



## Antioksidativna svojstva fenolnih komponenata semena sočiva (*Lens culinaris* L.)

Jelena Dragišić Maksimović · Branka Živanović · Vuk Maksimović ·  
Vesna Hadži-Tašković Šukalović

primljeno / received: 14.04.2010. prerađeno / revised: 24.05.2010. prihvaćeno / accepted: 26.05.2010.  
© 2010 IFVC

**Izvod:** U ovom radu su ispitivana antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata semena sočiva (*Lens culinaris* L.). Skromni literaturni podaci ukazuju na prisustvo različitih polifenola u semenu sočiva, koji poseduju bioaktivne osobine zahvaljujući sposobnosti da uklanjaju aktivne kiseonične forme. Kvalitativna i kvantitativna variranja fenola u semenu posledica su razlika između sorti, uslova gajenja/rastenja i primenjenih analitičkih metoda. U semenu sočiva određen je sadržaj i sastav fenola i utvrđen pojedinačni doprinos identifikovanih komponenata ukupnom antioksidativnom kapacitetu. HPLC analizom je identifikovano sedam fenolnih supstanci. Njihova antioksidativna svojstva, određena kao sposobnost uklanjanja DPPH radikala imaju sledeći redosled opadajuće efikasnosti: galna kiselina > epikatehin > katehin > protokatehuinska kiselina > rutin > p-kumarna kiselina > umbeliferon. Veliki antioksidativni kapacitet sočiva ukazuje na sposobnost sprečavanja nepoželjnih oksidativnih reakcija izazvanih slobodnim radikalima, pa konzumiranje sočiva može da ima povoljan efekat sa aspekta zdravstvene koristi za ljudski organizam.

**Cljučne reči:** antioksidativni kapacitet, fenolna jedinjenja, sočivo, ukupni fenoli

### Uvod

Fenolna jedinjenja učestvuju u esencijalnim fiziološkim procesima u biljkama kao što su npr. rastenje, reprodukcija, odbrana od abiotičkih i biotičkih stresova, itd. Prisutna su u svim biljnim organima zbog čega su neizostavna u ljudskoj ishrani. Zahvaljujući antioksidativnoj, antimutagenoj i antiradikalnoj aktivnosti, kao i konstataciji da poseduju potencijalni zdravstveno-korisni efekat (Bravo 1998), u skorije vreme se vrše aktivna istraživanja u smislu identifikacije i kvantifikacije individualnih fenola u namirnicama i utvrđivanja njihovog antioksidativnog kapaciteta. Antioksidativna aktivnost se ostvaruje posredstvom nukleofilnih fenolnih grupa za koje se vezuju slobodni radikali, dok pojedina fenolna jedinjenja mogu da imaju ulogu helatora jona metala zadržavajući antiradikalnu aktivnost i nakon formiranja kompleksa sa metalom (Afanas'ev et al. 1989).

Visok sadržaj polifenolnih jedinjenja kao glavnih antioksidativnih konstituenata smatra se najznačajnijom zdravstveno-zaštitnom karakteri-

stikom leguminoza (zrnastih mahunarki) u koje spada i sočivo (Bhatty 1995). Seme sočiva sadrži različita fenolna jedinjenja koja predstavljaju važnu grupu bioaktivnih sastojaka hrane koji mogu da spreče razvoj nekih hroničnih bolesti izazvanih oksidativnim stresom (López-Amorós et al. 2006). Kvalitativna i kvantitativna variranja polifenolnih jedinjenja u semenu različitih sorti sočiva se objašnjavaju kao posledica genetskih razlika, uslova gajenja/rastenja i čuvanja, kao i primenjenih analitičkih metoda. Za potpuno razumevanje značaja polifenola u ljudskoj ishrani neophodno je detaljno ispitati njihovu (bio)dostupnost, mehanizam delovanja i moguću sinergiju sa drugim sastojcima hrane.

Sem polifenola kao bioaktivnih antioksidanasa, sočivo je odličan izvor proteina i rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana. Takođe sadrži značajne količine vitamina i minerala. Proizvodnja sočiva koje se koristi za ljudsku ishranu najveća je u Aziji i na Bliskom Istoku (60%), u Severnoj Americi (8%), a u Evropi svega 4% od ukupne godišnje svetske proizvodnje (Fernandez-Orozco et al. 2003). Upotreba sočiva u ishrani kod nas je zapostavljena usled tradicionalnog pristupa ishrani i neobaveštenosti

J. Dragišić Maksimović (✉) · B. Živanović · V. Maksimović · V. Hadži-Tašković Šukalović  
Institut za multidisciplinarna istraživanja, Kneza Višeslava 1, 11030 Beograd, Srbija  
e-mail: draxy@imsi.rs

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (143016B i 143020B).

potrošača. Javna afirmacija značaja fenolnih jedinjenja i njihove zdravstvene korisnosti za ljudski organizam može doprineti širenju upotrebe sočiva u ishrani.

Cilj naših istraživanja je bio ispitivanje sadržaja i sastava fenola, kao i određivanje antioksidativnog kapaciteta semena sočiva. Fenolne komponente su identifikovane i kvantifikovane HPLC metodom, a antioksidativni kapacitet pojedinačnih fenola je određen merenjem antiradikalne aktivnosti ABTS i DPPH testom i upoređen sa snažnim antioksidansom - askorbinskom kiselinom. U radu je diskutovan doprinos pojedinih fenolnih supstanci ukupnom antioksidativnom kapacitetu sočiva.

### Materijal i metod rada

**Ekstrakcija** fenolnih komponenata iz semena sočiva je izvršena u 80% metanolu u odnosu 1:10 (sveža masa semena sočiva:metanol) pomoću sistema za pripremu uzoraka *Fast Prep-24* (M.P. Biomedicals, Irvine, California, USA). Homogenati su centrifugirani 15 minuta na 10.000  $\times g$ , a zatim su supernatanti filtrirani kroz 0,22-mikrometerski filter, nakon čega su korišćeni za dalje analize.

**Antioksidativni kapacitet** semena sočiva je ispitivan ABTS testom po metodi Arnao et al. (1999). Reakciona smeša se sastojala od 2 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), 15  $\mu M$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,25  $\mu M$  HRP (peroksidaza iz rena) u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,5. Apsorbancija je merena na 734 nm (UV-vis 2501 PC Shimadzu, Kyoto, Japan) na 25°C. Smanjenje apsorbancije u vremenu, nastalo kao posledica dodavanja ispitivanog uzorka u reakcionu smešu, jeste mera uklanjanja ABTS radikala generisanih peroksidazom. Rezultati su računati pomoću standardne prave konstruisane dodavanjem različitih koncentracija L-askorbinske kiseline (0,1-0,8 mM). Ukupna antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka je izračunata kao količina ekvivalenata askorbinske kiseline u miligramima po gramu sveže mase sočiva.

**Antioksidativna aktivnost** je merena kao sposobnost ekstrakta da uklanja slobodne radikale 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH•) (Duan et al. 2006). 1 ml 0,2 mM metanolskog rastvora DPPH je mešan sa istom zapreminom razblaženog metanolskog ekstrakta sočiva ili metanolskog rastvora komercijalnih fenolnih supstanci. Posle 30 min inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, čitana je apsorbancija rastvora na 517 nm. Optimalna količina uzorka koji se analizira treba da smanjuje početnu apsorbanciju rastvora za oko 50%. Rezultati su prikazani kao IC<sub>50</sub> vrednost koja je definisana kao količina uzorka koja

smanjuje apsorbanciju DPPH radikala za 50% u datim uslovima. Manja IC<sub>50</sub> vrednost predstavlja veću antiradikalnu aktivnost. L-askorbinska kiselina je služila kao pozitivna kontrola, pa su antiradikalne vrednosti prikazane i kao ekvivalent askorbinske kiseline (EAK) i odnose se na količinu askorbinske kiseline koja odgovara jedinici mase uzorka.

**Sadržaj ukupnih fenola** u ekstraktima je određen spektrofotometrijski (UV-vis 2501 PC Shimadzu, Kyoto, Japan) Folin-Ciocalteu metodom (Singleton & Rossi 1965). U alikvot uzorka je dodato 0,25 ml Folinovog reagensa, a nakon 3 minuta 1,25 ml 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dobijena smeša je inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je merena apsorbancija na 724 nm. Rezultati su izračunati pomoću standardne prave konstruisane sa galnom kiselinom u opsegu 0,1-2 mM i izraženi u miligramima ekvivalenata galne kiseline (EGK) po gramu sveže mase semena sočiva.

**HPLC** analiza fenolnih jedinjenja izvedena je na Waters hromatografskom sistemu (binarna 1525 pumpa, 717+ autosampler, 2996 Diode Array detektor), a razdvajanje je izvršeno na Waters Symmetry RP C-18 hromatografskoj koloni (125 x 4 mm). Korišćena je gradijentna elucija (faza A, 0,1% fosforna kiselina i faza B, acetonitril) sa sledećim profilom mobilne faze: u prvih 10 minuta 10-22% faze B, od 10 do 20 minuta 30% faze B i u narednih 5 minuta povratak na 10% faze B uz 5 minuta za ekvibraciju kolone. Za obradu podataka korišćen je računarski program Waters Empower 2 Software (Waters, Milford, USA).

Rezultati su statistički obrađeni koristeći program Statistica 6 (StatSoft, Inc. USA) u okviru kojeg su razlike između prosečnih vrednosti rezultata utvrđene analizom varijanse (ANOVA), a za procenu statističke značajnosti korišćen Mann-Whitney (Mann-Whitney) neparametarski test. Rezultati dobijeni iz reprezentativnih eksperimenata prikazani su preko srednje vrednosti i standardne greške od tri ponavljanja.

### Rezultati i diskusija

U semenu sočiva određena je količina ukupnih fenola od 2,3 mg EGK g<sup>-1</sup> sveže mase i antioksidativni kapacitet, meren kao antiradikalna aktivnost od 1,6 mg EAK g<sup>-1</sup> sveže mase ABTS testom, tj. 2,2 mg EAK g<sup>-1</sup> sveže mase DPPH testom (Tab. 1).

Dobijene vrednosti sočiva u našem radu su slične i u opsegu vrednosti dobijenih iz različitih sorti sočiva (Fernandez-Orozco et al. 2003,

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet semena sočiva (*Lens culinaris* L.) određen ABTS (A) i DPPH (B) testom. U tabeli su predstavljene srednje vrednosti i standardna greška od tri ponavljanja.

Table 1. Total phenolic content and antioxidative capacity of lentil seed (*Lens culinaris* L.) determined by ABTS (A) and DPPH (B) tests. Data are means of three replications  $\pm$  SE.

Ukupni fenoli Total phenolic content (mg EGK g <sup>-1</sup> sveže mase / fresh weight)	(A)		(B)	
	(mg EAK g <sup>-1</sup> sveže mase / fresh weight)		(mg EAK g <sup>-1</sup> sveže mase / fresh weight)	IC <sub>50</sub> (mg)
2,302 $\pm$ 0,015	1,589 $\pm$ 0,084		2,130 $\pm$ 0,170	1,817 $\pm$ 0,059

Rodríguez et al. 2007). Semena sočiva su poznata po velikom sadržaju antioksidativnih supstanci, a doprinos ukupnih fenola u ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti iznosi 92% (Fernandez-Orozco et al. 2003). Većina fenolnih komponenata koje se nalaze u biljnom tkivu potencijalni su antioksidansi jer imaju sposobnost da uklanjaju aktivne kiseonične i azotne forme. Kako anti-radikalaska aktivnost zavisi ne samo od količine supstance koja uklanja slobodne radikale, već i od strukture molekula, broja i položaja OH grupa u molekulu, odredili smo HPLC analizom kvalitativni i kvantitativni profil fenolnih jedi-

njenja (Tab. 2).

Od detektovanih jedinjenja, dominantno fenolno jedinjenje je galna kiselina, zatim opadajućim redosledom protokatehuinska kiselina, katehin, epikatehin, *p*-kumarna kiselina, rutin i umbeliferon. Fenolne komponente zrna uglavnom čine fenolne kiseline i flavonoidi. Od fenolnih kiselina u ispitivanom uzorku sočiva detektovane su galna, protokatehuinska i *p*-kumarna kiselina, a od flavonoida epikatehin, katehin i rutin. Ispitivanja različitih sorti sočiva (Xu & Chang 2010) pokazala su da postoje znatna variranja u individualnim fenolnim komponentama,

Tabela 2. Koncentracije specifičnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu semena sočiva detektovane HPLC tehnikom. U tabeli su predstavljene srednje vrednosti i standardna greška od tri ponavljanja. Različitim slovima su obeležene statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Table 2. Concentrations of specific phenolic compounds in the methanol extract of lentil seeds detected by HPLC. Data are means of three replications  $\pm$  SE. Different letters within a column denote a significant difference at  $p < 0.05$ .

Fenolno jedinjenje Phenolic compound:	Koncentracija (ng g <sup>-1</sup> sveže mase) Concentration (ng g <sup>-1</sup> fresh weight)
Katehin Catechin	250,296 $\pm$ 24,035 <sup>b</sup>
Epikatehin Epicatechin	141,253 $\pm$ 2,293 <sup>a</sup>
Rutin Rutin	126,803 $\pm$ 6,275 <sup>a</sup>
<i>p</i> -Kumarna kiselina <i>p</i> -Coumaric acid	132,767 $\pm$ 7,847 <sup>a</sup>
Umbeliferon Umbeliferone	123,373 $\pm$ 9,698 <sup>a</sup>
Galna kiselina Gallic acid	1241,423 $\pm$ 81,436 <sup>c</sup>
Protokatehuinska kiselina Protocatechuic acid	288,380 $\pm$ 20,469 <sup>b</sup>

kao i u antioksidativnoj aktivnosti, pri čemu je detektovano devet fenolnih kiselina i njihovih derivata, među kojima galna, protokatehuinska i *p*-kumarna kiselina, a (+)-katehin i (-)-epikatehin kao dominantni flavonoidi. Navedene komponente su bile prisutne u svim sortama sočiva, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Isti autori su ustanovili značajnu korelaciju između sadržaja flavonoida (katehina i epikatehina) i sposobnosti uklanjanja peroksidnih radikala. Amarowicz et al. (2009) su u ekstraktu crvenog sočiva identifikovali 24 komponente koje pripadaju raznim klasama fenola, među kojima su dominantne kvercetin diglukozid, katehin, digalat procijanidin i *p*-hidroksibenzojeva kiselina. Fenolne kiseline u ekstraktu crvenog sočiva imaju manji udeo (oko 20%) od ukupnih fenolnih komponenata. Znatne količine fenola flavonoidne strukture, monomera i polimera (kondenzovanih tanina) skoncentrisane su u semenjači (Dueñas et al. 2003) i oni služe kao odbrambeni mehanizam biljke od parazita i insekata. Seme sočiva kao i ostale leguminozne biljke osim fenola male molekulske mase, sadrži i znatne količine polimernih fenolnih komponenata, kondenzovanih tanina. Tanini se tradicionalno smatraju za antinutritivne faktore

usled sposobnosti da se umreže sa proteinima reagujući sa lizinom i metioninom, te utiču na smanjenje svarljivosti proteina. S druge strane, taninski konstituenti imaju visok antioksidativni potencijal (Amarowicz 2007), što je potvrđeno i u semenu sočiva (Amarowicz et al. 2009). Danas se smatra da efekti pozitivni po zdravlje ili pak antinutritivne osobine zavise od hemijske strukture i količine tanina u biljnom tkivu.

Da bi se utvrdio doprinos identifikovanih fenolnih komponenata antioksidativnim svojstvima sočiva, određena je antiradikalska aktivnost svake komponente DPPH testom. Rezultati su prikazani u tabeli 3. kao  $IC_{50}$  vrednosti i upoređeni sa askorbinskom kiselinom kao standardom, čija je  $IC_{50}$  vrednost iznosila 3,8  $\mu$ g.

Najveću antiradikalsku aktivnost je pokazala galna kiselina, 1  $\mu$ g supstance je ekvivalentan sa 2,3  $\mu$ g askorbinske kiseline koja je poznata kao izuzetno snažan antioksidans. Veće aktivnosti od askorbinske kiseline su dobijene sa epikatehinom, katehinom i protokatehuinskom kiselinom. Visoku antiradikalsku aktivnost epikatehina su odredili Okawa et al. (2001) DPPH testom, čak su potvrdili da postojanje kateholske grupe u strukturi flavonoida u velikoj meri utiče na antiradikalsku aktivnost. Rutin, a naročito

Tabela 3. Antioksidativna aktivnost fenolnih komponenata detektovanih u sočivu, određena kao sposobnost uklanjanja DPPH radikala. Aktivnosti su izražene kao,  $IC_{50}$  i EAK. U tabeli su predstavljene srednje vrednosti i standardna greška od najmanje tri ponavljanja.

Table 3. Antioxidative activity of phenolic compounds detected in lentil seeds, determined as DPPH• scavenging activity. Activities are expressed as  $IC_{50}$  and EAK. Data are means of minimum three replications  $\pm$  SE.

Fenolno jedinjenje Phenolic compound:	$IC_{50}$ ( $\mu$ g)	EAK ( $\mu$ g)
Katehin		
Catechin	2,42 $\pm$ 0,13	1,60 $\pm$ 0,08
Epikatehin		
Epicatechin	2,28 $\pm$ 0,09	1,70 $\pm$ 0,07
Rutin		
Rutin	7,32 $\pm$ 0,40	0,53 $\pm$ 0,03
<i>p</i> -Kumarna kiselina		
<i>p</i> -Coumaric acid	267,00 $\pm$ 4,50	0,02 $\pm$ 0,00
Umbeliferon		
Umbeliferone	721,00 $\pm$ 1,00	0,01 $\pm$ 0,00
Galna kiselina		
Gallic acid	1,69 $\pm$ 0,07	2,30 $\pm$ 0,01
Protokatehuinska kiselina		
Protocatechuic acid	2,63 $\pm$ 0,38	1,48 $\pm$ 0,21

*p*-kumarna kiselina i umbeliferon (7-hidroksikumarin) su slabi antioksidansi. Imajući u vidu određene količine navedenih fenola u semenu, galna kiselina, epikatehin, katehin i protokatehuinska kiselina zajedno čine veliki udeo u količini određenih fenola (oko 83%), možemo da smatramo da fenolne supstance male molekulske mase značajno doprinose antioksidativnom kapacitetu semena sočiva.

### Zaključak

Bioaktivne fenolne komponente, detektovane u visokim koncentracijama u semenu sočiva, poseduju antioksidativnu aktivnost usled čega mogu biti značajne kao primarni izvor prirodnih antioksidanasa. Stoga, prikazani rezultati ukazuju na potrebu šire afirmacije korišćenja sočiva kako za prehrambenu, tako i za farmaceutsku industriju.

### Literatura

- Afanas'ev I B, Derozhko A I, Brodskii A V, Kostyuk V A, Potapovitch A I (1989): Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-1769
- Amarowicz R (2007): Tannins: the new natural antioxidants? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 549-551
- Amarowicz R, Estrella I, Hernández T, Dueñas M, Troszyńska A, Kosińska A, Pegg R (2009): Antioxidant Activity of a Red Lentil Extract and Its Fractions. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 5513-5527
- Arnao M B, Cano A, Acosta M (1999): Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radic. Res.* 31: 89-96
- Bhatty R S (1995): Lentils as a dietary cereal complement. *Cereal Food World* 40: 387-392
- Bravo L (1998): Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333
- Duan X J, Zhang W W, Li X M, Wang B G (2006): Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem.* 95: 37-43
- Dueñas M, Sun B, Hernández T, Estrella I, Spranger IM (2003): Proanthocyanidin Composition in the Seed Coat of Lentils (*Lens culinaris* L.) *J. Agric. Food Chem.* 51: 7999-8004
- Fernandez-Orozco R, Zieliński H, Piskula M K (2003): Contribution of low-molecular-weight antioxidants to the antioxidant capacity of raw and processed lentil seeds. *Nahrung/Food.* 47: 291-299
- Xu B, Chang S K C (2010): Phenolic Substance Characterization and Chemical and Cell-Based Antioxidant Activities of 11 Lentils Grown in the Northern United States. *J. Agric. Food Chem.* 58: 1509-1517
- López-Amorós M L, Hernández T, Estrella I (2006): Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *J. Food Compos. Anal.* 19: 277-283
- Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M (2001): DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants *Biol. Pharm. Bull.* 24: 1202-1205
- Rodríguez J L, Valdés O, Bilbao T (2007): Antioxidant activity of common legumes. *Rev. Cubana Farm.* 41: 66
- Singleton V L, Rossi J A Jr (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158

## Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Lentil Seeds (*Lens culinaris* L.)

Jelena Dragišić Maksimović · Branka Živanović · Vuk Maksimović ·  
Vesna Hadži-Tašković Šukalović

Institute for Multidisciplinary Research, Kneza Višeslava 1, 11030 Beograd, Serbia

**Summary:** The antioxidant activities of methanol extracts of lentil seeds (*Lens culinaris* L.) have been investigated in this work. Scarce reference data describe lentil seeds as rich in polyphenols, which are reported to exhibit bioactive properties due to their capability to reduce or quench reactive oxygen species. The content and composition of phenolics is highly dependent of the cultivars, environments/growth conditions and method of analysis. Therefore, this study is an effort in investigation of phenolics content and composition in lentil seeds trying to prove the contribution of identified phenolics to antioxidant capacity. HPLC measurements revealed that lentil seeds contain gallic acid, epicatechin, catechin, protocatechuic acid, rutin, *p*-coumaric acid and umbeliferone. Their DPPH radical scavenging activity was in descending order from gallic acid to umbeliferone. The presented results contribute to knowledge of the implications in dietary intake of phenolic compounds from lentil seeds.

**Key words:** lentil, phenolic compounds, total antioxidant capacity, total phenolic content