ispitivana je inhibitorna sposobnost ekstrakata pet biljaka za koje je bilo poznato da imaju visok sadržaj polifenola. Inhibicija je određena spektrofotometrijski primenom TBA-testa. Ekstrakti štavolja (*Rumex obtusifolius*), kupine (*Rubus fruticosus*) i medunike (*Filipendula ulmaria*) pokazali su se kao jaki inhibitori lipidne peroksidacije, za razliku od ekstrakata vrbičice (*Lythrum salicaria*) i ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*) koji su u manjoj meri inhibirali ispitivane procese. Procenat inhibicije direktno je srazmeran koncentraciji primenjenog ekstrakta i potiče isključivo od polifenolnih komponenata u uzorcima, od kojih su značajne fenolne kiseline – galna i elaginska, ali se ne može reći da li dolazi do sinergističkog dejstva sastojaka ukoliko se ne obavi detaljnija analiza drugih polifenola koji se nalaze u sastavu ispitivanih ekstrakata.*

Uvod

Polifenoli su veoma raznolika grupa biljnih sastojaka okarakterisana prisustvom više fenolnih grupa u jednom molekulu, koja se deli na više različitih podgrupa na osnovu strukture, zastupljenosti i važnosti u biljnim sistemima i metabolizmu. Ishrana bogata ovim sastojcima dovodi se u vezu sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, regulacijom krvnog pritiska, produkcijom

NO, imunim sistemom, aktivnošću transkripcionog faktora NF- κ B (Mackenzie *et al.* 2004), smanjenjem oštećenja DNK izazvanih oksidacijom. Polifenoli su takođe zaduženi i za inhibiciju fagocitoze mijelinskog omotača u multiploj sklerozi (Hendricks *et al.* 2003), kao i za inhibiciju produkcije IgE (Lim 2003).

Lipidi ćelijske membrane su važni posrednici u brojnim metaboličkim putevima, te promene njihovog sastava pogađaju mnoge ćelijske procese kao što su aktivnost određenih enzima, transport metabolita, signalna transdukcija, endo- i egzocitoza i ćelijska adhezija. Ove biološke funkcije membrana mogu biti ozbiljno ugrožene oksidacijom membrane izazvanom slobodnim radikalima.

Biljke mogu u različitim koncentracijama sadržati veoma raznolike polifenole – derivate različitih aromatičnih jezgara, te samim tim nisu sve biljke koje poseduju polifenole podjednako dobre u odbrani ćelijske membrane od oksidativnog stresa, tj. lipidne peroksidacije, jer se derivati međusobno vrlo razlikuju prema stepenu afiniteta prema slobodnim radikalima. Za biljke kupinu (*Rubus fruticosus*), ambroziju (*Ambrosia artemisiifolia*), meduniku (*Filipendula ulmaria*), vrbičicu (*Lythrum salicaria*) i štavolja (*Rumex obtusifolius*) se u prethodnim istraživanjima pokazalo da imaju visok sadržaj polifenola (Maksimović, lična komunikacija), ali nije utvrđeno koji polifenoli i u kom udelu su zastupljeni u njihovim ekstraktima.

Cilj ovog rada je utvrđivanje inhibitornog dejstva ekstrakata kupine, ambrozije, medunike, vrbičice i štavolja na procese lipidne peroksidacije ćelijske membrane.

Materijal i metode

Inhibicija lipidne peroksidacije ispitivana je za acetonsko-vodeni ekstrakt semena kupine (*Rubus fruticosus*), metanolni ekstrakt lista ambrozije (*Am-*

Minja Jovanović (1988), Smederevo, Radoslava Mirkovića 1A/26, učenica 4. razreda Gimnazije u Smederevu

MENTOR: dr Zoran Maksimović, Farmaceutski fakultet Beograd

brosia artemisiifolia), cveta medunike (*Filipendula ulmaria*) i ploda štavolja (*Rumex obtusifolius*), i vodeni ekstrakt lista vrbičice (*Lythrum salicaria*). Korišćene su galna kiselina i elaginska kiselina (Sigma Chemicals Co.), lipozomi od lecitina (nabavljeni od prof. Slavice Šiler-Marinković sa Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu), tiobarbiturna kiselina, EDTA (etilendiaminotetrasirćetna kiselina).

Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije na lipozomima TBA testom. Najpre su pripremljeni rastvori potrebni za TBA test:

1. 0.075 M rastvor FeSO₄
2. 0.1 M rastvor EDTA
3. 0.1 M rastvor L-askorbinske kiseline
4. 0.05 M fosfatni pufer pH = 7.4
5. TBA reagens
6. suspenzija lipozoma koncentracije 0.03 g lecitina po mL suspenzije
7. Rastvori sledećih ekstrakata u razblaženjima od 20, 10, 5, 2.5 i 1.25 mg/mL:
 - A. acetonsko-vodeni ekstrakt semena kupine
 - B. vodeni ekstrakt vrbičice
 - C. ekstrakt ambrozije u metanolu
 - D. ekstrakt cveta medunike u metanolu
 - E. ekstrakt ploda štavolja u metanolu

Intenzitet inhibitorne aktivnosti ekstrakata određen je spektrofotometrijski na osnovu koncentracije malonil-dialdehida. TBA-reagens reaguje sa malonil-dialdehidom, pri čemu nastaje obojeno jedinjenje, čija apsorbancija se meri. U staklenim kive-tama za centrifugiranje pripremljene su reakcione smeše (po pet ponavljanja za svaku od pet koncentracija sa slepom probom i kontrolnom grupom bez biljnog ekstrakta) koje su sadržale 20 µL FeSO₄ (0.075 M), 50 µL lipozoma, 10 µL ekstrakta, 20 µL L-askorbinske kiseline (0.1M) i 3.9 mL fosfatnog pufera (pH = 7.4, 0.05 M), 0.2 mL EDTA (0.1M), 1.5 mL TBA reagensa. Smeša je zagrevana 15 minuta na 100°C. Nakon toga, smeše su hladene na sobnu temperaturu. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja po minuti. Apsorbancije su merene na talasnoj dužini od 532 nm (Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer, GBC Spectral, Melbourne).

Rezultati i diskusija

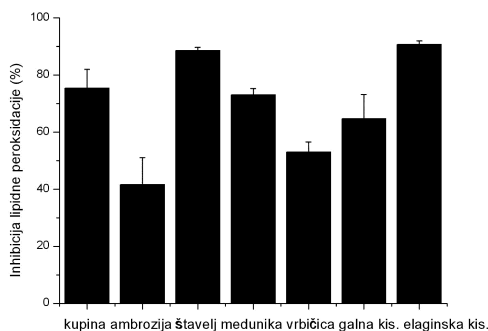
Do sada nije utvrđeno koji polifenoli i u kom delu ulaze u sastav kupine, ambrozije, medunike, vrbičice i štavolja. Zbog toga je merena sposobnost

inhibicije lipidne peroksidacije ekstrakata ovih biljaka u poređenju sa galnom i elaginskom kiselinom. Strukture ovih kiselina su poznate i pretpostavlja se da one, kao i njihovi derivati čine veći deo polifenola ovih biljaka (Spencer *et al.* 2007). Galna kiselina pri koncentraciji od 20 mg/mL korišćenog rastvora pokazuje 65±9% inhibicije lipidne peroksidacije pri koncentraciji od 20 mg/mL rastvora, dok elaginska pri istoj koncentraciji pokazuje 90.7±1.4% inhibicije što se može objasniti prisustvom većeg broja fenolnih grupa u elaginskoj kiselini nego u galnoj. Što se tiče testiranih biljaka, kupina je inhibirala procese lipidne peroksidacije 75±7%, ambrozija 42±10%, medunika 73±2%, vrbičica 53±3%, a štavolja 88.6±1.1%, pri koncentracijama od 20 mg/mL rastvora ekstrakta.

Štavolja, kupina i medunika pokazuju znatno veći stepen inhibicije lipidne peroksidacije od čiste galne kiseline, što svedoči o tome da ona i njeni derivati nisu jedini polifenolni sastojci ovih biljaka, i navodi na to da su i elaginska kiselina i drugi polifenoli zastupljeni u znatnoj meri, kao i mogućnost postojanja sinergističkog dejstva ovih komponenti (slika 1).

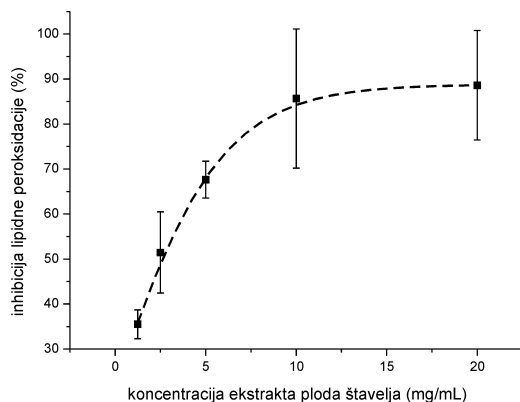
Metanolni ekstrakt ploda štavolja pokazao je najizraženija svojstva inhibicije lipidne peroksidacije. Već pri koncentracijama od 2.5 mg/mL dolazi do inhibicije lipidne peroksidacije od 51±8%, a taj procenat ide i do 88.6±1.1% pri koncentracijama od 20 mg/mL rastvora ekstrakta (slika 2).

Do sada nije utvrđen tačan sastav polifenolnih komponenti biljke štavolja, te se pre detaljnije analize



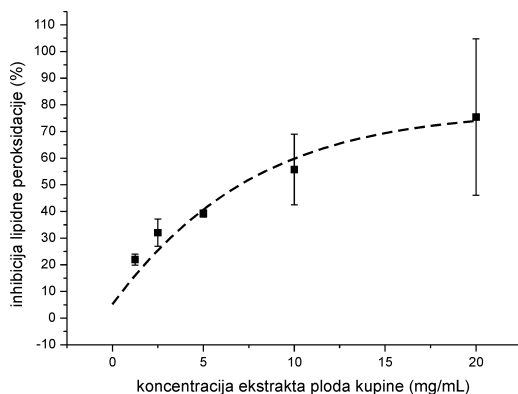
Slika 1. Inhibicija procesa lipidne peroksidacije ekstraktima 5 ispitivanih biljaka i elaginskom i galnom kiselinom

Figure 1. Lipid peroxidation inhibition caused by the extracts of blackberry, ambrosia, bitter dock, meadowsweet, purple loosestrife, gallic and ellagic acid



Slika 2. Kriva inhibicije lipidne peroksidacije različitim koncentracijama ekstrakta štavelja (*Rumex obtusifolius*)

Figure 2. Curve of lipid peroxidation inhibition caused by different concentrations of bitter dock (*Rumex obtusifolius*) extract



Slika 3. Kriva inhibicije lipidne peroksidacije različitim koncentracijama ekstrakta semena kupine (*Rubus fruticosus*)

Figure 3. Curve of lipid peroxidation inhibition caused by different concentrations of blackberry (*Rubus fruticosus*) extract

ekstrakta ne može sa sigurnošću reći od kojih komponenti konkretno potiče snažno inhibitorno dejstvo štavelja na procese lipidne peroksidacije. Na osnovu prethodnih istraživanja pretpostavlja se da su u pitanju katehini i procijanidini (Spencer *et al.* 2007).

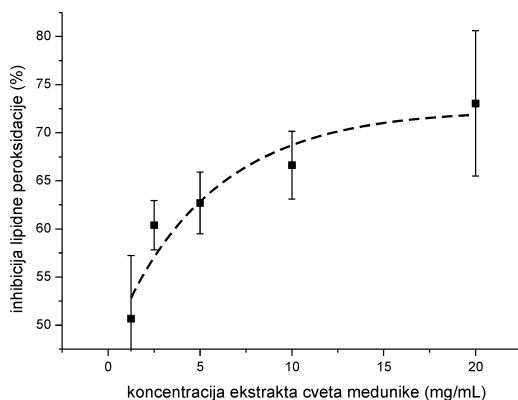
Acetonsko vodeni ekstrakt semena kupine u primenjenom intervalu koncentracija pokazuje znatno izraženiju zavisnost inhibicije lipidne peroksidacije od koncentracije za razliku od štavelja, koji je i pri najnižim koncentracijama izuzetno dobar inhibitor. Naime, pri koncentraciji od 1.25 mg/mL rastvora primenjenog ekstrakta semena kupine, 22±5% inhibira lipidnu peroksidaciju i procenat inhibicije seže do 75±7% pri koncentraciji od 20 mg/mL (slika 3).

Do sada je bilo poznato da seme kupine sadrži veliki udeo galne kiseline, kao i glikozida kvercetina i kampferola (Tomczyk i Gudej 2005), ali s obzirom na to da je ovaj ekstrakt pokazao mnogo veću sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije od same galne kiseline (slika 1), može se zaključiti da postoje i drugi polifenolni sastojci u ovom semenu koji imaju sposobnost da inhibiraju lipidnu peroksidaciju i da je moguće da dolazi do njihovog sinergističkog dejstva.

Metanolni ekstrakt cveta medunike (slika 4) ima najmanje izraženu zavisnost sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije od koncentracije primenjenih rastvora ekstrakata, jer se njegova sposobnost inhibicije nalazi u određenom intervalu sa malim varira-

njem usled promene koncentracije. Pri koncentraciji od 1.25 mg/mL rastvora, procenat inhibicije iznosi 51±5% i dostiže vrednost od 73±2% pri najvećim koncentracijama (slika 4).

Za biljku meduniku od ranije je poznato da sadrži različite tanine, kvercetin, rutin i različite fenolne glikozide, kao i fenolne kiseline (Krasnov i

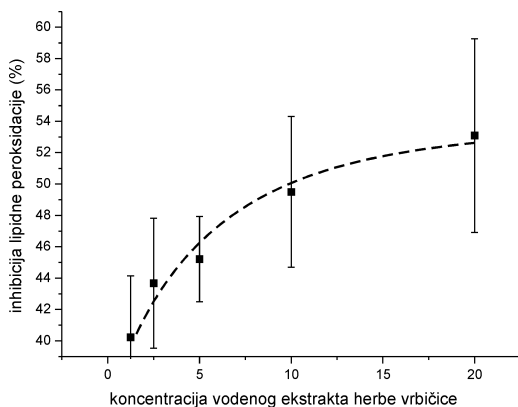


Slika 4. Kriva inhibicije lipidne peroksidacije različitim koncentracijama ekstrakta cveta medunike (*Filipendula ulmaria*)

Figure 4. Curve of lipid peroxidation inhibition caused by different concentrations of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) extract

Raldugin 2006). S obzirom na raznovrsnost polifenolnog sadržaja ove biljke, moguće je da je došlo do njihovog sinergizma te se zato sposobnost inhibicije njenog ekstrakta održava u nepromjenjenim uskim granicama.

Vodeni ekstrakt vrbičice pokazao je znatno manji stepen inhibicije lipidne peroksidacije u odnosu na prethodne ekstrakte. U izvršenim merenjima njegova sposobnost inhibicije se nalazi u intervalu od 40 do 53 procenata (slika 5).



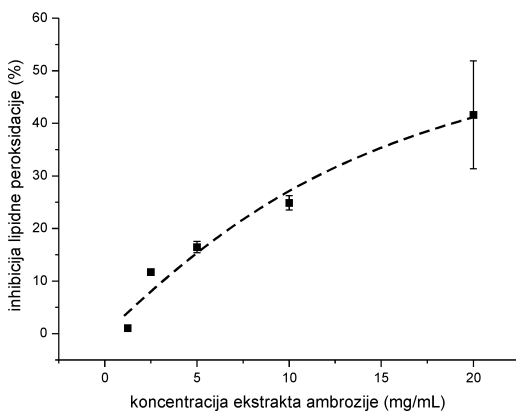
Slika 5. Kriva inhibicije lipidne peroksidacije različitim koncentracijama ekstrakata biljke vrbičice (*Lythrum salicaria*)

Figure 5. Curve of lipid peroxidation inhibition caused by different concentrations of Purple Loosestrife (*Lythrum salicaria*) extract

Vrbičica sadrži u nešto nižim koncentracijama viteksin, orientin i njihove izomere izoviteksin i izo-orientin, nekoliko fenolnih kiselina, tanine i elagitanine (Ruaha *et al.* 2000). U opsegu koncentracija korišćenom u ovom radu, ovi sastojci se nisu našli u dovoljnoj količini kako bi parirali drugim polifenolima iz drugih biljaka na ovom testu.

Inhibicija lipidne peroksidacije primećena je i prilikom testiranja metanolnog ekstrakta biljke ambrozije. Ona je izražena u znatno manjoj meri nego kod prethodno testiranih uzoraka, ali je zavisnost procenata inhibicije od koncentracije primenjenog ekstrakta gotovo linearna na ispitivanom opsegu koncentracija. Pretpostavlja se da pri većim koncentracijama ta zavisnost postaje manje izražena, kao što je to slučaj i na ovom opsegu koncentracija kod drugih ispitivanih uzoraka većih inhibitornih sposob-

nosti, kao što su elaginska kiselina ili štavelj. Procenat inhibicije ekstrakta ambrozije ide do 42% pri koncentraciji od 20 mg/mL rastvora (slika 6).



Slika 6. Kriva inhibicije lipidne peroksidacije različitim koncentracijama ekstrakata biljke ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*)

Figure 6. Curve of lipid peroxidation inhibition caused by different concentrations of Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*) extract

Na osnovu ranijih istraživanja zna se da u sastav ambrozije ulaze različiti kumarini (skopoletin, skopolin, eskuletin, eskulin) kao i različiti flavonoidi (kvercetin, kvercimeritrin, izokvercitrin) i njihovi glikozidi (Parkhomenko *et al.* 2005). Među njima nema katehina iz čaja ili procijanidina, antocijana i fenolnih kiselina, koji su do sada ustanovljeni kao najuspešniji inhibitori lipidne peroksidacije, a koji su zastupljeni u biljnim ekstraktima koji su se pokazali kao najuspešniji inhibitori.

Ekstrakti biljaka ispitivani u ovom radu pokazali su različit stepen sposobnosti inhibicije procesa lipidne peroksidacije. Uzrok tome verovatno leži u različitosti polifenola koji ih čine, jer se među njima nalaze molekuli različitih struktura, koji nemaju isti broj fenolnih grupa i isti afinitet prema slobodnim radikalima, inicijatorima lipidne peroksidacije. Neophodno je izvršiti detaljniju kvalitativnu analizu uzoraka kako bi bilo moguće nastaviti dalju diskusiju.

Zaključak

Ekstrakti kupine, ambrozije, medunike, vrbičice i štavelj pokazali su sposobnost inhibicije procesa lipidne peroksidacije. Kao najbolji inhibitor među njima pokazao se štavelj, koji je pri koncentracijama od 1.25 mg/mL rastvora inhibirao lipidnu peroksidaciju 36%, a taj procenat ide i do 89% pri koncentracijama od 20 mg/mL rastvora. Kupina i medunika su se takođe pokazale kao vrlo dobri inhibitori, za razliku od vrbičice i ambrozije. Štavelj, kupina i medunika pokazali su znatno veću inhibitornu sposobnost od same galne kiseline, fenolne kiseline koja ulazi u njihov sastav, ali i nešto slabiju sposobnost u odnosu na elaginsku kiselinu. Ovo navodi na to da ove kiseline nema u ovim ekstraktima ili da je zastupljena u znatno manjoj meri, a da se u njima pored galne kiseline nalaze i drugi polifenolni sastojci zaslužni za inhibiciju lipidne peroksidacije. Korišćenjem ranijih kvalitativnih analiza ekstrakata ovih biljaka, zaključuje se da, iako sve ove biljke imaju visok sadržaj polifenola, postoji razlika u njihovim inhibitornim sposobnostima, jer su sačinjene od različitih polifenola, koji nisu podjednako dobri inhibitori. Tako u štavelju preovlađuju katehini, izuzetno jaki antioksidansi koji se nalaze i u zelenom čaju, a u kupini i medunici fenolne kiseline, takođe dobro proučeni jaki antioksidansi, dok vrbičicu i ambroziju čine drugačiji polifenoli. Neophodno je detaljnije ispitati koje polifenolne komponente su u pitanju, otkriti kakav je njihov afinitet prema slobodnim radikalima i kakav im je mehanizam inhibicije lipidne peroksidacije.

Zahvalnost. Autor ovog rada duguje veliku zahvalnost docentu Zoranu Maksimoviću sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, od kojeg su dobijeni biljni ekstrakti korišćeni u ovom radu, prof. Slavici Šiler-Marinković sa Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, od koje su dobijeni lipozomi i Goranu Tomiću od kojeg su dobijene neophodne količine galne i elaginske kiseline.

Literatura

- Hendricks J. J. A., de Vries H., van der Pol S. M. A., van der Berg T. K., van Tol E. A. F., Dijkstra C. D. 2003. Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology* **65**: 877.
- Krasnov E. A., Raldugin V. A. 2006. Phenolic compounds from *Filipendula ulmaria*. *Chemistry of Natural Compounds*, **42** (2): 122
- Lim B. O. 2003. Effects of wogonin, wogonoside, and 3, 5, 7, 2', 6' – pentahydroxyflavone on chemical mediator productions in peritoneal exudates cells and immunoglobulin E of rat mesenteric lymph node lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology* **84**: 23.
- Mackenzie C. G., Carrasquedo F. A., Delfino J. M., Keen C. L., Fraga C. G., Oteiza P. I. 2004. Catechin, epicatechin and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF- κ B activation at multiple steps in Jurkat cells. *FASEB J*, **18**: 167.
- Parkhomenko A. Z., Oganieszan E. T., Andreeva O. A., Dorkina E. G., Paikova E. O., Agadzhanyan Z. S. 2006. Pharmacologically active substances from *Ambrosia artemisiifolia*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **40** (11): 627.
- Ruaha J. P., Wofender J. L., Salminen J. P., Pihlaja K., Hostettmann K., Vuorela H. 2001. Characterization of the Polyphenolic Composition of Purple Loosestrife (*Lythrum salicaria*). *Z Naturforsch*, **56c** : 13.
- Spencer P., Sivakumaran S., Fraser K., Yeap Foo L., Lane G. A., Edwards P. J. B., Meagher L. P. 2007. Isolation and Characterisation of Procyanidins from *Rumex obtusifolius*. *Analysis*, **18** (3): 193.
- Tomczyk M., Gudej J. 2005. Polyphenolic compounds from *Rubus saxatilis*. *Chemistry of Natural compounds*, **41** (3) : 282.

Lipid Peroxidation Inhibitory Activity of Blackberry, Ambrosia, Meadowsweet, Purple Loosestrife and Bitter Dock Extracts

Polyphenols are plant compounds which have more than one phenol functional group per molecule. They are known as very good lipid peroxidation inhibitors. Lipid peroxidation causes damage to many vital parts of the cell, especially to its membrane, which leads to cell death or mutation. The lipid peroxidation inhibitory activities of blackberry (*Rubus fruticosus*), ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*), meadowsweet (*Filipendula ulmaria*), purple loosestrife (*Lythrum salicaria*) and bitter dock (*Rumex obtusifolius*) extracts have not been determined, but it is known that they are rich in polyphenol compounds. The aim of this research was to determine the lipid peroxidation inhibitory activity of these five plants' extracts.

The lipid peroxidation inhibition was measured spectrophotometrically using TBA – test, by measuring the production rate of malonyldialdehyde (MDA), the product of lipid peroxidation of liposomes. 2-Thiobarbituric acid was used as the malonyldialdehyde substrate.

Results showed that all extracts have an inhibitory ability for lipid peroxidation. However, there are many differences among the extracts from the point of intensity of inhibition. The bitter dock extract inhibited lipid peroxidation by 36% at a concentration of 1.25 mg/mL and by 89% at a

concentration of 20 mg/mL of used extract solution. The blackberry extract inhibited lipid peroxidation by 76%, while the meadowsweet extract showed a 73% inhibition, when tested at 20 mg/mL. Purple loosestrife and ambrosia proved to be less powerful for lipid peroxidation inhibition. The purple loosestrife extract inhibited lipid peroxidation by 53% and ambrosia showed 42% inhibition at a concentration of 20 mg/mL (Figure 1). The curves of inhibition show that lipid peroxidation inhibition of these extracts is concentration dependent (Figures 2–6).

The plant extracts inhibit lipid peroxidation significantly in comparison to gallic acid. The extracts were also compared to ellagic acid and they showed a lower level of inhibition. This may lead to a conclusion that gallic and ellagic acids are not the only polyphenolic compounds of these extracts responsible for lipid peroxidation inhibition. There are other inhibitors in these extracts, such as procyanidins, procyanidin polymers, catechin, epicatechin and epicatechin gallate (bitter dock), phenolic acids and flavonoids such as quercetin and rutin (meadowsweet and blackberry), vitexin, orientin, isovitexin, isoorientin, tanins (purple loosestrife), coumarins and flavonoids (ambrosia), which need to be tested for lipid peroxidation inhibitory activity.

Bitter dock, meadowsweet, ambrosia, purple loosestrife and blackberry extracts inhibit lipid peroxidation in a concentration-dependent manner. Inhibition is partly mediated by gallic and ellagic acid. Other polyphenolic compounds are present in these extracts and the presence of synergy is likely. Further research ought to be done in order to determine the active compounds in these extracts and to clarify the inhibition mechanism.

