

## ALCHEMILLA VULGARIS L. KAO POTENCIJALNI IZVOR PRIRODNIH ANTIOKSIDANATA

T. Boroja<sup>1</sup>, V. Mihailović<sup>1</sup>, J. Katanić<sup>1</sup>, N. Stanković<sup>1</sup>, M. Mladenović<sup>1</sup>

**Izvod:** Cilj ovog rada je bio ispitivanje antioksidativne aktivnosti, kao i količine ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u metanolnom ekstraktu biljke *A. vulgaris* L., kao potencijalnog izvora prirodnih antioksidanata. Ispitivani ekstrakt poseduje visok sadržaj ukupnih fenola (590,22 mg GA/g), dok je koncentracija flavonoida znatno manja (12,58 mg RU/g). Antioksidativna aktivnost je ispitivana *in vitro* DPPH i ABTS<sup>+</sup> metodom, a IC<sub>50</sub> vrednosti ukazuju da ispitivani ekstrakt pokazuje izuzetno visok stepen antioksidativne aktivnosti u poređenju sa referentnim fenolnim jedinjenjima, što ukazuje na mogućnost primene ekstrakta *A. vulgaris* u prehrambenoj industriji.

**Gljučne reči:** *Alchemilla vulgaris* L., antioksidativna aktivnost, fenolna jedinjenja, DPPH, ABTS<sup>+</sup>.

### Uvod

*Alchemilla vulgaris* L. je zeljasta biljka koja pripada porodici ruža (Rosaceae). U narodu je poznata pod nazivom virak, vrkuta ili gospin plašt. Kao droga se koristi nadzemni deo biljke u cvetu (*Alchemillae herba*), ređe samo listovi, koji imaju slabo gorak i opor ukus. Široko je rasprostranjena i raste na svežim livadama i pašnjacima, kao i pored potoka (Josifović, 1972.).

Virak je poznata biljka i često je korišćena u narodnoj medicini i farmaciji. Čaj i tinktura od virka se u tradicionalnoj medicini koriste kao adstringenti i blagi spazmolitici, pre svega za površinsko skupljanje tkiva (smiruje upale kože i sluzokože), zbog visokog sadržaja tanina. Upotrebljava se i kao sredstvo protiv krvarenja, kod dijareje i dizenterija, a u obliku čaja se često koristi i za smanjenje tegoba u toku menopauze, kao i kod bolnih, obilnih menstruacija i drugih oblika genitalnih tegoba (Treben, 2003.). Mladi listovi se mogu koristiti kao salata, budući da su dobar izvor vitamina C (130 mg%) (Stamenković, 2005.).

Fenolna jedinjenja i polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju ulogu u fiziološkim i morfološkim procesima same biljke, kao što su rast, reprodukcija i zaštita od patogena (Bravo, 1998.). Veliki broj lekovitih biljaka sadrži jedinjenja iz grupe fenola koja imaju izraženu antioksidativnu aktivnost (Rice-Evans i sar, 1995.), a pored toga, ispoljavaju i antiinflamatorno, antibakterijsko, antikancerogeno i mnoga druga delovanja. Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja se može objasniti pomoću mehanizma „hvatanja“ slobodnih radikala, kao što su ROS (engl. *reactive oxygen species*) i sprečavanja njihovog nastanka inhibicijom određenih enzima, helatizacijom

<sup>1</sup> Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (autor za kontakte: tatjanaboroja@gmail.com)

metala koji su uključeni u stvaranje slobodnih radikala, kao delovanjem na regulaciju i zaštitu samih antioksidanata (Dai i Mumper, 2010.).

Cilj ovog istraživanja je određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u biljnom ekstraktu, kao i *in vitro* ispitivanje antioksidativne aktivnosti metanolskog ekstrakta nadzemnog dela biljke *A. vulgaris*, kao potencijalnog izvora prirodnih antioksidanata.

## Materijal i metode rada

### Biljni materijal i priprema ekstrakta

Kao biljni materijal korišćen je komercijalno dostupan nadzemni deo biljke virak (*Alchemillae herba*) Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ (serijski broj 28310913). Ekstrakcija je rađena metodom maceracije. Biljni materijal (100 g) je ekstrahovan metanolom, pri čemu je ekstrakcija sa istim biljnim materijalom ponovljena tri puta sa pet puta većom zapreminom rastvarača u odnosu na masu usitnjene biljke, u trajanju od 24 h. Dobijeni ekstrakti su filtrirani, spojeni i koncentrovani pod vakuumom.

### Određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar, 1999.) i izražen je kao ekvivalent galne kiseline (mg GA/g ekstrakta). Ukupna količina flavonoida je određena metodom sa  $AlCl_3$ , koju su opisali Brighente i sar. (2007.), a rezultati su predstavljeni kao ekvivalenti rutina (mg RU/g ekstrakta). Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost merenja tri analizirana uzorka ( $\pm$  standardna devijacija).

### Antioksidativna aktivnost ekstrakta

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćene su DPPH „skevindžer“ i  $ABTS^+$  radikal katjon metoda.

### DPPH metoda

DPPH „skevindžer“ aktivnost određena je po metodi koju su opisali Kumarasamy i saradnici (2007.), pri kojoj se spektrofotometrijski prati reakcija između stabilnog radikala DPPH $\cdot$  (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) i uzorka čija se antioksidativna aktivnost ispituje. DPPH je rastvoren u metanolu u koncentraciji 80  $\mu$ g/ml. Napravljene su serije dvostrukih razblaženja uzoraka od osnovnog rastvora koncentracije 1 mg/ml. Rastvori uzoraka i DPPH $\cdot$  su zatim pomešani u jednakom odnosu (po 2 ml od svakog) i takva smeša je ostavljena u mraku na sobnoj temperaturi 30 minuta, nakon čega je očitana apsorbancija na 517 nm. Kao referentni standardi korišćeni su askorbinska kiselina, elaginska kiselina i kvercetin. DPPH $\cdot$  „skevindžer“ aktivnost je izračunata prema jednačini:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \cdot 100$$

A<sub>k</sub> je apsorbancija kontrole (umesto uzorka sadrži 2 ml metanola), a A<sub>u</sub> je apsorbancija ispitivanog uzorka.

### ABTS<sup>+</sup> radikal katjon metoda

Antioksidativna aktivnost je određivana i ABTS<sup>+</sup> radikal katjon metodom, koju su opisali Re i saradnici (1999.). ABTS<sup>+</sup> se dobija reagovanjem 7 mM vodenog rastvora ABTS sa 2,45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> u mraku na sobnoj temperaturi u periodu od 16 sati. Za merenje antioksidativne aktivnosti, rastvor dobijenog ABTS<sup>+</sup> se razblaži metanolom da bi se dobio rastvor čija je apsorbancija 0.7 na 734 nm. Zatim se napravi serija duplih razblaženja rastvora ekstrakta i referentnih standarda (elaginska kiselina, kvercetin i askorbinska kiselina) i 100 μL se pomeša sa 900 μL rastvora ABTS<sup>+</sup>. Smeša se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se meri apsorbancija na 734 nm. Procenat inhibicije je izračunat na isti način kao i kod DPPH metode.

Na osnovu dobijenih rezultata procenta inhibicije izračunate su IC<sub>50</sub> vrednosti, koje se definišu kao koncentracija ispitivanog uzorka koja redukuje koncentraciju DPPH· radikala i ABTS<sup>+</sup> radikala za 50%, izražena kao μg/ml ekstrakta, a izračunata je preko „dose-response“ sigmoidne krive postupkom nelinearne regresije, korišćenjem softvera za analizu podataka OriginPro 8. Svi rezultati su dati kao srednja vrednost tri merenja (± standardna devijacija).

### Rezultati istraživanja i diskusija

Količina ukupnih fenolnih jedinjenja u ispitivanom metanolnom ekstraktu nadzemnog dela biljke *Alchemilla vulgaris* je prikazana u ekvivalentima galne kiseline po gramu ekstrakta, dok je količina flavonoida izražena u ekvivalentima rutina po gramu ekstrakta. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida su dati u Tabeli 1. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da metanolni ekstrakt nadzemnog dela biljke *A. vulgaris* poseduje visok sadržaj ukupnih fenola (590,22 mg GA/g), dok je ukupna količina flavonoida znatno niža (12,58 mg RU/g).

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u metanolnom ekstraktu nadzemnog dela biljke *Alchemilla vulgaris*

Table 1. Total phenolic and flavonoid content of *Alchemilla vulgaris* aerial parts methanol extract

Ekstrakt Extract	Ukupni fenoli (mg GA/g) Total phenolic content (mg GAE/g dry extract)	Ukupni flavonoidi (mg RU/g) Flavonoid content (mg RUE/g dry extract)
<i>Alchemilla vulgaris</i>	590.22 ± 8.25	12.58 ± 1.69

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti biljnog ekstrakta su predstavljeni kao IC<sub>50</sub> vrednosti (μg/ml) i prikazani su u Tabeli 2. Antioksidanti u reakciji sa DPPH·

radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, a stepen dekolorizacije ukazuje na „skevindžer“ potencijal ispitivanog uzorka. Metanolni ekstrakt nadzemnog dela biljke *A. vulgaris* pokazuje izuzetno visoku sposobnost neutralizacije DPPH· radikala, budući da pri koncentraciji 5,40 µg/ml neutrališe 50% slobodnih radikala. Poređenjem rezultata sa IC<sub>50</sub> vrednostima za standardne antioksidante, ustanovljeno je da ispitivani uzorak pokazuje bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na referentna jedinjenja, pri čemu nema značajne razlike između IC<sub>50</sub> vrednosti za ispitivani ekstrakt i askorbinsku kiselinu. Ispitivani uzorak takođe pokazuje i visok stepen ABTS<sup>+</sup> „skevindžer“ aktivnosti, sa IC<sub>50</sub> vrednošću od 60,10 µg/ml, što je znatno niže u odnosu na IC<sub>50</sub> vrednosti referentnih antioksidanata kvercetina i elaginske kiseline.

Tabela 2. DPPH· i ABTS<sup>+</sup> „skevindžer“ aktivnost metanolnog ekstrakta *A. vulgaris*  
 Table 2. DPPH· and ABTS<sup>+</sup> scavenging activity of *A. vulgaris* methanol extract

Ekstrakt i standardi <i>Extract and standards</i>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	DPPH·	ABTS <sup>+</sup>
<i>A. vulgaris</i>	5,40±0,05	60,10±1,45
Elaginska kiselina	8,84±0,06	767,8±18,91
Kvercetin	17,49±0,12	228,8±11,62
Askorbinska kiselina	6,01±0,04	10,94±0,95

U mnogobrojnim istraživanjima biljnih ekstrakata utvrđeno je da je snažna antioksidativna aktivnost povezana sa velikim sadržajem fenolnih jedinjenja u ekstraktu (Zheng i sar, 2001.), te je izuzetan antioksidativni kapacitet ekstrakta biljke *A. vulgaris* očekivan, uzimajući u obzir količinu ukupnih fenola u uzorku.

### Zaključak

Ispitivanjem metanolnog ekstrakta nadzemnog dela biljke *A. vulgaris* utvrđeno je da ekstrakt poseduje visok sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, dok je količina flavonoida znatno niža. Rezultati dobijeni *in vitro* ispitivanjem antioksidativne aktivnosti predstavljaju dobru osnovu za dalja ispitivanja ove biljke, koja su neophodna kako bi se identifikovala jedinjenja prisutna u ekstraktu i procenila mogućnost njihove primene kao antioksidanata u prehrambenim proizvodima.

### Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta broj III 43004, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

### Literatura

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.

- Brighete I.M.C., Dias M., Verdi L.G., Pizzalatti M.G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology* 45, 156-161.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313-7352.
- Josifović, M. (1973). Flora SR Srbije IV. SANU, Beograd, 125-127.
- Kumarasamy Y., Byres M., Cox P.J., Jasapars M., Nahar L., Sarker S.D. (2007). Screening seed of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytotherapy Research* 21, 615-621.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Yang M., RiceEvans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology&Medicine* 26, 1231-1237.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology&Medicine* 20, 933-956.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent oxidants and antioxidants. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Stamenković V. (2005). Naše neškodljive lekovite biljke, NIGP TREND, Leskovac
- Treben M. (2003). Zdravlje iz Božije apoteke, MK Panonia, Novi Sad, 19.
- Zheng W., Wang S.Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5165-5170.

## **ALCHEMILLA VULGARIS L. AS A POTENTIAL SOURCE OF NATURAL ANTIOXIDANTS**

*T. Boroja*<sup>1</sup>, *V. Mihailović*<sup>1</sup>, *J. Katanić*<sup>1</sup>, *N. Stanković*<sup>1</sup>, *M. Mladenović*<sup>1</sup>

### **Abstract**

The aim of this study was to examine the total phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of the methanol extract of *Alchemilla vulgaris* aerial parts, as a potential source of natural antioxidants. The obtained results showed that extract has high total phenolic content (590,22 mg GAE/g), whereas flavonoid content was lower (12,58 mg RU/g). Antioxidant activity was determined *in vitro* by DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>+</sup> reagents. The IC<sub>50</sub> values of DPPH (5,40 µg/ml) and ABTS<sup>+</sup> scavenging capacities (60,10 µg/ml) of methanol extract showed that tested extract has extremely strong antioxidant activity.

**Key words:** *Alchemilla vulgaris* L., antioxidant activity, phenolic compounds, DPPH, ABTS<sup>+</sup>

---

<sup>1</sup>University of Kragujevac, Serbia (corresponding author: tatjanaboroja@gmail.com)