

Antioksidantna svojstva sorti malina Tjulamin, Miker i Vilamet

Ispitivanja su antioksidantna svojstva, sadržaj ukupnih flavonoida, fenola i antocijanina u plodovima tri, kod nas najzastupljenije, sorte malina: Tjulamin, Miker i Vilamet. Antioksidantna aktivnost sorti malina rađena je DPPH metodom i TBA testom inhibicije lipidne peroksidacije. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji fenola između sorte Tjulamin i sorti Miker i Vilamet. Što se tiče vrednosti koncentracija flavonoida, statistički značajna razlika je prisutna između sorte Miker i sorti Tjulamin i Vilamet. Najvišu koncentraciju antocijanina je imala sorta Vilamet, a najnižu Miker. Ovaj podatak ne treba dovoditi u direktnu vezu sa antioksidantnim aktivnostima koje su u suprotnom odnosu, pošto je moguće da antocijanini svoj antioksidantni potencijal ispoljavaju u sinergističkom dejstvu sa drugim komponentama ekstrakta, za šta su potrebna detaljnija istraživanja.

Uvod

Ljudski organizam se štiti od slobodnih radikala mehanizmom odbrane, koji čine antioksidansi. Antioksidansi su supstance koje, u niskim koncentracijama, suzbijaju stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika, neutrališu slobodne radikale vezujući ih za sebe i predajući ih drugima prekidaju lančane reakcije koje slobodni radikali iniciraju. Jedna vrsta antioksidanasa su polifenoli koji u organizmu čoveka mogu da redukuju slobodne radikale, kao i flavonoidi, podgrupa polifenola. U medicinskoj nauci je utvrđeno da se proizvodi od ploda maline mogu uspešno upotrebljavati za regulaciju pH krvi, poboljšanje krvne slike, sniženje krvnog pritiska, za lečenje bolesti grla i raznih grozničavih stanja (malarija i dr.),

zatim za poboljšanje varenja hrane, kako laksativno sredstvo, tako i za povećanje otpornosti organizma i dr. (Petrović 2002).

Upravo zbog svog specifičnog hemijskog sastava, a posebno zbog visokog sadržaja vitamina, mineralnih materija, pojedinih mikroelemenata i dr., plodovi maline imaju vrlo značajno lekovito dejstvo.

Srbija je, pored Poljske i Mađarske, najveći proizvođač maline u Evropi sa proizvodnjom od 56 hiljada tona godišnje (Petrović i Milošević 2002). Najzastupljenije sorte malina kod nas, a i u svetu, su Vilamet (Willamette) i Miker (Meeker), koje predstavljaju sorte malina za proizvodne zasade, i Tjulamin (Tulameen) koji predstavlja perspektivnu sortu maline).

U ovom radu su, kroz izolovanje i merenje ukupnog sadržaja flavonoida i fenola iz maline, kao i određivanje njihovog antioksidativnog dejstva, upoređene ove tri sorte. Pored antioksidanata ispitivani su i antocijanini.

Materijal i metode

Ispitivanje je realizovano kroz dve glavne etape: ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz plodova i merenje antioksidantne aktivnosti.

Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz voća obuhvata:

- Fenol/flavonoidni ekstrakt
- Ekstrakt antocijanina
- Kvantifikacija fenola
- Kvantifikacija flavonoida
- Kvantifikacija antocijanina

Za merenje antioksidantne aktivnosti korišćena je DPPH metoda, a određivanje inteziteta lipidne peroksidacije na lipozomima urađeno je TBA testom.

Anka Jevremović (1993), Trg Bratstva i jedinstva 1, učenica 1. razreda gimnazije SŠ „Sveti Ahilije“ Arilje

MENTOR: Vladan Martinović, student Hemijskog fakulteta u Beogradu

Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz malina

Fenol/flavonoidni ekstrakt. Odmereno je 100 g smrznutog voća, i homogenizovano u blenderu. Flavonoidi i fenoli su ekstrahovani sa 300 mL etil-acetata, preko noći na magnetnoj mešalici. Uzorci su procedeni, i stavljeni u vakuum-uparivač, gde su upareni do suvog ostatka, i zatim rastvoreni u 4 mL metanola. Reekstrakcija je vršena na isti način kao i ekstrakcija. Zatim su uzorci centrifugirani, nakon čega su spojeni uzorci ekstrakcije i reekstrakcije (supernatant). Poklopljeni su folijom i čuvani na tamnom mestu.

Ekstrakt antocijanina. Odmereno je 20 g voća, pomešano sa 140 mL rastvarača, 95% etanola/1.5 N HCl, 85:15, u metanolnom ekstraktu. Nakon dva sata mešanja, procedeno je.

Kvantifikacija fenola

Kvantifikacija fenola je vršena spektrofotometrijski. Kao standard je korišćena galna kiselina u opsegu koncentracija od 0.5 do 0.0008 mg/mL. 20 μ L ekstrakta je pomešano sa 100 μ L 10 puta razblaženog Folinovog reagensa (FCR), nakon čega je smeša inkubirana u mraku 5 minuta. Zatim je dodato 80 μ L 7.5 % natrijum karbonata. Cela reakciona smeša je zatim inkubirana u mraku na sobnoj temperaturi 2 sata. Za svaki uzorak vršeno je po pet ponavljanja. Za slepu probu je korišćena destilovana voda. Apsorbance su merene na 760 nm na (GBC UV-VIS Cintra 10) (Määttä-Riihnen *et al.* 2004).

Kvantifikacija flavonoida

Kvantifikacija flavonoida je vršena spektrofotometrijski. Kao standard je korišćen kvercetin u opsegu koncentracija od 2 do 0.0008 mg/mL. 250 μ L ekstrakta je razblaženo sa 1250 μ L destilovane vode. Zatim je dodato 75 μ L 5% rastvora NaNO₂, nakon čega je smeša inkubirana 6 minuta na sobnoj temperaturi. Redom je dalje dodavano 150 μ L 10% rastvora AlCl₃ × 6H₂O, 500 μ L 1M NaOH i 275 μ L destilovane vode. Apsorbance su merene na 510 nm (GBC UV-VIS Cintra 10) (Määttä-Riihnen *et al.* 2004).

Kvantifikacija antocijanina

pH vrednost metanolnog ekstrakta je podešena na 1.0. Potom su uzorci procedeni i dodato je još

100 mL rastvarača. Apsorbance su merene na talasnim dužinama od 533 i 700 nm, pri čemu je količina antocijanina preračunata na osnovu formule $(A_{533} - A_{700}) \times 200 \times 5 / 98.2$, izražena u miligramima na 100 grama malina.

Antioksidantna aktivnost

Određivanje antioksidantne aktivnosti je vršeno pomoću dva testa: DPPH testom i testom lipidne peroksidacije. DPPH test omogućava praćenje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala koji su odgovorni za izazivanje oštećenja, „scavenger” aktivnost (radical scavenger activity – RSC), dok merenjem stepena lipidne peroksidacije dolazimo do podataka o protektivnom dejstvu ispitivanih uzoraka.

DPPH metoda

Najpre je pripremljen 90 μ M rastvor DPPH u metanolu. Radne probe su sadržale: 100 μ L ekstrakta antocijanina, 1 mL 90 μ M rastvora DPPH i 2900 μ L metanola, a kontrole 1 mL 90 μ M rastvora DPPH i 3 mL metanola, nakon čega su inkubirane u mraku 1 h. DPPH test je rađen sa pet koncentracija, sa po pet ponavljanja. Apsorbance je merena na talasnoj dužini od 515 nm (GBC UV-VIS Cintra 10).

Određivanje inteziteta lipidne peroksidacije na lipozomima TBA testom

U staklene kivete za centrifugiranje pripremljene su reakcione smeše, koje su sadržale: 20 μ L FeSO₄ (0.075 M), 50 μ L lipozoma (0.03 g lecitina po mL suspenzije), 10 μ L ekstrakta, 20 μ L L-askorbinske kiseline (0.1 M), 3.9 mL fosfatnog pufera (pH = 7.4, 0.05 M), 0.2 mL EDTA (0.1 M) i 1.5 mL TBA reagensa (0.3 g tiobarbiturne kiseline rastvoreno je u 80 mL vode sa još 12 g trihlorsirćetne i 1.04 mL perhlorne kiseline). Nakon ovoga, sve je zagrevano 15 minuta, na 100°C. Smeše su hladene na sobnoj temperaturi. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja po minuti. Rađeno je sa pet koncentracija antocijanina po sorti sa po pet ponavljanja svake. Apsorbance su merene na talasnoj dužini od 532 nm (GBC UV-VIS Cintra 10) (Jovanović 2007).

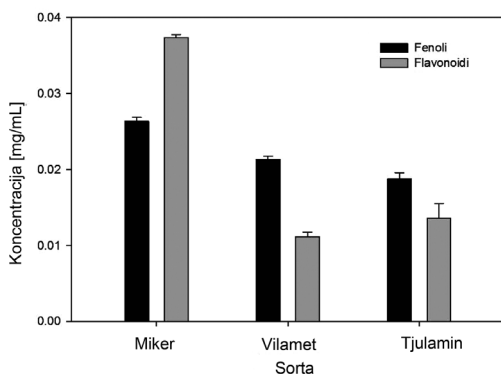
Statistička obrada

Sva statistička preračunavanja su rađena u programu Microsoft Exel 2007 (test ANOVA), dok su grafici pravljani u programu SigmaPlot. Statistički značajna razlika je određivana na nivou 0.05.

Rezultati i diskusija

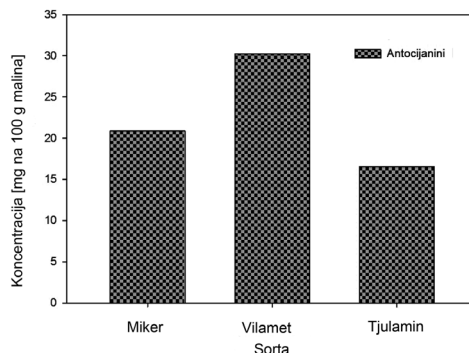
Koncentracije fenola, flavonoida i antocijanina su određene na osnovu prethodno urađenih standardnih pravi. Koncentracije fenola u uzorcima sorti Miker, Vilamet i Tjulamin iznosile su 0.0264(5), 0.0231(5), 0.0187(9) mg/mL, respektivno, a koncentracije flavonoida 0.0374(4), 0.0112(6), 0.0136(2) mg/mL (slika 1). Koncentracije antocijanina u uzorcima u miligramima cijanidin-3-glikozida na 100 g voća, iznosile su 20.86(4), 30.30(2), 16.51(5), redom (slika 2). Kada su u pitanju koncentracije fenola, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između sorte Tjulamin i ostale dve. Što se tiče vrednosti koncentracija flavonoida statistički značajna razlika prisutna je između sorte Miker i preostale dve. Kod vrednosti količine antocijanina postoji statistički značajna razlika između sve tri grupe, pa je zbog toga antioksidantna aktivnost rađena sa metanolnim ekstraktom, gde su pored ostalih komponenti prisutni i antocijanini.

Utvrđeno je da ekstrakti sve tri sorte malina ispoljavaju RSC dejstvo, kao i protektivno dejstvo



Slika 1. Koncentracije fenola i flavonoida u ekstraktima

Figure 1. Concentrations of phenols and flavonoids in the extracts

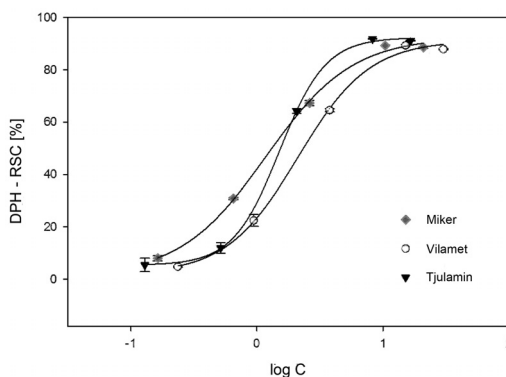


Slika 2 Koncentracije antocijanina u ekstraktima

Figure 2 Concentrations of anthocyanins in extracts

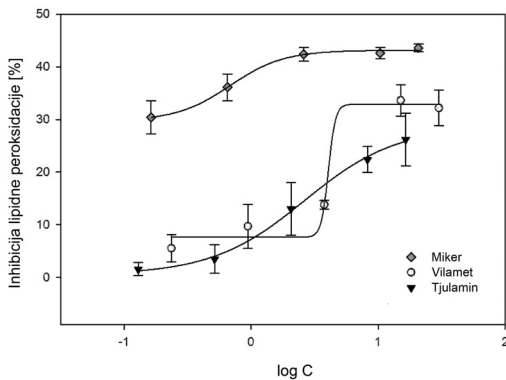
na lipidnu peroksidaciju preko sigmoidalne zavisnosti, odnosno, da u malom koncentracionom opsegu postoji značajna promena aktivnosti (slike 3 i 4). Ovakva zavisnost je česta pojava u biološkim sistemima, i za nju je definisana funkcija u raznim softverima za analizu. Stoga su grafici fitovani pomoću funkcije programa SigmaPlot (Ligand binding, sigmoidal dose response, variable slope).

Za svaku sortu je, fitovanjem grafika, određena IC_{50} vrednost, odnosno ona koncentracija koja dovodi do polovine RSC aktivnosti ili protektivnog dejstva na lipidnu membranu. (tabela 1). Uočava se da za DPPH test najnižu IC_{50} vrednost ima ekstrakt



Slika 3. Zavisnost DPPH scavenger aktivnosti od koncentracije ekstrakta sorti malina

Figure 3. Dependence of DPPH scavenger activity on raspberry extract concentration



Slika 4. Zavisnost inhibicije lipidne peroksidacije od koncentracije ekstrakta sorti malina

Figure 4. Dependence of inhibition of lipid peroxidation on raspberry extract concentration

sorte Miker, odnosno da je potrebna najniža koncentracija da bi se ostvarila polovina njegove maksimalne RSC aktivnosti. Samim tim ova sorta je pokazala najsnažniju RSC aktivnost, dok je najslabiju RSC aktivnost pokazala sorta Vilamet. Što se tiče lipidne peroksidacije, najnižu IC₅₀ vrednost ima sorta Miker, a najvišu Vilamet, kao što je bio slučaj i sa prethodnim testom antioksidantne aktivnosti. Ako se dobijeni rezultati uporede sa koncentracijom antocijanina u svakom od uzoraka uočava se da je najvišu koncentraciju antocijanina imala sorta Vilamet, a najnižu Miker.

Tabela 1. IC₅₀ vrednosti tri sorte malina

	Miker	Vilamet	Tjulamin
DPPH	1.18±0.07	2.12±0.06	1.51±0.03
Lipidna peroksidacija	1.46±0.06	4±2	2.6±0.1

Zaključak

Sve tri sorte, Tjulamin, Miker i Vilamet, pokazuju jako antioksidantno dejstvo, a kod sorte Miker to dejstvo je najsnažnije. Najslabije antioksidantno dejstvo, odnosno najniže IC₅₀ vrednosti, dobijene su za sortu Vilamet. Statistički značajna razlika utvrđena u koncentraciji antocijanina među sortama malina. Ovaj podatak ne treba odmah dovoditi u direktnu

vezu sa antioksidantnim aktivnostima navedenih sorti, koje su u suprotnom odnosu, pošto je moguće da antocijanini svoj antioksidantni potencijal ispoljavaju u sinergističkom dejstvu sa drugim komponentama ekstrakta, za šta su potrebna detaljnija istraživanja.

Najvišu koncentraciju antocijanina je imala sorta Vilamet, dok je najnižu koncentraciju imala sorta Miker.

Zahvalnost. Zahvaljujem se svom ujaku dr Mihajilu Tošiću na podršci, kao i svom mentoru Vladanu Martinoviću na podršci, strpljenju i pomoći tokom realizacije ovog rada.

Literatura

Jovanović M. 2007. Ispitivanje inhibicije procesa lipidne peroksidacije ekstraktima kupine, ambrozije, medunike, vrbičice i štavolja. *Petničke sveske*, 63: 276.

Määttä-Riihnen K. R., Kamal-Eldin A., Törrönen A. R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6178.

Määttä P. H., Gonzales-Paramas A. M., Törrönen A. R. 2004b. Distribution and content of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4477.

Mullen W., McGinn J., Lean Michael E. J., MacLean Margaret R., Gardner P., Duthie Garry G., Yokota T., Crozier A. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5191.

Petrović S., Milošević T. 2002. *Malina – tehnologija i organizacija proizvodnje*. Čačak: Agronomski fakultet

Seeram Navindra P., Adams L. S., Zhang Y., Lee R., Sand D., Scheuller H. S., Heber D. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9329.

Yildirim A., Mavi A., Kara A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4083.

Testing Different Antioxidants from Three Raspberry Cultivars

Antioxidants are substances that, in low concentrations, suppress the creation of reactive oxygen species, neutralize free radicals by tying them down and transferring them, and interrupt chain reactions that free radicals trigger.

The aim of the project is the isolation and comparison of three varieties of raspberries and the measurement of antioxidant effects of total flavonoids, phenols and anthocyanins from raspberries.

The project was done in two main stages. First, polyphenol compounds were extracted from raspberries, with extract flavonoids, phenols and anthocyanins. Quantifying of phenols was carried out spectrophotometrically with FC reagent and gallic acid used as a standard. Quantifying of flavonoids was also carried out spectrophotometrically. Quercetin in concentrations ranging 2-0.0008 mg/mL was used as a standard. Absorbance was measured at 510 nm at (GBS UV-VIS Cintra 10) (Määttä-Riihnen *et al.* 2004).

Anthocyanin concentration was determined using methanol extract. The absorbance was measured at wavelengths of 533 and 700 nm, while the amount of anthocyanins was calculated based on the following form: $(A_{533} - A_{700}) \times 200 \times 5/98.2$, and expressed as mg per 100g of raspberries.

The second stage was antioxidative activity of the raspberry species, using the DPPH method and lipid peroxidation of inhibition in a liposome sys-

tem. All statistical calculations were done in Microsoft Excel 2007, while the graphics were made in SigmaPlot.

It was determined that there is a statistically significant difference between the value of the concentration of phenol between cultivar Tulameen and cultivars Willamette and Meeker. Regarding the value of the concentration of flavonoids, a statistically significant difference exists between cultivar Meeker and cultivars Willamette and Tulameen, and with the values of quantities of anthocyanins there is a statistically significant difference between all three groups.

The DPPH test provides data on the free radicals scavenging activity, while by measuring the intensity of lipid peroxidation it is possible to obtain data on the protective effect of the examined samples. Antioxidant activity determined that extracts of all three raspberries cultivars exhibit a significant free radical scavenger effect, and within a narrow concentration range a significant change occurs. The cultivar Meeker showed the strongest antioxidant effect, and the weakest variety was Willamette. Regarding lipid peroxidation, the lowest IC₅₀ was found in the cultivar Meeker, while the highest value was in the variety Willamette. The highest concentration of anthocyanins was found in the cultivar Willamette, and the lowest in the cultivar Meeker. This information should not be directly connected with antioxidant activity of the cultivars, because it is possible that the antioxidant potential of anthocyanins is exhibited synergistically with other components of the extract, which should be researched in more detail. 