

BIOLOŠKA AKTIVNOST VRSTE *PETRORHAGIA SAXIFRAGA* (L.) Link (CARYOPHYLLACEAE)

Milan Stanković¹, Nenad Zlatić¹, Biljana Bojović¹, Dragana Jakovljević¹

Izvod: Antioksidativna aktivnost, količina ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida analizirani su spektrofotometrijskim metodama u vodenom, metanolnom i etil acetatnom ekstraktu vrste *Petrorhagia saxifraga* (L.) Link (Caryophyllaceae). Količina ukupnih fenolnih jedinjenja je u opsegu od 41,21 do 48,50 mg GA/g ekstrakta. Koncentracija flavonoida je opsegu od 24,64 do 69,67 mg RU/g ekstrakta. Najveća količina ukupnih fenolnih jedinjenja izmerena je u etil acetatnom ekstraktu, dok je najveća količina flavonoida izmerena u metanolnom ekstraktu. Antioksidativna aktivnost je u opsegu od 874,56 do 672,33 µg/ml. Najvišu antioksidativnu aktivnost ispoljava etil acetatni ekstrakt, za koji je utvrđena i najveća količina ukupnih fenolnih jedinjenja.

Ključne reči: *Petrorhagia saxifraga*, Caryophyllaceae, fenolna jedinjenja, antioksidativna aktivnost

Uvod

Familija Caryophyllaceae obuhvata izvestan broj vrsta se koriste u tradicionalnoj medicini širom sveta. U okviru ove biljne familije, izdvajaju se rodovi koji su bogati lekovitim biljnim vrstama, kao što su: *Saponaria*, *Stellaria*, *Herniaria*, *Cerastium*, *Dianthus* itd. Pored različitih vidova terapijskih aktivnosti, aktivni sekundarni metaboliti biljnih vrsta koje pripadaju ovoj familiji ispoljavaju antikancerogenu, antimikrobnu, antivirusnu, antifungalnu, antiinflamatornu i antioksidativnu aktivnost u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Chandra and Rawat, 2015).

Rod *Petrorhagia* (familija Caryophyllaceae) obuhvata mali broj vrsta rasprostranjenih na teritoriji Evrope i Azije. U flori Srbije zastupljene su: *Petrorhagia illyrica*, *P. saxifraga* i *P. prolifera* (Gajić, 1970). Vrsta *Petrorhagia saxifraga* (L.) Link. (sinonim: *Tunica saxifraga* (L.) Scop.) je višegodišnja, busenasta, zeljasta biljka, visine od 10 do 45 cm sa izraženo granatim, uspravnim ili poleglim izdancima. Listovi su sitni i linearnog oblika. Cvetovi su pojedinačni, ružičaste ili bele boje. *Petrorhagia saxifraga* uglavnom naseljava termofilna, otvorena krečnjačka i serpentinska staništa, kamenjare, termofilne livade i degradirana termofilna šumska staništa na teritoriji Evrope i Azije (Gajić, 1970).

U literaturnim izvorima nisu utvrđeni podaci o ispitivanju količine sekundarnih metabolita i biološke aktivnosti za vrstu *Petrorhagia saxifraga*. Na osnovu toga, glavni cilj prikazanog istraživanja je spektrofotometrijsko određivanje ukupne količine fenolnih jedinjenja, koncentracije flavonoida, kao i određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata nadzemnih delova vrste *Petrorhagia saxifraga* dobijenih ekstrakcijom pomoću metanola, etil acetata i vode kao rastvarača.

¹ Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (mstankovic@kg.ac.rs).

Materijal i metode rada

Hemikalije

Organski rastvarači (metanol i etil acetat) i natrijum hidrogen karbonat (NaHCO_3) nabavljeni su od proizvođača „Zorka pharma“ Šabac, Srbija. Galna kiselina, rutin i 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) reagens nabavljeni su od Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA. Folin-Ciocalteu fenol reagens i aluminijum hlorid heksahidrat ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) nabavljeni su od Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland.

Biljni material

Petrorhagia saxifraga (L.) Link (Caryophyllaceae) je uzorkovana u junu 2015. godine sa lokaliteta Brđanska klisura (Gornji Milanovac, centralna Srbija). Nadmorska visina: 345 m; stanište: serpentinski kamenjar. Identifikacija uzorkovanih primeraka je izvršena u Institutu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matetičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

Priprema biljnih ekstrakata

Osušen biljni materijal (10 g) pomešan je sa 200 ml rastvarača (metanol, etil acetat i destilovana voda) i ekstrahovan na sobnoj temperaturi. Nakon 48 h, ekstrakt je filtriran pomoću Whatman No. 1 filter papira. Dobijeni biljni ekstrakti su upareni do suvog stanja na temperaturi od 40 °C pomoću rotacionog uparivača.

Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Ukupna količina fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima je određena primenom spektrofotometrijske metode (Singleton i sar., 1999). Uzorak je pripremljen mešanjem 0,5 ml metanolnog rastvora (1 mg/ml) ekstrakta, 2,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa rastvorenog u vodi i 2 ml rastvora NaHCO_3 . Uzorci su inkubirani 15 min na 45 °C. Nakon inkubacije uzoraka, očitana je apsorbance na 765 nm talasne dužine. Za svaki ekstrakt pripremljena su po tri uzorka i izračunata je srednja vrednost apsorbance. Dobijene vrednosti za količinu fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima izražene su kao ekvivalent galne kiseline (mg GA g ekstrakta).

Određivanje sadržaja flavonoida

Količina flavonoida u ekstraktima određena je primenom spektrofotometrijske metode (Quettier i sar., 2000). Uzorak je pripremljen mešanjem 1 ml metanolnog rastvora ekstrakta i 1 ml 2% AlCl_3 . Uzorci su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, očitana je apsorbance na 415 nm talasne dužine. Za svaku analizu pripremljena su tri test uzorka i određena je srednja vrednost apsorbance. Ukupna koncentracija flavonoida u biljnim ekstraktima izražena je kao ekvivalent rutina (mg RU g ekstrakta).

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti sekundarnih metabolita

Sposobnost biljnih ekstrakata da neutrališu DPPH radikale određena je spektrofotometrijskom metodom (Tekao i sar., 1994; Kumarasamy i sar., 2007). Metanolni rastvor biljnog ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/ml korišćen je za pripremu deset dvostrukih razblaženja. U svaki rastvor ekstrakta dodato je po 1 ml metanolnog rastvora DPPH reagensa. Nakon dodavanja reagensa i inkubacije uzoraka, očitana je apsorbanca na 517 nm talasne dužine. Step en inhibicije izračunat je u procentima pomoću jednačine: % inhibicije = $100 \times (A \text{ kontrole} - A \text{ uzorka}) / A \text{ kontrole}$. Na osnovu dobijenih procenata inhibicije, izračunate su IC₅₀ vrednosti antioksidativne aktivnosti izražene u µg/ml. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 3).

Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata merenja sprovedena je primenom SPSS (Čikago, Illinois) statističkog softver paketa (SPSS za windows, verzija XII, 2004).

Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati ispitivanja količine ukupnih fenolnih jedinjenja, posebno količine flavonoida, kao i antioksidativne aktivnosti vodenih, metanolnih i etil acetatnih ekstrakata vrste *Petrorhagia saxifraga*, prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Količina ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata vrste *Petrorhagia saxifraga*

Table 1. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant activity of Petrorhagia saxifraga extracts

Tip analize <i>Type of analysis</i>	Tip ekstrakta <i>Type of extract</i>		
	Vodeni <i>Water</i>	Metanolni <i>Methanolic</i>	Etil acetatni <i>Ethyl acetate</i>
Količina ukupnih fenolnih jedinjenja (mg Ga/g ekstrakta) <i>Total phenolic content</i> (mg of GA/g of extract)	45,37 ± 0,76	41,21 ± 0,87	48,50 ± 2,85
Količina flavonoida (mg Ru/g ekstrakta) <i>Flavonoid content</i> (mg of Ru/g of extract)	24,64 ± 1,02	69,67 ± 2,59	61,13 ± 1,94
Antioksidativna aktivnost IC ₅₀ (µg/ml) <i>Antioxidant activity</i> IC ₅₀ (µg/ml)	796,54 ± 3,21	874,56 ± 1,55	672,33 ± 2,01

Količina ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima vrste *Petrorrhagia saxifraga* ispitivana je spektrofotometrijskom metodom pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Metoda se zasniva na određivanju redukujućeg kapaciteta fenolnih jedinjenja iz rastvora biljnog ekstrakta, gde njihovim disosovanjem nastaje proton i fenoksidni anjon koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do jona koji daje plavo obojenje. Dobijene vrednosti za količinu ukupnih fenolnih jedinjenja predstavljene su kao ekvivalent galne kiseline – mg GA/g ekstrakta.

Dobijene vrednosti za količinu ukupnih fenolnih jedinjenja (Tabela 1) su u opsegu od 41,21 do 48,50 mg GA/g ekstrakta. Najveća količina izmerena je u etil acetatnom ekstraktu, dok je vodeni ekstrakt na drugom mestu po količini, a najmanja količina ukupnih fenolnih jedinjenja izmerena je u metanolnom ekstraktu. Poređenjem dobijenih vrednosti uočava se da količina ukupnih fenolnih jedinjenja nema izraženu varijabilnost.

U ekstraktima vrste *Petrorrhagia saxifraga*, pored ukupnih fenolnih jedinjenja određivan je i kvantitativni udeo flavonoida. Količina flavonoida određivana je spektrofotometrijskom metodom sa $AlCl_3$ gde kao rezultat reakcije nastaju metalokompleksi. Dobijene vrednosti količine flavonoida predstavljene su kao ekvivalent rutina – mg Ru/g ekstrakta.

Dobijene vrednosti za količinu flavonoida (Tabela 1) su u opsegu od 24,64 do 69,67 mg Ru/g ekstrakta. Najveća količina izmerena je u metanolnom ekstraktu, dok je etil acetatni ekstrakt na drugom mestu po količini, a najmanja količina flavonoida izmerena je u vodenom ekstraktu. Poređenjem dobijenih vrednosti uočava se da količina flavonoida znatno varira u zavisnosti od tipa rastvarača korišćenog za ekstrakciju.

Obim redukcije slobodnih radikala pod uticajem ekstrakata vrste *Petrorrhagia saxifraga* određen je sprktrofotometrijskim merenjem stepena neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH). Metodom se određuje antioksidativna sposobnost biološki aktivnih jedinjenja u ekstraktima biljaka da kao donori vodonikovog atoma redukuju stabilni 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal do 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazina što se kvantifikuje promenom (smanjenjem) apsorbance na 517 nm (Molyneux, 2003). Antioksidativna aktivnost predstavljena je kao IC_{50} vrednosti ($\mu g/ml$).

Dobijene vrednosti za antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata vrste *Petrorrhagia saxifraga* (Tabela 1) su u opsegu od 874,56 do 672,33 $\mu g/ml$. Najveća antioksidativna aktivnost izmerena je za etil acetatni ekstrakt, dok je vodeni ekstrakt na drugom mestu po aktivnosti, a najmanja aktivnost izmerena je za metanolni ekstrakt.

Dobijeni rezultati ukazuju da visoka vrednost za antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata karakteriše ekstrakte koji imaju veliku količinu fenolnih jedinjenja. Odsustvo korelacije između količine flavonoida i antioksidativne aktivnosti ukazuje u da okviru grupe fenolnih jedinjenja, osim flavonoida postoji više tipova aktivnih sekundarnih metabolita i da nije samo njihova količina svojstvo koje doprinosi aktivnosti već je bitna i njihova hemijska struktura.

U dosadašnjim istraživanjima kvantitativnih i kvalitativnih karakteristika sekundarnih metabolita utvrđeno je da su glavne biološki aktivne komponente vrsta porodice Caryophyllaceae saponini, fitoekdisteroide, benzenoidi i fenil propanoidi (Chandra and Rawat, 2015), kao i flavonoid glikozidi (Pacifico i sar., 2010) za vrste roda *Petrorrhagia*.

Zaključak

Ispitivanjem količine fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u vodenom, metanolnom i etil acetatnom ekstraktu vrste *Petrorhagia saxifraga* utvrđeno je da etil acetatni ekstrakt sadrži najveću količinu ukupnih fenolnih jedinjenja, dok je najveća količina flavonoida izmerena u metanolnom ekstraktu. Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti, utvrđeno je da od ispitivanih ekstrakata, etil acetatni ekstrakt ispoljava najveću antioksidativnu aktivnost.

Literatura

- Chandra S., Rawat D.S. (2015). Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological properties. *Integrative Medicine Research*, 4, 123-131.
- Gajić M. (1970). Genus *Petrorhagia* (Ser.). Published in *Flora of SR Serbia*, Josifović M. (ed.), pp. 250-254. Belgrade, Serbia: Serbian Academy of Sciences and Arts. In Serbian.
- Kumarasamy Y., Byres M., Cox P.J., Jasapars M., Nahar L., Sarker S.D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytotherapy Research*, 21, 615-621.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- Pacifico S., Scognamiglio M., D'Ambrosia B., Piccolella S., Tsafantakis N., Gallicchio M., Ricci A., Fiorentino A. (2010). Spectroscopic characterization and antiproliferative activity on HepG2 human hepatoblastoma cells of flavonoid C-glycosides from *Petrorhagia velutina*. *Journal of Natural Products*, 73, 1979-1978.
- Quettier D.C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M.C., Cayin J.C., Bailleul F., Trotin F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*F. esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela R.R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Tekao T., Watanabe N., Yagi I., Sakata K. (1994). A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1780-1783.

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF
PETRORHAGIA SAXIFRAGA (L.) Link (CARYOPHYLLACEAE)**

Milan Stanković¹, Nenad Zlatić¹, Biljana Bojović¹, Dragana Jakovljević¹

Abstract: Antioxidant activity, total concentration of phenolic compounds and flavonoids were analyzed in water, methanol and ethyl acetate extracts of the species *Petrorhagia saxifraga*. Total concentration of phenolics ranged from 41,21 to 48,50 mg GA/g of the extract. The concentration of flavonoids varied from 24,64 to 69,67 mg RU/g of the extract. The greatest quantity of phenolic compounds was observed in the ethyl acetate extract, whereas the analyses showed that the methanolic extract contained the highest concentration of flavonoids. The values for antioxidant activity ranged from 874,56 to 672,33 $\mu\text{g/ml}$. The highest IC_{50} values were observed in the ethyl acetate extract.

Key words: *Petrorhagia saxifraga*, Caryophyllaceae, phenolic compounds, antioxidant activity

¹ University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (mstankovic@kg.ac.rs).