



Determination of antioxidant activity and phenolic content in aqueous and ethanol-aqueous extracts (*Achillea millefolium*)

Huska Jukic¹, Samira Dedic², Aida Dzaferovic²

¹University of Bihac, Faculty of Health Studies Nositelja hrvatskog trolista 4, 77000 Bihac, BiH, huskaj037@gmail.com

²University of Bihac, Faculty of Biotechnology, Kulina Bana 2, 77000 Bihac, BiH, samira.dedic@yahoo.com



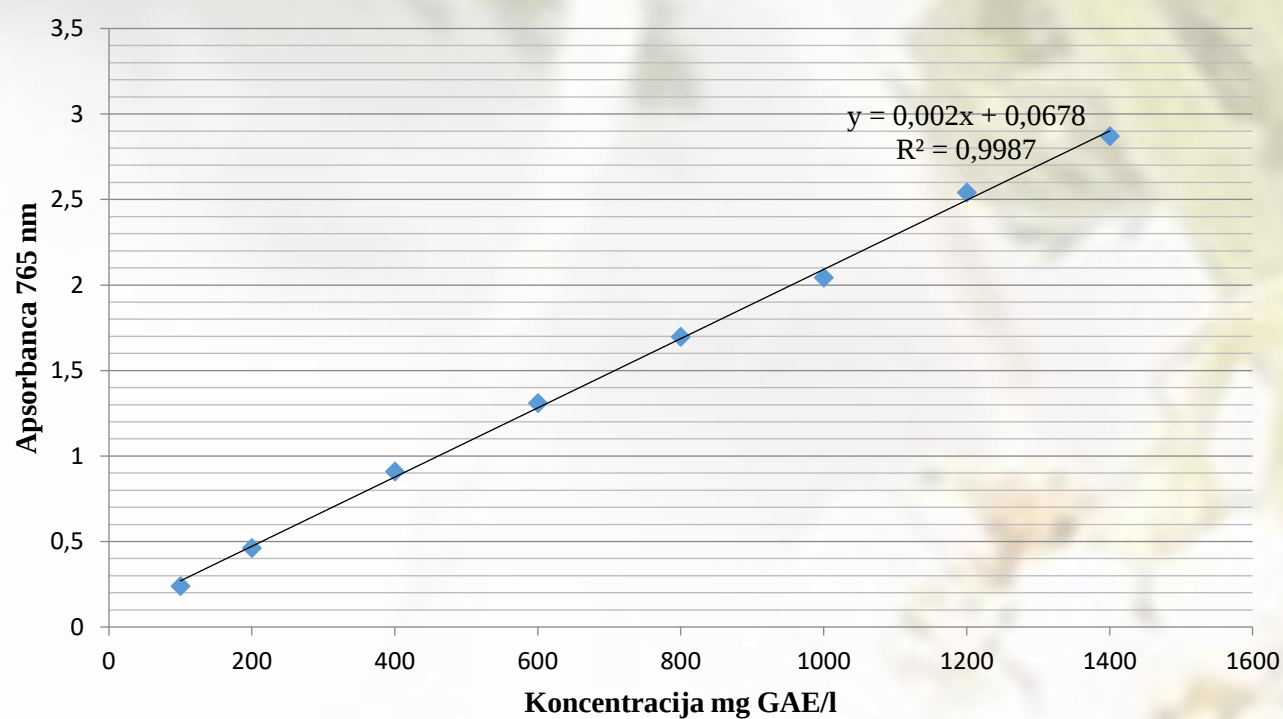
Achillea millefolium is a medicinal plant that has wide application in the treatment of various diseases. It is also called yarrow and milfoil grass, and it is a source of various nutrients and biologically active substances. This plant has been used in traditional medicine as an antibacterial, against infections, in wound healing, as a sedative and diuretic. The essential oil of flowers and leaves contains achilles and azulene which have anti-inflammatory properties. In this work, the antioxidant activity of DPPH and FRAP method was determined. The results clearly showed that rabbit extract (*Achillea millefolium*) is a rich source of polyphenols and has high antioxidant properties.

Key words: antioxidant activity, extract, rabbit, polyphenols

MATERIJAL I METOD RADA

Prije procesa ekstrakcije, biljni materijal se sušio na zraku, a zatim je samljeven u fini prah pomoću laboratorijskog mlina IKA Tube Mill 100 control. Homogenizovan uzorak je podvrgnut tehnikama ekstrakcije maceracija na sobnoj temperaturi sa destilovanom vodom i vodenim rastvorima etanola (30 %, 50 % i 70 % v/v etanolom). U vremenskom razdoblju od 12 i 24 sata, 6 uzoraka je macerirano u uvjetima bez prisutnosti svjetla, dok je preostalih 6 uzoraka macerata bilo izloženo izvoru danje svjetlosti.

U pripremljenim uzorcima ukupni fenoli određeni su Folin-Ciocalteu-ovom metodom (Dewanto i sar., 2002.), a rezultati su preračunati iz kalibracijske krivulje galne kiseline (graf 1). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Excel, pri čemu se na apscisu nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu vrijednosti apsorbancija koje su izmjerene na spektrofotometru photoLab 6600 UV-VIS WTW pri 765 nm. Otpipetirano je u epruvetu 0,2 mL uzorka, 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 8 mL otopine natrij karbonata. Nakon što je uzorak odstojao 2 sata na sobnoj temperaturi mjerena je apsorbancija.



Graf 1.

Standardni dijagram za određivanje ukupnih fenola

Rezultati se izražavaju kao fenoli ekvivalentni galnoj kiseleni mg GAE/g.

$$y = 0,002x + 0,0678$$

$$R^2 = 0,9987$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm,

x – koncentracija galne kiseline (mg/L),

R² – koeficijent determinacije

Tablica 1. Ukupni sadržaj fenola vodeni ekstrakata i etanol-vodenih ekstrakata (*Achillea millefolium*) izražen u mg galne kiseline/g suhe tvari.

	Otapalo	Ekstrakcija maceracija		Ekstrakcija maceracija	
		12 h	24 h	12 h	24 h
<i>Achillea millefolium</i>		SD (n=6)			
		MT	MS	MT	MS
	Voda	87.54	76.34	94.55	85.22
	30 % etanol	96.88	91.39	104.24	101.75
	50 % etanol	116.94	107.26	120.27	109.99
	70 % etanol	107.23	104.11	109.19	108.56

Tablica 3. Antioksidativno djelovanje vodeni ekstrakata i etanol-vodenih ekstrakata (*Achillea millefolium*) mjereno FRAP i DPPH testom

	Uzorak	FRAP test	DPPH test
		μmol Trolox/mg uzorka	IC 50(μg/ml)
<i>Achillea millefolium</i>		SD (n=6)	
	Voda	10.27	126.04
	30 % etanol	12.36	98.34
	50 % etanol	21.28	40.26
	70 % etanol	17.24	39.54

ZAKLJUČAK

Naši rezultati su otkrili da uzorci macerirani u tami sadrže veću koncentraciju ukupnih fenola, a samim time imaju i jaču antioksidativnu aktivnost jer ne dolazi do razgradnje biološki aktivnih molekula u koje se ubrajaju i fenolni spojevi. Uzorak koji je maceriran u tami sa 50 % -om otopinom etanola imao je najveću koncentraciju ukupnih fenola 120.27 mg/g suhe tvari. Rezultati su također pokazali da se primjenom 50%-tne vodene otopine etanola dobije najviši ekstrakcijski sadržaj ukupnih flavonoida.

Stolisnik (*Achillea millefolium*) je višegodišnja biljka koja raste po livadama, pašnjacima, poljima i vrtovima, a njegovi ljekoviti pripravci djeluju protuupalno, spazmolitski, antimikrobno i antifugalno, koristi se za otklanjanje tegoba kao što su dispeptičke tegobe, grčevi u želučano-probavnom traktu i kod kožnih bolesti (Kuštrak, 2005). Biljka koja je široko rasprostranjena i pripada porodici glavočika (*Asteraceae*), a obuhvata više od 100 vrsta rasprostranjenih u Evropi, Severnoj Americi, južnoj Australiji i severnoj Aziji (Lakshmi i sar., 2011). Ime je dobila po Ahilu, heroju Trojanskog rata koji je pomoću ove biljke zaustavio krvarenje i iscjelio rane Heraklovom sinu Telefusu, dok je millefolium dobio od riječi mille što u prevodu znači hiljadu i folium - list (Benedek & Kopp, 2007).

Smatra se da visok sadržaj ukupnih fenola obično znači i vrlo dobru antioksidativnu aktivnost određene biljne vrste (Kahraman i sar.,2013). Pozitivan uticaj ljekovitog bilja se objašnjava prisustvom bioaktivnih jedinjenja, sekundarnih metabolita u biljkama, i njihove uloge u prevenciji različitih degenerativnih bolesti kao što su kanceri, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Od biljaka roda *Achillea* najčešće je istraživana *A. millefolium* s. l., kao najrasprostranjenija, pa su stoga najbolje proučene biološke aktivnosti njenih flavonoida, među kojima su najzastupljeniji apigenin, luteolin i kvercetin, te njihovi glukozidi, korištenjem različitih in vitro i in vivo testova. Među flavonoidnim heterozidima pronađeni su monoglukozidi (uglavnom O-glukozidi, C-glukozidi i O-glukuronidi) i diglukozidi (O-diglukozidi, C-diglukozidi, O-rutinozidi) (Jokić i sar., 2017). Fitokemijski profil *A. millefolium* pokazuje prisutnost organskih kiselina (uglavnom oksalne, kininske i limunske), masnih kiselina (sa linolenskom i palmitinskom kao glavnima) i tokoferola (posebno, γ-tokoferol) (Gharibi i sar., 2013; Dias i sar., 2013; Benedek i sar., 2007; Vitalini i sar., 2011). Čaju od hajdučke trave ima koncentraciju flavonoida dovoljno visoku da ispolji spazmolitički efekat u crijevima, koji je uglavnom uzrokovan blokadom kalcijumovih ulaznih struja, ali i antagonističkim efektima medijatora (Lemmens-Gruber i sar., 2006). Kvalitativna i kvantitativna istraživanja bioaktivnih komponenta iz biljnih materijala uveliko ovisi o odabiru adekvatne ekstrakcijske metode kao i njene adekvatne primjene (Azmir i sar., 2013).

Za određivanje ukupnih flavonoida korištena je modificirana kolorimetrijska metoda s AlCl₃ (Khelifi i sar., 2011), a za izradu baždarnog pravca korištena je standardna otopina kvercetina.

FRAP je kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti koja se temelji na reakciji redukcije žuto obojanog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Fe³⁺ ioni iz Fe(III) (TPTZ)₂ kompleksa reduciraju se u Fe²⁺ ione u otopini 2,4,6-tripiridi-s-triazina dajući plavo obojani produkt koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie i Strain, 1999). FRAP test: 0,1 ml ispitivanih ekstrakata dodano je u 3 ml FRAP reagensa (0,3 M) acetatni pufer, 10 mM 2,4,6- tripiridil-s-triazin (TPTZ), 20 mM FeCl₃ × 6H₂O (10: 1: 1; v/v/v) i ostavljeno da stoji 10 min na 37°C u mraku. Apsorbancija mjerena je na 593 nm. (Benzie i Strain, 1996).

DPPH test: (2,2-difenil-1-pikrizilhidrazil) jedan je od najstabilnijih organskih dušikovih radikala s maksimalnom apsorpcijom u UV-VIS na 517 nm. DPPH radikal je stabilan dušikov radikal čija je otopina tamno ljubičaste boje, a dodatkom antioksidansa otopina blijedi jer se slobodni radikal reducira u svijetlo-žuti difenilpikrilhidrazin, što se spektrofotometrijski prati preko pada apsorbance na 517nm opisano (Jeong i sar., 2010) sa malom modifikacijom, u je 500 μl ekstrakta različite koncentracije dodano je u 1000 μl svježe pripremljen rastvor DPPH (0,5 mM) u metanolu. Uzorak je inkubiran 30 minuta na 37°C u mraku. Smanjenje apsorbancije pri 517 nm izmjerene su pomoću spektrofotometra photoLab 6600.

REZULTATI

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima određen je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Dodatkom reagensa mijenja se obojenje otopine iz žuto u plavo, a intenzitet nastalog obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 760 nm. Srednje vrijednosti ukupnih fenola u zavisnosti od primjenjenog otapala i vremena ekstrakcije maceracije na sobnoj temperaturi prikazane su u Tablici 1. Iz tabele možemo vidjeti da ekstrakt *Achillea millefolium* dobijen maceracijom na sobnoj temperaturi sa 50 % etanolom u vremenu od 24 h pokazuje najveći ukupni sadržaj fenola od ispitivanih uzoraka.

Tablica 2. Ukupni sadržaj flavonoida vodeni ekstrakata i etanol-vodenih ekstrakata (*Achillea millefolium*) izražen u mg kvercetina/g suhe tvari.

	Otapalo	Ekstrakcija maceracija		Ekstrakcija maceracija	
		12 h	24 h	12 h	24 h
<i>Achillea millefolium</i>		SD (n=6)			
		MT	MS	MT	MS
	Voda	29.15	25.36	29.54	28.31
	30 % etanol	32.29	30.36	34.86	32.71
	50 % etanol	38.96	36.98	40.22	36.42
	70 % etanol	34.59	33.58	36.39	35.90

Macerati *Achillea millefolium* kod kojih je proces maceracije proveden u tami, pokazuju veću koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na macerate koji su bili izloženi danjem svjetlu. Pretpostavljamo da je sadržaj ukupnih fenola veći zbog toga što se u tami sprječavaju neželjene reakcije razgradnje fenolnih spojeva.

LITERATURA

- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J. Food Eng.117, 426-436.
- Benedek, B., Kopp, B. (2007). Achillea millefolium L. sl revisited: recent findings confirm the traditional use. Wien. Med. Wochenschr., 157(13-14), 312-314.
- Benedek, B., Gjoncaj, N., Saukel, J., Kopp, B., Chem. Biodivers. 4 (2007) 849– 857
- Benzie F, Srain J., (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. Anal. Biochem., 239, p. 70-76.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Lui, R.H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J. Agric. Food Chem., no. 50., pp: 3010-3014.
- Gharibi, S., Tabatabaei, B.E.S., Saeidi, G., Golic, S.A.H., Talebi, M., Ind. Crop. Prod. 50 (2013) 154–158
- Dias, M.I., Barros, L., Due`nas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., Food Chem. 141 (2013) 4152–4160
- Jeong J-H, Jung H, Lee S-R, et al. (2010). Antioxidant, anti-proliferative and antiinflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. Food Chem. 2010;123:338-44.
- Jokić Nevena, Ljiljana Topalić-Trivunović, Branka Rodić-Grabovac, (2017). Flavonoidna jedinjenja biljaka roda Achillea L. i njihova biološka aktivnost. Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske, 13 (2017) 21-29.
- Kahraman, S., R. Yanardag, (2013). Antioxidant activity of ethanolic extract from Rumex cristatus DC. International Journal of Electronics; Mechanical and Mechatronics Engineering, 2 (4) (2013) 319–326.
- Khelifi D, Hamdi M, El Hayouni A, Cazaux S, Souchard JP, Coudere F, Bouajila J. (2011). Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of Globularia alypum L. (Globulariaceae) leaves. Molecules, 2011, 16, 10592-10603.
- Kuštrak D. (2005). Farmakognozija-fitofarmacija.Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, 341-344, 408-409.
- Lakshmi, T., Geetha, R., Roy, A., Kumar, S.A. (2011). Yarrow (Achillea millefolium linn). A herbal medicinal plant with broad therapeutic use-A review. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 9, 136-141.
- Lemmens-Gruber, R., Marchart, E., Rawnduzi, P., Engel, N., Benedek, B. & Kopp, B. (2006). Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of Achillea millefolium s.l. on isolated guinea-pig ilea. Arzneimittelforschung, 56 (8), 582-588. DOI: 10.1055/s-0031-1296755.
- Vitalini, S., Beretta, G., Iriti, M., Orsenigo, S., Basilico, N., Dall'Acqua, S., Iorizzi, M., Fico, G., Acta Biochim. Pol. 58 (2011) 203–212