
LEK. SIROV.	God. XXXV	Broj 35.	Str. 113 – 119	Beograd 2015.
LEK. SIROV.	Vol. XXXV	No. 35.	Pp. 113 – 119	Belgrade 2015.

Originalni naučni rad – Original scientific paper *Rukopis primljen: 21.9.2015.*
UDC: 582.933:66.061.3; 615.322:582.933 *Prihvaćen za publikovanje: 28.9.2015.*
COBISS.SR-ID 220247820

**UTICAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA HEMIJSKI SASTAV I
ANTIOKSIDANTNO DELOVANJE EKSTRAKTA BILJKE
VERONICA OFFICINALIS L.**

Biljana Anđelković¹, Jelena Živković², Katarina Šavikin²

¹ Farmaceutsko-fizioterapeutska škola, Donska 25-2, Beograd, Srbija

² Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Koščuška 1, Beograd, Srbija

IZVOD

Veronica officinalis je biljka koja ima veliku primenu u tradicionalnoj medicini, ali njen sastav i delovanje nisu naučno ispitani. Iz tog razloga cilj ovog rada je da se identifikuje jedinjenje koje je u najvećoj meri zastupljeno u ekstraktu vrste *V. officinalis* i proveriti kako različiti uslovi ekstrakcije utiču na njegovu koncentraciju u ekstraktu, kao i na sadržaj ukupnih fenola. Rezultati su pokazali da je dominantno jedinjenje akteozid, a da primenom ultrazvuka, kao i povećanjem temperature, raste njegova koncentracija, kao i sadržaj ukupnih fenola. Antiradikalna aktivnost ekstrakta određena DPPH testom je u direktnoj korelaciji sa sadržajem akteozida i ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima.

Ključne reči: *Veronica officinalis*, ekstrakcija, ultrazvuk, antioksidantno delovanje.

UVOD

Tradicionalna medicina koristi biljnu vrstu *Veronica officinalis* L. (Plantaginaceae) u narodu poznatu kao razgon ili čestoslavica u lečenju bronhitisa, bronhijalne astme, kod nekih oboljenja gastrointestinalnog trakta, reumatizma i artritisa. Nedavne etnobotaničke studije zabeležile su i neke druge načine primene. U Italiji se koristi kao diuretik i za ublažavanje upalnih procesa na koži, u Španiji u lečenju ekcema, dok se u Austriji *V. officinalis* koristi interno u obliku čaja kod oboljenja nervnog, respiratornog i kardiovaskularnog sistema, kao i kod

poremećaja metabolizma. U Srbiji je zabeležena njena primena kao ekspektoransa u kombinaciji sa drugim biljnim vrstama, kao blagog diuretika i kod bolova u stomaku [1].

Vrsta *V. officinalis* raste na području srednje i severne Evrope, Azije i severne Amerike. Rasprostranjena je i na teritoriji Srbije, u vlažnim lišćarskim i četinarskim šumama [1].

Prethodna fitohemijska ispitivanja pokazala su da herba ove biljne vrste sadrži iridoide (veronikozid, katalpol, aukubin, veprozid, musaenozid, landrozid): flavonoide (derivate luteolina): triterpenske saponozide, tanine, i fenolkarbonske kiseline (hlorogensku i kafenu kiselinu) [2].

Tokom aerobnog metabolizma u organizmu dolazi do neprekidnog stvaranja slobodnih radikala. Kao nestabilni joni, oni mogu dovesti do oštećenja makromolekula kao što su DNK, lipidi i proteini. Ljudski organizam je razvio sistem borbe protiv slobodnih radikala koji uključuje enzimski sistem (superoksid-dismutaza, katalaza i Se-glutation peroksidaza): kao i neenzimske molekule (glutation, histadin-peptidi, melatonin i dr.) i hemijske elemente Zn i Se [3]. Ipak, usled ograničenosti ovih sistema, potrebno je unositi egzogene antioksidanse. Najznačajniji egzogeni antioksidansi su vitamin C, A i E, karotenoidi i polifenoli.

Antioksidantno delovanje biljnih ekstrakata u velikoj meri zavisi i od načina, odnosno efikasnosti ekstrakcije. Različite ekstrakcione tehnike primenjene na isti biljni material, sa istim ekstrakcionim sredstvom značajno variraju sadržaj aktivnih materija. Sa povećanjem interesa za biljnim lekovima raste i potreba za nalaženjem najoptimalnijih tehnika za ekstrakciju biljnih sirovina kako bi se dobili proizvodi ujednačenog kvaliteta. Razvoj modernih tehnika ekstrakcije kao što je ekstrakcija primenom ultrazvuka dovela je do značajnih prednosti u odnosu na konvencionalne tehnike u pogledu redukcije organskog rastvarača i smanjenja razgradnje uzorka [4].

Cilj rada je identifikacija dominantnog jedinjenja u 70% etanolno-vodenom ekstraktu vrste *V. officinalis*, kao i utvrđivanje efekta primene ultrazvuka i povišene temperature na stepen ekstrakcije ovog jedinjenja, kao i ukupnih polifenola.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

Za ekstrakciju je korišćen nadzemni deo u cvetu vrste *V. officinalis*, prikupljen na području Tare. Ekstrakti su pripremljeni sa 70% etanolom, u odnosu droga/ekstrakciono sredstvo 1:10 (w/v). Prvi ekstrakt dobijen je maceracijom na šejkeru tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi (Heidolph Unimax- 1010). Za preostala tri ekstrakta primenjen je ultrazvuk (Bandolin sonorex) i tri različite temperature (sobna, 50 °C i 70 °C) tokom 15 minuta.

Kvantitativna HPLC analiza

Visokoeffikasna tečna hromatografija (HPLC) izvedena je na aparatu Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) opremljenim detektorom sa diodnim nizom (DAD) model G1315B na koloni Agilent Zorbax SB – C18, veličine čestica 5 µm i dimenzija 150 × 4,6 mm [1].

Dobijeni ekstrakti *V. officinalis* su profiltrirani kroz membranski filter (0,45 µm) pre HPLC analize. Kao mobilna faza korišćena je 1%-na ortofosforna kiselina u vodi (faza A) i acetonitril (faza B). Injekciona zapremina uzorka je bila 5 µl, a eluiranje je vršeno gradijentom po sledećoj šemi: 0 – 5 min, 2 – 10% B; 5 – 10 min, 10 – 15% B; 10 – 30 min, 15% B, 30 – 32 min, 15 – 18% B; 32 – 42 min, 18% B; 42 – 50 min, 18 – 25% B; 50 – 55 min, 25 – 40% B; 55 – 60 min, 40 – 70% B; 60 – 63 min, 70 – 100% B. Brzina protoka iznosila je 1 ml/min, a UV apsorbanacija je merena na 204, 270 i 330 nm.

Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u 70% etanolnom ekstraktu vrste *V. officinalis* je određivan spektrofotometrijski na bazi reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom [5]. U 100 µl tečnog ekstrakta je dodato 750 µl razblaženog (1:10) FC reagensa. Pet minuta kasnije, dodato je 750 µl natrijum-karbonata (60 mg/ml). Nakon 90 min inkubacije na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbanacija na 725 nm. Za kalibraciju standardne krive korišćena je galna kiselina (0-100 mg/l). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po gramu suve mase biljke. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Antioksidantna aktivnost

Antioksidantna aktivnost u 70% etanolnom ekstraktu *V. officinalis* je merena spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa 2,2-difenil-1-pokrilhidrazil (DPPH) [6]. Početni ekstrakt je razblažen u odnosu 1:50 da bi bilo moguće izmeriti apsorbanču nakon dodatka rastvora DPPH. Uzete su alikvoti od 20 µL, 40 µL 60 µL 80 µL 100 µL, svakog od 4 uzorka, u šta je dodato 500 µL rastvora DPPH, a zatim dopunjeni do 2 mL metanolom. Apsorbanča je merena na talasnoj dužini od 517nm. Rezultati su izraženi kao koncentracija ekstrakta (IC₅₀) koja smanjuje apsorbanču DPPH za 50% u odnosu na kontrolu koju čini rastvor DPPH i metanol.

REZULTATI I DISKUSIJA

Sadržaj akteozida

Primenom HPLC tehnike i metode eksternog standarda fenolno jedinjenje akteozid indetifikovano je kao dominantno u ekstraktu vrste *V. officinalis*. Po svojoj strukturi ovaj biljni metabolit pripada derivatima fenolnih kiselina, tačnije

feniletanoidnim glikozidima i prema dostupnim literaturnim podacima karakterističan je za vrste roda *Veronica* [7].

U ovom ispitivanju najveći sadržaj akteozida dobijen je ekstrakcijom uz primenu ultrazvuka na temperaturi od 70⁰ C (Tabela 1): dok je najmanja količina nađena u ekstraktu pripremljenom maceracijom. Može se zaključiti da povećanje temperature i primena ultrazvuka imaju pozitivan uticaj na proces ekstrakcije aktozida iz vrste *V. officinalis*.

Uticaj ultrazvuka i temperature na ekstrakciju ukupnih polifenola

Korišćenje ultrazvuka tokom ekstrakcije pokazuje značajan efekat i na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu. U prethodno objavljanim radovima na ovu temu kao najverovatniji mehanizam delovanja ultrazvuka ističe se intenziviranje prenosa mase i lakše prodiranje rastvarača u ćelije biljnog materijala. Sa druge strane, kod klasične maceracije mehanizam uključuje normalnu difuziju kroz ćelijske zidove [8].

Veći sadržaj polifenolnih jedinjenja je dobijen za duplo kraće vreme (15 minuta) uz primenu ultrazvuka u odnosu na maceraciju kao konvencionalnu tehniku ekstrakcije (30 minuta). Ušteda energije koja se postiže uštedom u vremenu je veoma značajna za eventualno industrijsko dobijanje ekstrakta vrste *Veronica officinalis*.

Što se tiče odnosa količine ekstrahovanih polifenola uz primenu ultrazvuka na sobnoj temperaturi i na 50⁰ C, ne primećuje se značajna razlika. Sa druge strane, značajno veća količina polifenola se nalazi u ekstraktu koji je dobijen uz primenu ultrazvuka i na temperaturi od 70⁰C. Ovo se može objasniti opadanjem viskoziteta ekstrakcionog sredstva sa povećanjem temperature, što povećava stepen penetracije u biljni materijal i samim tim koncentraciju polifenola u ekstraktu.

Antioksidantna aktivnost vrste *Veronica officinalis*

Antioksidantni potencijal i ranije je prikazan za *Veronica* vrste [9-11] i jedinjenja izolovana iz njih [12, 13].

U okviru sprovedenog ispitivanja ekstrakti dobijeni primenom ultrazvuka pokazuju veći antioksidantni potencijal u odnosu na ekstrakte dobijene maceracijom, što je u korelaciji sa sadržajem akteozida u njima. Ipak, dobijene IC₅₀ vrednosti su značajno niže u odnosu na vrednosti prethodno dobijene za vrste *V. teucrium*, *V. jacquinii* i *V. urticifolia* koje su bile niže od 50 µg/mL [11].

Nekoliko *in vitro* ispitivanja je pokazalo da fenilpropanoidi kojima pripada i akteozid predstavljaju snažne antioksidanse zahvaljujući sposobnosti inhibicije oksidacije nisko zasićenih lipoproteina putem različitih mehanizama kao što su hvatanje slobodnih radikala i kompleksiranje metalnih jona, što je povezano sa prisustvom polifenola i feniletanoidne grupe u njihovoj strukturi. Chen i saradnici [14] su pokazali da sa porastom koncentracije akteozida, odnosno ukupnih fenola,

raste antiradikalna aktivnost ekstrakta. Osim toga, brojna su ispitivanja čiji rezultati svedoče o snažnoj korelaciji sadržaja ukupnih fenola i antioksidantne aktivnosti [15].

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola, akteozida i stepen inhibicije DPPH radikala za ispitivane *V. officinalis* ekstrakte

Table 1. Total phenolic content, acteoside content and anti-DPPH activity for tested *V. officinalis* extracts

Uzorak* Sample*	Ukupni fenoli Total phenolic content (mg GAE/sm)	Sadržaj akteozida Acteoside content (mg/g sm)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	16,28±1,35	6,24±0,57	155,52±8,23
2	18,57±1,68	7,36±0,44	146,71±6,12
3	18,77±2,11	8,17±0,62	112,83±7,16
4	24,30±2,91	8,51±0,81	106,42±6,83

* Uzorak 1 - ekstrakt dobijen maceracijom na sobnoj temperaturi; uzorak 2 - ekstrakt dobijen uz primenu ultrazvuka na sobnoj temperaturi; uzorak 3 - ekstrakt dobijen uz primenu ultrazvuka na 50 °C; uzorak 4 - ekstrakt dobijen uz primenu ultrazvuka na 70 °C.

* Sample 1 – extract obtained by maceration at room temperature; sample 2 - extract obtained by applying ultrasound at room temperature; sample 3 - extract obtained by applying ultrasound at 50 °C; sample 4 - extract obtained by applying ultrasound at 70°C.

ZAKLJUČAK

Primena ultrazvuka i povećanje temperature tokom ekstrakcije nadzemnog dela u cvetu vrste *V. officinalis* značajno povećavaju količinu ekstrahovanog akteozida, kao i količinu ukupnih fenola u ekstraktu. Njihova veća koncentracija u ekstraktu povećava i njegov antioksidantni potencijal.

ZAHVALNICA

Autori zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na podršci i finansiranju u okviru projekta III46013.

LITERATURA

1. J. Živković (2014): Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih vrsta roda *Veronica* L. (Plantaginaceae). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet.
2. PDR for herbal medicines (2004): Thomson PDR, 3th edition, Montvale, New Jersey.

3. S. Ljubisavljević (2014): Protektivno dejstvo modulatora oksidativnog i nitrozativnog stresa u neuroinflamaciji – eksperimentalna i klinička studija. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet.
4. V. Kothari, A. Gupta, M. Naraniwal (2012): Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *Journal of Natural Remedies*, **2**: 162-173.
5. Y. S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, B. D. Oomah (1998): Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**: 4113-4117.
6. M. Cuendet, K. Hostettmann, O. Potterat, W. Dyatmiko (1997): Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, **80**: 1144-1152.
7. G. Crişan, M. Tămas, V. Miclăuş, T. Krusz, V. Sandor (2007): A comparative study of some *Veronica* species. *Revista Medico-Chirurgicala A Societatii de Medici si Naturalisti Din Iasi*, **111**: 280-284.
8. A. Zdravković, Lj. Stanojević, M. Stanković, M. Cakić, V. Nikolić, Lj. Nikolić, D. Ilić (2012): Uticaj operativnih uslova i tehnika ekstrakcije na prinos, kinetiku i sastav vodenootanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.): Savremene tehnologije, **1**: 30-37.
9. A. Ertaş, M. Boga, M. Kizil, B. Ceken, A. C. Goreu, N. Hasimi, S. Demirci, G. Topcu, U. Kolak (2015): Chemical profile and biological activities of *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinerea*. *Pharmaceutical Biology*, **53**: 334-339.
10. L. Yin, L. Wei, R. Fu, L. Ding, Y. Guo, L. Tang, F. Chen (2014): Antioxidant and hepatoprotective activity of *Veronica ciliata* Fisch. extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Molecules*, **19**: 7223-7236.
11. J. Živković, T. Čebović, Z. Maksimović (2012): *In vivo* and *in vitro* antioxidant effects of three *Veronica* species. *Central European Journal of Biology*, **7**: 559-568.
12. S. R. Jensen, C. H. Gotfredsen, U.S. Harput, I. Saracoglu (2010): Chlorinated iridoid glucosides from *Veronica longifolia* and their antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, **73**: 1593-1596.
13. D. Ahn, S. I. Lee, J. H. Yang, C. H., Cho, Y. H. Hwang, J. H. Park, D. K. Kim (2011): Superoxide radical scavengers from the whole plant of *Veronica peregrina*. *Natural Product Sciences*, **17**: 142-146.
14. C. H. Chen, Y. S. Lin, M. Y. Chien, W. C. Hou, M. L. Hu (2012): Antioxidant and antihypertensive activities of acteoside and its analogs. *Botanical Studies*, **53**: 421-429.
15. C. Anesini, G. E. Ferrara, R. Filip (2008): Total Polyphenol Content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 9225-9229.

IMPACT OF EXTRACTION PROCEDURE ON CHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDANT EFFECT OF *VERONICA OFFICINALIS* EXTRACT

Biljana Anđelković¹, Jelena Živković², Katarina Šavikin³

¹ School for Pharmacy and Physiotherapy, Donska 25-2, Belgrade, Serbia

² Institute for Medicinal Plants Research “Dr Josif Pančić“, Tadeuša Košćuška 1, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Veronica officinalis is plant species used in traditional medicine worldwide, but its effects have not been investigated so far. Consequently, the aim of this research was to identify dominant compound in *V. officinalis* extracts and to determine the effect of ultrasound and extraction temperature on the content of that compound and total phenolic content. Moreover we investigated the correlation between the concentration of dominant compound and antiradical activity of tested extracts. The main compound in extracts was acteoside. Higher amount of total phenolics and acteoside were obtained using ultrasound-assisted extraction technique and higher temperatures. DPPH assay, which is used for measuring antiradical potential, showed that concentration of acteoside, as well as concentration of polyphenolic compounds, is directly correlated with antioxidative potentiality tested extracts.

Key words: *Veronica officinalis*, extraction, ultrasound, antiradical potential.