

Određivanje osobina i antioksidativne aktivnosti nepolarnih frakcija etanolnog ekstrakta lista leske

Cilj ovog istraživanja bio je da se odredi sadržaj fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti n-heksanske i etil-acetate frakcije etanolnog ekstrakta lista leske radi ispitivanja uticaja nepolarnih jedinjenja na antioksidativne karakteristike. Ukupni sadržaj fenola, flavonoida i tanina, i antioksidativna aktivnost određeni su primenom spektrofotometrijskih metoda. Antioksidativna aktivnost određena je ispitivanjem redukcionne moći, ukupnog antioksidativnog kapaciteta fosfo-molibdatskom metodom i sposobnosti vezivanja DPPH radikala. Rezultati su pokazali da se etil-acetat može uspešno koristiti za izolovanje kako flavonoida i tanina, tako i fenola neflavonoidne i netaninske prirode, što nije slučaj sa n-heksanom. U skladu sa ovim rezultatima, etil-acetate frakcija ispoljava visoki antioksidativni kapacitet i poseduje veliku sposobnost redukovanja DPPH radikala. Takođe, pokazano je da obe frakcije ispoljavaju veliku redukcionnu moć, pri čemu je ona nešto veća kod n-heksanske frakcije. Na osnovu ovih podataka, može se zaključiti da antioksidativne osobine u velikoj meri zavise i od nepolarnih jedinjenja, pa da se zbog toga brojni antioksidansi u ispitivanom biljnom materijalu najverovatnije nalaze u obliku glikozida i proteinskih derivata.

Uvod

Pri metaboličkim procesima koji se neprestano odvijaju u organizmu dolazi do stvaranja slobodnih radikala, čestica koje imaju nesparene elektrone, zbog čega su izuzetno hemijski nestabilni pa vrlo lako stupaju u reakcije kako bi vezali nedostajući

elektron. Međutim, molekul koji je u ulozi elektron-donora i sam postaje slobodni radikal. Najčešće su molekuli kojima slobodni radikali oduzimaju elektron važni molekuli za funkcionisanje ćelije, te na ovaj način postojanje slobodnih radikala dovodi do gubitka funkcije ovih molekula i ubrjava proces starenja ćelija.

Zbog toga se danas sve više traga za supstancama koje će predati svoj elektron slobodnim radikalima, a da im se stabilnost ne naruši. Takva jedinjenja nazivaju se antioksidansi. Značajnu grupu prirodnih antioksidanasa čine fenolna jedinjenja, u koja spadaju i flavonoidi i tanini (Tumbas 2010).

Fenolna jedinjenja su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti u biljkama. U svojoj strukturi fenolna jedinjenja ili polifenoli sadrže aromatični prsten sa jednom ili više fenolnih grupa. Upravo je postojanje fenolne grupe ono što olakšava fenolima da posle doniranja elektrona ne postanu nestabilni slobodni radikali. Naime, atom kiseonika iz fenolne grupe zbog velike elektronegativnosti privlači delokalizovane p-elektrone iz benzenovog prstena, pri čemu se stvara centar negativnog naelektrisanja, što olakšava ovim jedinjenjima da otpuste jedan elektron, a da se njihova stabilnost pri tome ne naruši.

Flavonoidi, kao grupa fenolnih jedinjenja, prisutni su u svim organima biljaka, najčešće u obliku pigmentata. Zbog svoje široke rasprostranjenosti, flavonoidi su najbolje ispitani sekundarni metaboliti biljaka. Ispoljavaju brojna pozitivna dejstva na ljudski organizam, kao što su antiinflamatorno, antialergijsko, analgetičko, antibakterijsko, antivirusno i antimikotičko dejstvo (Contini *et al.* 2008).

Tanini spadaju u grupu polifenola i u biljkama se najčešće nalaze u lišću, pupoljku, semenu i korenu. Zahvaljujući svom antimikrobnom delovanju, os-

Natalija Arsić (1994), Beograd, Dr Ivana Ribara 162/32, učenica 3. razreda Prve beogradske gimnazije

Nataša Diklić (1994), Apatin, Prigrevačka 5, učenica 3. razreda Gimnazije „Nikola Tesla” u Apatinu

MENTOR: dr Marija Radojković, asistent, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu

novna uloga tanina jeste odbrana biljnih organa od brojnih štetnih uticaja spoljašnje sredine. Primena tanina u industriji za preradu kože datira još od davnina, a danas se oni koriste i za proizvodnju boja, lepka, a predstavljaju i jedan od najvažnijih sastojaka za razbistravanje vina. Zbog svog antitumogenog i antikancerogenog dejstva, tanini su našli primenu i u kozmetičkoj industriji, medicini, agronomiji i fitoterapiji (Romani *et al.* 2012). Osim toga, istraživanjem Hagermana i saradnika pokazano je da tanini predstavljaju izuzetno jake antioksidanse, mnogo jače od jednostavnih monomernih fenola, kao i da najverovatnije imaju dvojaku antioksidativnu ulogu: čuvaju kako bitne hranjive materije ćelija, tako i druge biološke antioksidanse od oksidativne degradacije (Hagerman *et al.* 1998).

Ranije su se radi upotrebe u komercijalne svrhe farmaceutske ili kozmetičke industrije najviše koristili sintetički antioksidansi. Međutim, dokazano je da su neki od njih štetni po zdravlje ljudi. Zbog toga se počelo tragati za prirodnim antioksidansima koji će u što većoj meri uspešno zameniti veštačke. Pošto biljke predstavljaju izvor prirodnih antioksidanasa, u poslednjih nekoliko godina sve se više ispituju antioksidativne osobine raznovrsnih biljaka.

Leska je višegodišnja biljka iz porodice *Corylaceae*. Delovi leske koji se najviše koriste u komercijalne svrhe su seme i plod (lešnik), uključujući i njegov perikarp i kožicu. Dokazano je da su svi delovi lešnika i seme bogati izvori kako fenolnih jedinjenja, tako i brojnih proteina, minerala (kalijuma, kalcijuma, magnezijuma, selen) i vitamina (Jakopic *et al.* 2011), te da su potencijalno pogodni za upotrebu u izradi dijetetskih ili kozmetičkih proizvoda. Ranija istraživanja samog lišća leske vršena su u cilju određivanja organohlornih pesticida (Barriada-Pereira *et al.* 2004), sadržaja hormona (Andres *et al.* 2002), policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Howsam *et al.* 2000), slobodnih poliamina (Rey *et al.* 1998), fenolnog sastava (Amaral *et al.* 2005), kao i određivanja antioksidativnih osobina njihovog vodenog (Oliveira *et al.* 2007), metanolnog, etanolnog i acetonog ekstrakta (Arsić i Diklić 2011), ali do sada nisu vršena ispitivanja njihovih nepolarnih frakcija.

Cilj ovog rada jeste određivanje osobina i antioksidativne aktivnosti nepolarnih frakcija etanolnog ekstrakta lista leske, kao i određivanje zavisnosti antioksidativne aktivnosti od nepolarnih jedinjenja.

Materijal i metode

U radu su korišćene supstance čistoće p.a. Biljni materijal potiče iz Velikog sela u okolini Loznice, osušen je prirodnim putem i isitnjen laboratorijskim mlinom. Spektrofotometrijska merenja rađena su na spektrofotometru CECIL CE 2021, Velika Britanija.

Priprema uzoraka

Osušeni i isitnjeni biljni materijal maceriran je smešom etanol (Zorka Šabac)/voda (70/30, v/v) u odnosu 1:15 (m/v), tokom 24 h. Radi što efikasnije ekstrakcije aktivnih materija iz biljnog materijala, primenjena je trostruka maceracija istim ekstragensom, u istom odnosu, tokom istog vremenskog perioda. Dobijeni ekstrakt je zatim uparen na vakuum uparivaču do suva. Suvi ostatak je rastvoren u vodi, nakon čega je izvršeno fracionisanje (1/1, v/v) etil-acetatom (Zorka Farm) i n-heksanom (Centrohem). Nakon toga, etil-acetat i n-heksan upareni su iz svojih frakcija na vakuum uparivaču, a suvi ostatak rastvoren je u istoj zapremini 96% (m/m) etanola.

Ispitivanje hemijskog sastava

Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja (Metoda po Folin-Ciocalteu, FC)

Metoda FC zasniva se na merenju redukcionne sposobnosti fenolnih jedinjenja čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens (FCR) do plavo obojenog jona (fenol-MoW₁₁O₄₀)⁴⁻. Intenzitet obojenosti srazmeran je koncentraciji fenolnih jedinjenja (Mitrović 2008).

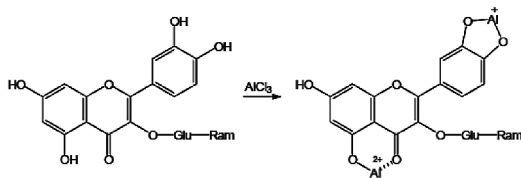
Reakcioni sistem dobijen je mešanjem 0.1 mL frakcije etanolnog ekstrakta, 7.9 mL destilovane vode, 0.5 mL FCR (Sigma Aldrich, Nemačka) i 1.5 mL 20% (m/m) rastvora natrijum-karbonata (Merk-Alkaloid). Slepna proba pripremljena je mešanjem 8 mL destilovane vode, 0.5 mL FCR i 1.5 mL 20% natrijum-karbonata. Nakon inkubacije u trajanju od 2 sata izmerena je apsorbancija na talasnoj dužini od 750 nm. Kao standard korišćena je galna kiselina (Sigma Aldrich, Nemačka).

Na osnovu izmerenih apsorbanci ispitivanih rastvora frakcija ekstrakta izračunata je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja za svaki uzorak, odnosno sadržaj ukupnih fenola preračunatih na galnu kiselinu (izražen preko miligrama galne kiseline kao ekvi-

valenta (GAE) po jednom gramu čistog biljnog materijala (D), mg GAE/g D).

Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida (Metod po Markhamu)

Ova spektrofotometrijska metoda zasniva se na kompleksiranju aluminijum(III) jona flavonoidima (slika 1).



Slika 1. Struktura rutina i njegovog kompleksa sa aluminijumom

Figure 1. Structure of rutin and its complex with aluminium

Dobijene frakcije su uparene na vakuum uparivaču i rastvorene u rastvoru za ekstrakciju (metanol:voda:sirćetna kiselina (Zorka Farm); 14:5:1 v/v/v) u odnosu 1:1 (v/v). U 5 mL tako dobijene smeše dodat je 1 mL destilovane vode i 2.5 mL aluminijum-hloridnog reagensa (dobijenog mešanjem 133 mg aluminijum-hlorida heksahidrata (Merk) i 400 mg natrijuma-acetata (Merk)). Slepa proba pripremljena je mešanjem 6 mL rastvora za ekstrakciju i 2.5 mL aluminijum-hloridnog reagensa. Po pripremanju reakcione smeše merena je apsorbanca na talasnoj dužini od 430 nm. Kao standard korišćen je rastvor rutina.

Na osnovu kalibracione krive rutina kao standarda, izračunat je ukupni sadržaj flavonoida izražen u miligramima rutina kao ekvivalenta (RE) u gramu droge (mg RE/g D).

Određivanje ukupnog sadržaja tanina

U 10 mL frakcije dodato je 0.1 g kožnog praha (Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“), mešavina je snažno mučkana 60 min i nakon toga filtrirana. U 0.1 mL filtrata dodato je 7.9 mL destilovane vode, 0.5 mL FCR i 1.5 mL 20% (m/m) rastvora natrijum-karbonata. Slepa proba priprem-

ljena je mešanjem 8 mL destilovane vode, 0.5 mL FCR i 1.5 mL 20% natrijum-karbonata. Nakon inkubacije u trajanju od 2 h izmerena je apsorbanca na 750 nm. Kao standard korišćena je galna kiselina.

Na osnovu izmerenih apsorbaneci ispitivanih rastvora frakcija ekstrakta izračunata je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja netaninske prirode za svaki uzorak, odnosno sadržaj ukupnih fenola netaninske prirode sračunatih na galnu kiselinu (izražena preko miligrama galne kiseline kao ekvivalenta (GAE) po jednom gramu čistog biljnog materijala (D), mg GAE/g D). Sadržaj tanina dobijen je kao razlika sadržaja ukupnih i netaninskih fenola.

Određivanje antioksidativnih karakteristika

Određivanje redukcione moći (Metod po Oyaizu)

U 1 mL ispitivane frakcije dodat je 1 mL rastvora natrijum-fosfatnog pufera koncentracije 0.2 mol/L (Merk) (pH 6.6) i 1 mL rastvora kalijum-heksacijanoferata(III) (Kemika) masenog udela 0.01. Smeša je inkubirana na temperaturi od 50°C tokom 20 min. Nakon dodatka 1 mL rastvora trihlorsirćetne kiseline (Centrohema) masenog udela 0.1, smeša je centrifugirana na 2000 obrtaja po minutu tokom 10 min. Jedan mililitar ove smeše je pomešan sa 1 mL destilovane vode i 0.2 mL rastvora gvožđe(III)-hlorida (Merk) masenog udela 0.001. Nakon 10 minuta izmerena je apsorbanca na talasnoj dužini od 700 nm. Kao standard upotrebljen je vitamin C (Centrohema).

Koncentracija frakcije koja ima apsorbanca od 0.5 (EC₅₀) i redukuje 50% prisutnih Fe³⁺ u Fe²⁺ izračunata je pomoću grafika zavisnosti apsorbanca od koncentracije frakcije i izražena je preko masene koncentracije biljnog materijala u frakciji.

Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta fosfo-molibdatskom metodom

Ova analiza zasnovana je na redukciji molibdena(VI) do molibdena(V) antioksidansima i kasnijim formiranjem zelenog fosfat-Mo(V) kompleksa u kiseljoj sredini (Prieto *et al.* 1999). Intenzitet obojenosti rastvora srazmeran je sposobnosti antioksidanasa da redukuju Mo(VI) do Mo(V), odnosno njihovom antioksidativnom kapacitetu.

Reakciona smeša dobijena je mešanjem 3 mL reagensa (koji sadrži 0.6 M sumpornu kiselinu (Lahner), 28 mM natrijum-fosfat (Istraživačka stanica Petnica) i 4 mM amonijum-molibdat (Kemika)) i

0.3 mL ispitivane frakcije. Slepna proba je sadržala 3 mL reagensa i 0.3 mL 96% (m/m) etanola. Nakon inkubacije uzoraka u trajanju od 90 min pri temperaturi od 95°C i njihovog hlađenja do sobne temperature, apsorbancu je očitana na talasnoj dužini od 695 nm. Kao standard korišćena je galna kiselina.

Na osnovu izmerenih apsorbanci izračunat je antioksidativni kapacitet frakcija izražen preko miligrama galne kiseline kao ekvivalenta (GAE) po jednom gramu čistog biljnog materijala (D), mg GAE/g D.

Određivanje sposobnosti vezivanja DPPH radikala

Za određivanje kapaciteta hvatanja slobodnih radikala (Radical Scavenging Capacity – RSC) i IC₅₀ može se primeniti 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) test. Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju transformacije ljubičastog stabilnog DPPH radikala u redukovanu žutu formu DPPH-H.

Kontrolna proba je pripremljena mešanjem 3 mL rastvora metanola zapreminskog udela 0.95 i 1 mL rastvora DPPH koncentracije 90 µmol/L (dobijenog rastvaranjem 3.548 mg DPPH u metanolu zapreminskog udela 0.95). Radna proba dobijena je mešanjem 0.1 mL frakcije, 2.9 mL rastvora metanola zapreminskog udela 0.95 i 1 mL rastvora DPPH koncentracije 90 µmol/L. Reakciona smeša je ostavljena da odstoji 60 min na tamnom mestu na sobnoj temperaturi posle čega je očitavana apsorbancu na 515 nm. Kao slepa proba korišćen je rastvor metanola zapreminskog udela 0.95.

RSC u procentima računa se pomoću izraza:

$$RSC = \left(1 - \frac{A_{uzorka}}{A_{slepe\ proba}} \right) \times 100$$

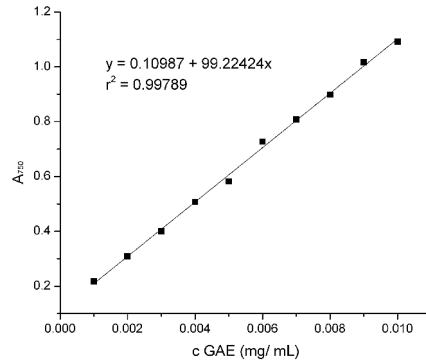
Koncentracija frakcije koja ima sposobnost inhibicije stvaranja DPPH radikala na 50% maksimalne vrednosti (IC₅₀) izračuna se sa grafika zavisnosti RSC od masene koncentracije frakcije.

Rezultati i diskusija

Ispitivanje hemijskog sastava

Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja

Na osnovu podataka koji su prikazani na slici 2. izračunate su koncentracije fenola izražene preko ekvivalenta galne kiseline i prikazane u tabeli 1.



Slika 2. Zavisnost apsorbance od koncentracije galne kiseline

Figure 2. Absorbance as a function of gallic acid concentration

Tabela 1. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim frakcijama

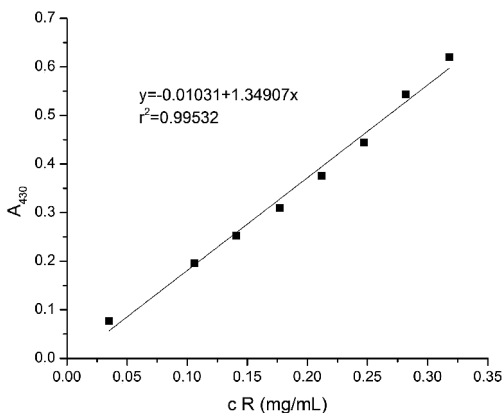
Vrsta frakcije	Koncentracija fenola (mg GAE/ g D)
n-heksanska	0.34 ± 0.03
etil-acetatna	16 ± 3

Poznato je da količina ekstrahovane materije zavisi od prirode rastvarača, ali i prirode ekstrahovane materija. Ovi rezultati pokazuju da je primenom etil-acetata kao rastvarača ekstrahovano značajno više fenola iz istog vodenog rastvora etanolnog ekstrakta lista leske nego primenom n-heksana, što je i očekivano, s obzirom na veći stepen sličnosti u polarnost između fenola i etil-acetata nego između fenola i n-heksana.

U poređenju sa sadržajem ukupnih fenola u vodenim ekstraktima lešnika (Oliveira *et al.* 2008) i lišća (Oliveira *et al.* 2007) tri vrste leske (*C. daviana* L., *C. f. coutard* L., *C. m. bollwiller* L.), kao i etanolnom, metanolnom i acetonskom ekstraktu kožice lešnika (Contini *et al.* 2008), etil-acetatna frakcija pokazala se bogatijom fenolima u odnosu na vodeni ekstrakt lešnika i sve vrste ekstrakta njegove kožice, a nešto siromašnijom u odnosu na vodeni ekstrakt lišća, dok n-heksanska frakcija sadrži značajno manje fenolnih jedinjenja od svih pomenutih ekstrakata.

Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Na osnovu kalibracione krive rutina kao standarda prikazane na slici 3 izračunate su masene koncentracije flavonoida u ekstraktima i te vrednosti prikazane su u tabeli 2.



Slika 3. Grafik zavisnosti apsorbance od koncentracije rutina

Figure 3. Absorbance as a function of rutin concentration

Tabela 2. Sadržaj flavonoida u ispitivanim frakcijama

Vrsta frakcije	Koncentracija flavonoida (mg ER/ g D)
n-heksanska	0.1622 ± 0.0001
etil-acetatna	6.0560 ± 0.0002

Na osnovu vrednosti koje su prikazane u tabeli 2 uočava se razlika u frakcionisanoj količini flavonoida iz etanolnog ekstrakta lista leske. Veću koncentraciju flavonoida sadrži etil-acetatna frakcija u odnosu na frakciju koja je dobijena frakcionisanjem n-heksanom. Ovi rezultati potvrđuju da nepolarniji rastvarači, u ovom slučaju n-heksan, imaju manju sposobnost izolovanja flavonoida iz uzorka. Međutim, primećuje se i da je udeo flavonoida u ukupnom sadržaju polifenolnih jedinjenja (tabela 3) u n-heksanskoj frakciji veći nego u etil-acetatnoj, što ukazuje na veći relativni afinitet prema flavonoidima n-heksana u odnosu na etil-acetat. Takođe, podaci

prikazani u tabeli 3 pokazuju da ispitivane frakcije sadrže i fenole neflavonoidne prirode.

Tabela 3. Udeo flavonoida u fenolnim jedinjenjima izražen u procentima

Vrsta frakcije	Udeo flavonoida (%)
n-heksanska	47.8
etil-acetatna	36.9

Određivanje ukupnog sadržaja tanina

Na osnovu kalibracione krive koja je prikazana na slici 2 izračunate su koncentracije fenola neta-ninske prirode prisutne u ispitivanim frakcijama, čijim je oduzimanjem od koncentracije ukupnih fenola izračunata koncentracija tanina u uzorcima.

Tabela 4. Sadržaj tanina u ispitivanim frakcijama

Vrsta frakcije	Koncentracija tanina (mg GAE/ g D)
n-heksanska	0.07 ± 0.01
etil-acetatna	3.7 ± 0.5

Na osnovu vrednosti prikazanih u tabelama 1 i 4 uočava se razlika između ekstrahovane količine fenola i tanina iz istog vodenog rastvora etanolnog ekstrakta lista leske. U skladu sa sadržajem ukupnih fenola, etil-acetatna frakcija sadrži značajno veću količinu tanina nego n-heksanska, ali je primećeno da je udeo ekstrahovanih tanina u odnosu na ukupne fenole (tabela 5) između etil-acetata i n-heksana veoma sličan, što ukazuje na sličan relativni afinitet etil-acetata i n-heksana prema taninima.

Udeo ekstrahovanih tanina u količini ukupnih fenola prisutnih u frakcijama prikazan je u tabeli 5 i pokazuje da fenolni sastav frakcija obuhvata i neta-ninske grupe fenolnih jedinjenja.

Tabela 5. Udeo tanina u fenolnim jedinjenjima izražen u procentima

Vrsta frakcije	Udeo tanina (%)
n-heksanska	19.4
etil-acetatna	22.7

Ukoliko se, uz ove rezultate, u obzir uzmu i rezultati prikazani u tabeli 3, može se primetiti da je relativni afinitet ispitivanih rastvarača, i n-heksana i etil-acetata, veći prema flavonoidima nego prema taninima, ali i da se oba rastvarača mogu uspešno koristiti i za izolovanje fenolnih jedinjenja neflavonoide i netaninske prirode.

Određivanje antioksidativne aktivnosti

Određivanje redukcionne moći

EC₅₀ vrednosti za uzorke i standard prikazane su u tabeli 6 i određene su na osnovu grafika zavisnosti apsorbance od koncentracije droge, odnosno vitamina C kao standarda.

Uzorak	EC ₅₀ (mg/mL)
n-heksanska frakcija	2.216
etil-acetatna frakcija	2.950
standard: vitamin C	2.203×10 ⁻³

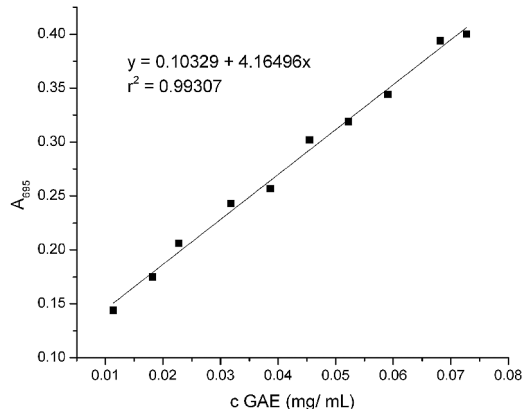
Pokazano je da redukciona moć uzoraka raste sa porastom koncentracije frakcije i standarda. U odnosu na etil-acetatnu frakciju, n-heksanska frakcija ima manju vrednost EC₅₀, a samim tim veću redukcionu moć. Međutim, obe frakcije pokazuju značajno manju redukcionu moć u odnosu na standard, što je bilo očekivano.

U poređenju sa rezultatima dobijenim u prethodnim istraživanjima (Oliveira *et al.* 2008) n-heksanska frakcija pokazuje veću redukcionu moć od ekstrakta ploda dve različite vrste leske (*F. Coutard* L. i *M. Bolliwiller* L.), što nije slučaj sa etil-acetatnom frakcijom. Takođe, n-heksanska frakcija pokazuje veću redukcionu moć i u odnosu na vodene ekstraktata lista leske (Amaral *et al.* 2005).

Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta fosfo-molibdatskom metodom

Sa grafika zavisnosti apsorbance od koncentracije galne kiseline prikazanog na slici 4, izračunata je ukupna antioksidativna aktivnost frakcija izražena preko masene koncentracije galne kiseline kao ekvivalenta (tabela 7).

Pokazano je da etil-acetatna frakcija ispoljava veći antioksidativni kapacitet u odnosu na n-hek-



Slika 4. Zavisnost apsorbance od koncentracije galne kiseline

Figure 4. Absorbance as a function of gallic acid concentration

sansku frakciju. Poznato je da se ovom metodom najčešće detektuju antioksidansi kao što su askorbinska kiselina, tokoferoli i karotenoidi, ali i glutation, cistein i aromatični amini koji imaju sposobnost da doniraju vodonik i elektrone (Prieto *et al.* 1999). S obzirom na slabu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti ispitivanih frakcija ($r = 0.038$ za n-heksansku, odnosno $r = 0.687$ za etil-acetatnu), pretpostavlja se da na antioksidativni kapacitet frakcija, osim fenola, utiču i prisutna jedinjenja nefenolne prirode koja takođe ispoljavaju antioksidativne osobine. Pored toga, moguće je da prisutni fenoli poseduju veći antioksidativni kapacitet od galne kiseline kao standarda.

Vrsta frakcije	Antioksidativni kapacitet (mg GAE/ g D)
n-heksanska	9.0 ± 1.1
etil-acetatna	24 ± 1

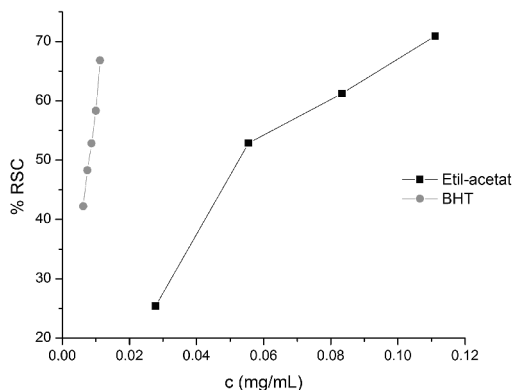
Upoređujući dobijene rezultate sa rezultatima antioksidativnog kapaciteta vodenih ekstrakata lišća tri vrste bibera (*P. kauri* L., *P. ghanagete* L., *P. bagerhati* L.) (Nabasree i Bratati 2004), pokazano je da etil-acetatna frakcija poseduje neznatno veći

antioksidativni kapacitet od dve vrste (*P. ghanagete* L, *P. bagerhati* L.), dok se n-heksanska pokazala značajno slabijom u odnosu na ekstrakte sve tri vrste.

Određivanje sposobnosti vezivanja DPPH radikala

EC₅₀ vrednosti za uzorke i standard prikazane su u tabeli 8. Određene su na osnovu grafika zavisnosti apsorbance od masene koncentracije droge, odnosno BHT kao standarda (slika 5).

Uzorak	EC ₅₀ (mg/mL)
n-heksanska frakcija	–
etil-acetatna frakcija	0.053
standard: BHT	0.008



Slika 5. Grafik zavisnosti apsorbance uzoraka i standarda od koncentracije droge i BHT

Figure 5. Absorbance of samples and standard as a function of drug and BHT concentration

BHT, kao standard, pokazuje najvišu aktivnost na svim koncentracijama. U ispitivanim koncentracijama, n-heksanska frakcija nije pokazala promenu ljubičaste boje u žutu koja se dešava nakon redukcije DPPH radikala. Dakle, nije pokazala sposobnost da veže DPPH radikale, što nije bio slučaj sa etil-acetatnom frakcijom. Pretpostavlja se da je etil-acetatna frakcija pokazala veću sposobnost vezivanja DPPH radikala zbog prisustva veće količine fenolnih jedinjenja u odnosu na n-heksansku. Takođe, aktivnost

stabilizacije radikala može biti u vezi sa prirodom flavonoida koji omogućavaju elektronima DPPH jonizaciju, a koji su u većoj meri prisutni u etil-acetatnoj frakciji.

U odnosu na dosadašnja istraživanja etil-acetatna frakcija pokazuje značajno veću sposobnost vezivanja DPPH radikala u odnosu na ekstrakte lešnika sve tri različite vrste leske (Oliveira *et al.* 2008) kao i od vodenih ekstrakata lista leske (Amaral *et al.* 2005).

Daljim upoređivanjem rezultata sa rezultatima dobijenim ispitivanjem antioksidativnih karakteristika etanolnog ekstrakta lista leske (Arsić i Diklić 2011), pokazano je da se etil-acetat može uspešno koristiti za izolovanje fenola iz ekstrakta, dok je uspešnost izolovanja fenolnih jedinjenja n-heksanom značajno manja, te nije pogodno koristiti ovaj ekstragens za njihovo izolovanje. Međutim, rezultati dobijeni ranijim istraživanjem etil-acetatnog ekstrakta lista leske (Arsić i Diklić 2011) ukazuju na veliku ulogu samog ekstragensa. Naime, etil-acetat se pokazao nepogodnim za ekstrahovanje fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala, ali pogodnim za izolovanje aktivnih supstanci iz vodenog rastvora etanolnog ekstrakta. Najverovatniji razlog tome jeste nemogućnost prolaska nepolarnih rastvarača, kakav je etil-acetat, kroz polupropustljivu membranu biljnih ćelija i ćelijski zid, što ukazuje na neophodno ekstrahovanje aktivnih materija iz biljnog materijala polarnim rastvaračem. U skladu s tim, ispitivana etil-acetatna frakcija pokazala je veću redukcionu moć od ranije ispitivanog etil-acetatnog ekstrakta (Arsić i Diklić 2011).

Zaključak

Dobijeni podaci pokazuju da količina ekstrahovane materije zavisi kako od droge, tako i od upotrebljenog ekstragensa. Pokazano je da se etil-acetat može uspešno koristiti za izolovanje kako tanina i flavonoida, tako i ostalih fenolnih jedinjenja, kao i da tako dobijena frakcija ispoljava visoki antioksidativni kapacitet i poseduje veliku sposobnost redukovanja DPPH radikala. Sa druge strane, dobijeno je da n-heksan ne predstavlja pogodan ekstragens za fenole i tanine, ali da njegova frakcija ispoljava veću redukcionu moć i zadovoljavajući antioksidativni kapacitet. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da antioksidativne osobine u velikoj meri zavise i od nepolarnih jedinjenja, tj. da se brojni antioksidansi u

ispitivanom biljnom materijalu najverovatnije nalaze u obliku glikozida i proteinskih derivata.

U nameri da se u što većoj meri sintetički antioksidansi zamene prirodnim preporučuje se dalje ispitivanje etil-acetatne frakcije u cilju primene u farmaceutskoj, prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji.

Literatura

Amaral J. S., Andrade P. B., Ferreres F., Pinheiro C., Santos A., Valentao P. 2005. Phenolic of hazel (*Corylus avellana* L.) leaves cultivars grown in Portugal. *Natural Product Research*, **19**: 157.

Andrade P. B., Bento A., Estevinho L., Ferreira I. C. F. R., Ferreras F., Oliveira I., Pereira J. A., Seabra R., Sousa A., Valentao P. 2007. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry*, **105**: 1018.

Andres H., Fernandez B., Rodriguez A., Rodriguez R. 2002. Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **70**: 173.

Arsić N., Diklić N. 2011. Određivanje osobina i antioksidativne aktivnosti ekstrakata lista leske. *Petničke sveske*, **69**: 383.

Contini M., Baccelloni S., Massantini R., Anelli G. 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, **110**: 659.

Barriada-Pereira M., Fernandez-Fernandez E., Gonzalez-Castro M. J., Lopez-Mahia P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodriguez D. 2004. Determination of 21 organochlorine pesticides in tree leaves using solid-phase extraction clean-up cartridges. *Journal of Chromatography A*, **1061**: 133.

Hagerman A. E., Riedl K. M., Jones G. A., Sovik K. N., Ritchard N. T., Hartzfeld P. W. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 1887.

Havsteen B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, **96**: 67.

Howsam M., Ineson P., Jones K.C. 2000. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I – Concentrations and profiles. *Environmental Pollution*, **108**: 413.

Iwatsuki M., Kigoshi M., Niki E., Tsuchihashi H. 1995. Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **323**: 137.

Jakopic J., Petkovsek M. M., Likožar A., Solar A., Stampar F., Veberic R. 2011. HPLC-MS identification of phenols in hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels. *Food Chemistry*, **124**: 1100.

Kennedy T. A., Liebler D. C. 1991. Peroxy radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides. *Chemical Research in Toxicology*, **4**: 290.

Kokubo K., Matsubayashi K., Oshima T., Takada H. 2006. Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by β -carotene bleaching assay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **70**: 3088.

Li H. Y., Hao Z. B., Wang X. L., Huang L., Li, J. P. 2009. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource technology*, **100**(2): 970.

Mitrović B. 2008. Ekstrakcija i analiza različitih vrsta suvih pečuraka. Diplomski rad. Tehnološki fakultet Univerzitet u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, Novi Sad

Nabasree D., Bratati D. 2004. Antioxidant capacity of Piper betle L. leaf extract in vitro. *Food Chemistry*, **88**: 219.

Oliveira I., Sousa A., Morais S. J., Ferreira C.F.R.I., Bento A., Estevinho L., Pereira A. 2008. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 1801.

Oliveira I., Sousa A., Valentao P., Andrade B. P., Ferreira C. F. R. I., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L., Pereira J. A. 2007. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry*, **105**: 1018.

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 E. *Analytical Biochemistry*, **269**: 337.

Rey M., Diaz-Sala C., Rodriguez R. 1998. Free polyamine content in leaves and buds of hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Negret) trees subjected to repeated severe pruning. *Scientia Horticulturae*, **76**: 115.

Romani A., Campo M., Pinelli P. 2012. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical

activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry*, **130**: 214.

Tumbas T. V. 2010. Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Univerzitet u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, Novi Sad

Natalija Arsić and Nataša Diklić

Determination of Characteristics and Antioxidant Activity of Non-Polar Fractions of Hazel Leaf Extracts

The aim of this study was to determine the content of phenolic compounds and antioxidant activity of n-hexane and ethyl acetate fractions of an ethanol extract of hazel leaf, as well as the determination of the dependence of antioxidant characteristics on

non-polar compounds. The total content of phenols, flavonoids and tannins and antioxidant activity were examined using spectrophotometric methods. Antioxidant activity was determined by examining the reducing power, total antioxidant capacity by the phosphomolibdenum method and DPPH scavenging activity. The results showed that ethyl acetate can successfully be used for the isolation of flavonoids, tannins and other phenols, which is not the case with n-hexane. Considering these results, the ethyl acetate fraction has high antioxidant capacity and exhibits great ability to scavenge DPPH radicals. Furthermore, it was shown that both fractions exhibit a high reducing power, but it is just a bit higher than with the n-hexane fraction. Based on these results, it can be concluded that the antioxidant properties depend largely on the non-polar compounds, and, because of that, a great number of antioxidants in the tested plant material are in the shape of a glycoside and protein derivatives. 