

# Šaltalankių aliejaus technologijos įtaka jo antioksidaciniam aktyvumui

Giedrė Kasparavičienė, Vitalis Briedis, Liudas Ivanauskas<sup>1</sup>

Kauno medicinos universiteto Vaistų technologijos ir farmacijos organizavimo katedra

<sup>1</sup>Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra

**Raktažodžiai:** šaltalankiai, riebalų rūgštys, karotinoidai, antioksidacinis aktyvumas.

**Santrauka.** Darbo tikslas. Nustatyti skirtingomis technologijomis pagamintą šaltalankio aliejaus pagrindinių komponentų kokybinę ir kiekybinę sudėtį, įvertinti jų antioksidacinį aktyvumą. Taip pat įvertinta terminio šoko įtaka šaltalankio uogų aliejaus antioksidaciniam aktyvumui. Tyrimams pasirinktas dviejų rūšių šaltalankių aliejus – uogų pulpos aliejus, pagamintas atskiriant uogų minkštine esančią aliejaus fazę, ir aliejus, pagamintas ekstrahuojant uogas riebaliniais aliejais. Šaltalankių uogų aliejuose nustatytas karotinoidų kiekis (spektrofotometriškai matuojant absorbciją, kai bangos ilgis 450 nm) bei santykinė riebalų rūgščių sudėtis (dujų chromatografijos metodu). Antioksidacinis aktyvumas nustatytas pradinio momentu bei išlaikius termostate  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperatūroje 1, 2 ir 8 valandas. Naudoti 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH<sup>\*</sup>) ir 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS<sup>+</sup>) metodai. Tyrimo duomenimis, ekstrakciniame preparate karotinoidų buvo 2,4 karto daugiau. Šaltalankių uogų aliejų pavyzdžių analizė parodė didelius riebalų rūgščių sudėties skirtumus. Abiem metodais nustatyta, kad ekstrakcinis šaltalankių aliejaus preparatas pasižymi didesniu antioksidaciniu aktyvumu. Laikant aliejus  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, antioksidacinis aktyvumas sumažėja. Tyrimo duomenys patvirtino, kad skirtingomis technologijomis gamintų šaltalankio uogų aliejų sudėtis skiriasi, nevienodas ir antioksidacinis aktyvumas.

## Įvadas

Pastaraisiais metais vis daugiau domimasi augalais, kurių sudėtyje yra antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių. Epidemiologinių tyrimų duomenys patvirtino atvirkštinį priklausomumą tarp vaisių ir daržovių vartojimo su maistu bei širdies ir kraujagyslių ligų. Tai aiškinama tuo, kad daugelyje vaisių ir daržovių bei jų produktų yra antioksidantų (1).

Šaltalankis, kaip gydomasis augalas, naudojamas gana seniai. Gydomosios augalo savybės minimos senovės graikų mokslininkų ir rašytojų veikaluose. Šaltalankių vaisiai ir lapai buvo vartojami Tibeto medicinoje. XX a. antroje pusėje plačiai buvo tyrinėjamas šaltalankių aliejus, jo farmakologinis poveikis. Tyrimų duomenys rodo, kad šaltalankių aliejus pasižymi maitinamuoju, priešuždegiminiu, antimikrobiniu, regeneruojamuoju ir biostimuliuojančiu poveikiu, veiksmingai gydo odos ir gleivinių pažeidimus (2). Eksperimentiniais tyrimais patvirtintos šaltalankių aliejui būdingos antioksidacinės savybės, kurios saugo nuo laisvųjų radikalų neigiamo poveikio. Tyrimais su gyvūnais nustatyta, kad šaltalankių uogų sėklų ir minkštimo (pulpos) aliejus slopina oksidacijos procesus ir stabilizuoja membranos struktūrą (3). Taip

pat jis mažina malondialdehido kiekį žiurkių eritrocitų membranoje ir kepenyse (3). Šaltalankių aliejui būdinga sinergistinė sąveika su kitais antioksidantais – jis stiprina superoksido dismutazės ir kitų antioksidantų veikimą (4). Vartojant šaltalankių aliejų, sumažėja rizika susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, nes jis mažina didelio tankio cholesterolio kiekį plazmoje (5), stabdo trombų formavimąsi ir aterosklerozės vystymąsi (6).

Šaltalankio uogose yra nesočiųjų riebalų rūgščių, organinių rūgščių, flavonoidų, askorbo rūgšties, B grupės vitaminų, vitamino P, karotinoidų, mikroelementų (kalio, kalcio ir kt.). Iš jų antioksidacinėmis savybėmis pasižymi vitaminas E ( $\alpha$ -tokoferolis,  $\beta$ -tokoferolis,  $\gamma$ -tokoferolis,  $\alpha$ -tokotrienolis,  $\beta$ -tokotrienolis,  $\gamma$ -tokotrienolis), askorbo rūgštis, karotinoidai ( $\beta$ -karotinas), flavonoidai (izoramnetin-rutinozidas, izoramnetin-glikozidas, kvercetin-rutinozidas, kvercetin-glikozidas) (7).

Šaltalankio aliejus gaminamas naudojant įvairias technologijas ir tai lemia produkto kokybinius ir kiekybinius skirtumus. Cheminiai šaltalankio aliejaus tyrimo būdai dažniausiai suteikia informacijos apie pagrindinius produkto sudėties komponentus, kurių

rodikliai svyruoja priklausomai nuo žaliavos rinkimo laiko, regiono, klimato ypatybių ir kitų sudėtingai kontroliuojamų faktorių. Pažymėtina, kad, remiantis kompleksinių preparatų cheminės analizės duomenimis, ne visuomet galima pakankamai tiksliai prognozuoti jų antioksidacinį aktyvumą arba farmakologinį poveikį. Todėl šio darbo tikslai buvo nustatyti skirtingomis technologijomis pagamintą šaltalankio aliejaus pagrindinių komponentų kokybinę ir kiekybinę sudėtį, įvertinti jų antioksidacinį aktyvumą, pabandyti įvertinti pastarojo rodiklio priklausomumą nuo aliejaus sudėties. Taip pat įvertinta terminio šoko įtaka šaltalankio uogų aliejaus antioksidaciniam aktyvumui.

### Tyrimo medžiaga ir metodai

Dygliuotasis šaltalankis *Hippophae rhamnoides* L. Lietuvoje plačiai paplitęs krūminis augalas. Uogos yra geltonos arba oranžinės spalvos, kurią suteikia karotinoidai. Tyrimams pasirinktas dviejų rūšių šaltalankių aliejus. Šaltalankių uogų pulpos aliejus, pagamintas atskiriant uogų minkštį esančią aliejaus fazę (paprastas). Kitas šaltalankio uogų produktas pagamintas ekstrahuojant padžiovinintas šaltalankių uogų išspaudas maceracijos būdu riebaliniais aliejais (ekstraktinis). Abu aliejiniai uogų produktai gaminami pramoniniu būdu.

Naudojant standartinius farmakopėjinius analizės metodus, šaltalankių uogų aliejuose nustatytas karotinoidų kiekis (spektrofotometriškai matuojant absorbciją, kai bangos ilgis 450 nm) bei santykinė riebalų rūgščių sudėtis (dujų chromatografijos metodu).

Šaltalankio uogų aliejų antioksidacinis aktyvumas nustatytas pradiniu momentu bei išlaikius termostate  $+60 \pm 2^\circ\text{C}$  temperatūroje 1, 2 ir 8 valandas.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) radikalo sujungimo nustatymo metodas (8). Aliejaus anti-radikalinis aktyvumas įvertinamas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) radikalo neutralizuoja aliejaus sudėtyje esantys ir antioksidaciniu aktyvumu pasižymintys junginiai. Antioksidanto metanolinio tirpalo 50  $\mu\text{l}$  sumaišoma 1 cm kiuvetėje su 2 ml  $6 \times 10^{-5}$  M metanolinio DPPH<sup>•</sup> tirpalo. Spektrofotometru UNICAM „Helios  $\alpha$ “ buvo matuojamas mėginių absorbcijos sumažėjimas, kai bangos

ilgis buvo 515 nm, ir kol pasiekiamas pusiausvyra (apie 16 min.). Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas inaktyvuoto DPPH<sup>•</sup> kiekio procentais:

$$\text{DPPH}_{\text{inaktyv. proc.}} = [(A_b - A_a)/A_b] \times 100,$$

kur:  $A_b$  – tuščiojo bandinio absorbcija ( $t=0$  min.),  $A_a$  – bandinio su tiriamuoju aliejumi absorbcija ( $t=16$  min.).

2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties) (ABTS<sup>•+</sup>) radikalo katijono sujungimo metodas (9). ABTS<sup>•+</sup> radikalas gautas reaguojant ABTS su kalio persulfatu. Radikalas pasigamina laikant ABTS ir kalio persulfato mišinį santykiu 2:1 tamsoje 16 valandų. Katijoninė radikalo forma išlieka stabili dvi paras. Antioksidaciniam aktyvumui įvertinti ABTS<sup>•+</sup> praskiedžiamas fosforo ir druskos buferiniu tirpalu, kad 734 nm bangos ilgyje šviesos absorbcija būtų  $0,8 \pm 0,03$ . Spektrofotometru matuojamas mėginių absorbcijos sumažėjimas 10 min. Antioksidacinis aktyvumas apskaičiuojamas ABTS inaktyvinimo procentais pagal tą pačią formulę kaip ir taikant DPPH radikalo sujungimo metodą.

Duomenys apdoroti naudojant statistinį paketą STATISTICA 6. Apskaičiuoti vidurkiai, vidutiniai standartiniai nuokrypiai, dispersija, pasikliautiniai intervalai, kai patikimumo lygmuo yra 95 proc.,  $n=5$ .

### Rezultatai ir jų aptarimas

Karotinoidų nustatymo šaltalankių uogų aliejuose duomenys pateikiami pirmoje lentelėje. Todėl manoma, kad ekstraktiniame preparate karotinoidų buvo 2,4 karto daugiau. Tai leidžia manyti, kad karotinoidų ekstrakcijos sąlygos iš šaltalankio uogų yra palankesnės, ypač iš uogų odelių ir sėklų.

Šaltalankių uogų aliejų bandinių analizės duomenimis, nustatyta didelių riebalų rūgščių sudėties skirtumų. Ypač ryškūs buvo vyraujančių riebalų rūgščių linolo, oleino, palmitino santykiniai kiekiai skirtumai. Palmitoleino riebalų rūgšties abiejuose bandiniuose buvo panašūs santykiniai kiekiai. Miristo, linoleno, stearino riebalų rūgščių kiekiai tirtuose bandiniuose buvo nedideli, o jų kiekiai skyrėsi nuo 20 iki 90 proc. Duomenys pateikiami antroje lentelėje. Šie riebalų rūgščių skirtumai gali lemti skirtingą produktų poveikį organizmui.

1 lentelė. Karotinoidų kiekis šaltalankio aliejaus bandiniuose

Rodiklis	Santykinis kiekis šaltalankių uogų pulpos aliejuje	Santykinis kiekis šaltalankių uogų aliejiname ekstrakte
Karotinoidų kiekis (mg/proc.)	81,44	198,62

**2 lentelė. Šaltalankio aliejaus bandinių riebalų rūgščių kiekybinė sudėtis**

Rodiklis	Santykinis kiekis šaltalankių uogų pulpos aliejuje	Santykinis kiekis šaltalankių uogų aliejiniame ekstrakto
Miristo	0,58	0,71
Palmitoleino	26,11	25,43
Palmitino	37,41	27,71
Linolo	5,48	27,89
Oleino	22,51	11,44
Linoleno	6,81	4,72
Stearino	1,10	2,10

**3 lentelė. Šaltalankių aliejų antioksidacinio aktyvumo rodikliai**

Tiriamoji medžiaga	Antioksidacinio aktyvumo vidurkis (proc.)		Dispersija	Pasikliautinasis intervalas (proc.)
DPPH metodas				
Šaltalankių uogų pulpos aliejuje	pradinis	48,4±1,72	2,95	46,27–50,53
	po 1 val.	47,3±1,8	3,24	45,06–49,53
	po 2 val.	47±1,69	2,86	44,9–49,1
	po 8 val.	36,5±2,86	8,17	32,95–40,05
Šaltalankių uogų aliejiniame ekstrakto	pradinis	73,5±3,39	11,48	69,29–77,71
	po 1 val.	72,6±2,26	5,14	69,78–75,41
	po 2 val.	71,8±1,93	3,71	69,4–74,19
	po 8 val.	59,6±3,4	11,56	55,38–63,82
ABTS metodas				
Šaltalankių uogų pulpos aliejuje	pradinis	20,4±2,21	4,88	17,66–23,14
	po 1 val.	19,8±2,94	8,65	16,14–23,45
	po 2 val.	19,4±2,42	5,87	16,79–22,81
	po 8 val.	16,5±2,39	5,72	13,53–19,47
Šaltalankių uogų aliejiniame ekstrakto	pradinis	38,2±2,64	7	34,91–41,48
	po 1 val.	37,4±2,17	4,71	34,7–40,1
	po 2 val.	36,5±3,37	11,33	32,32–40,68
	po 8 val.	30,8±3,06	9,37	27–34,6

Antioksidacinio aktyvumo tyrimų duomenys pateikiami trečioje lentelėje. Jie rodo, kad ekstrakcinis šaltalankių aliejaus preparatas neutralizuoja apie 1,5 karto daugiau laisvųjų radikalų, kai jų nustatymas atliekamas DPPH metodu.

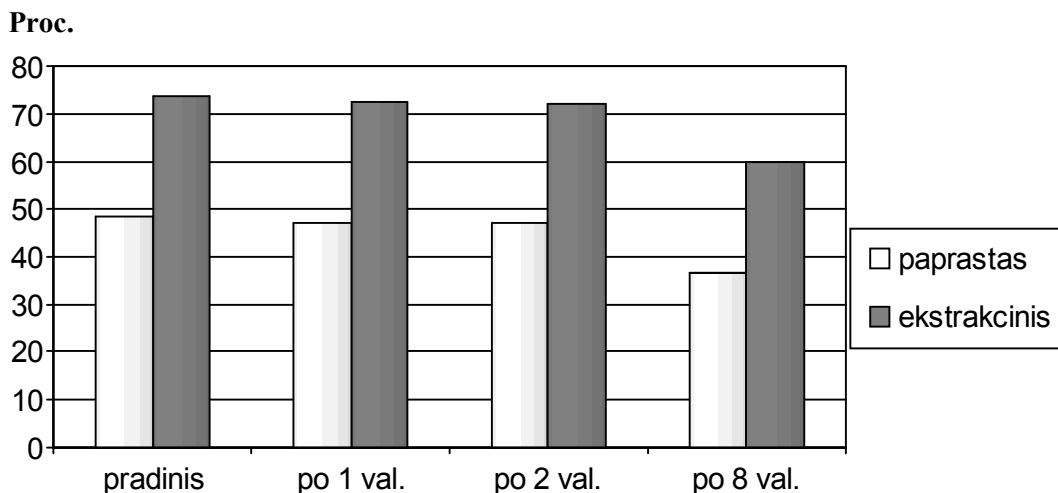
Šaltalankių uogų pulpos aliejaus antioksidacinis aktyvumas, laikant termostate, sumažėjo 2,3 proc. po 1 valandos; 2,9 proc. – po 2 valandų; 25 proc. – po 8 valandų (1 pav.).

Ekstrakcinio šaltalankių aliejaus antioksidacinis aktyvumas taip pat mažėjo: 1,2 proc. – po 1 valandos; 2,3 proc. – po 2 valandų; 19 proc. – po 8 valandų (2 pav.).

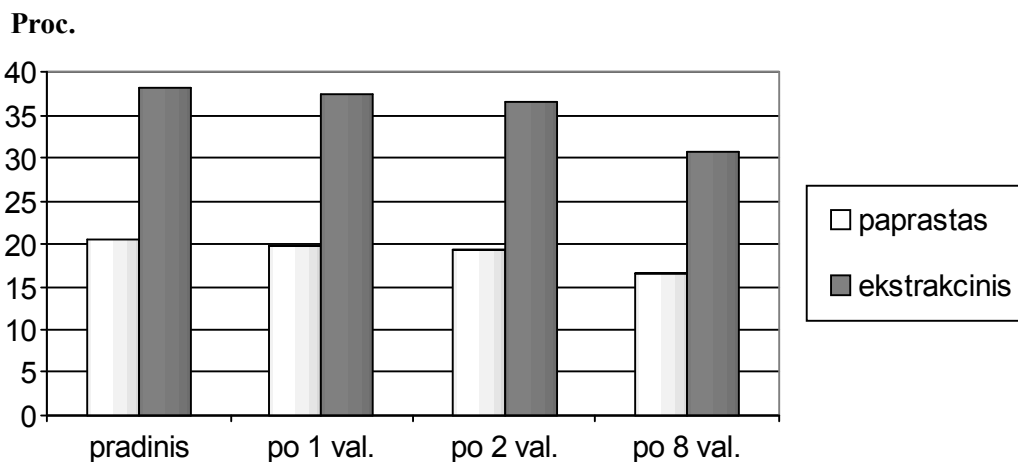
Gauti antioksidacinio aktyvumo nustatymo duomenys po pirmos ir antros valandų nerodo statistiškai

reikšmingo skirtumo. Todėl galima teigti, kad antioksidacinis aktyvumas pirmąsias dvi valandas, laikant aliejus +60±2°C temperatūroje, pakito nežymiai. Po 8 valandų didesnis antioksidacinis aktyvumas nustatytas tiriant ekstrakcinį šaltalankių aliejaus preparatą.

Antioksidacinį aktyvumą nustatčius ABTS metodu, nustatyta, kad ekstrakcinis šaltalankių aliejaus preparatas pasižymi dukart didesniu antioksidaciniu aktyvumu. Šaltalankių uogų pulpos aliejaus antioksidacinis aktyvumas, laikant termostate, sumažėjo 2,9 proc. po 1 valandos, 4,9 proc. – po 2 valandų, 19 proc. – po 8 valandų. Ekstrakcinio šaltalankių aliejaus preparato antioksidacinis aktyvumas taip pat sumažėjo: 2, 4,4



**1 pav. DPPH metodu nustatytas šaltalankių uogų aliejų antioksidacinis aktyvumas ir jo kitimas laikant aliejus  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperatūroje**



**2 pav. ABTS metodu nustatytas šaltalankių uogų aliejų antioksidacinis aktyvumas ir jo kitimas laikant aliejus  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperatūroje**

ir 19 proc., atitinkamai – po 1, 2 ir 8 valandų. Gauti duomenys nerodo statistiškai reikšmingo aliejų pavyzdžių po vienos ir dviejų valandų laikymo  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperatūroje antioksidacinio aktyvumo sumažėjimo. Po 8 valandų didesnis antioksidacinis aktyvumas išlieka Rusijoje pagaminto šaltalankių aliejaus. Reikia pažymėti, kad antioksidacinio aktyvumo kitimo kinetika abiem atvejais buvo labai panaši.

Abu antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodai rodė didesnį ekstrakcinio šaltalankių aliejaus preparato aktyvumą neutralizuojant laisvuosius radikalus. Nevienodi to paties produkto antioksidacinio aktyvumo rodikliai, gauti tiriant skirtingais metodais, leidžia daryti prielaidą apie įvairių cheminių medžiagų dalyvavimą išaktyvuojant DPPH $\cdot$  arba ABTS $\cdot$  laisvąjį radikalą.

*Statistinis rezultatų įvertinimas.* Kiekvienas matavimas kartotas penkis kartus. Gauti duomenys įvertinti statistiniais metodais (3 lentelė), esant 0,95 pasikliautinajam lygmeniui, kai klaidos tikimybė  $p=0,05$ . Visų matavimų atvejais vidutinis standartinis nuokrypis neviršija 5 ( $p=0,05$ ), todėl abu metodai tinka šaltalankių aliejų antioksidaciniam aktyvumui nustatyti. Lentelėje pateiktais duomenimis, abiejų tirtų aliejų antioksidacinio aktyvumo rodikliai po vienos ir dviejų valandų laikymo  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperatūroje patenka į pradinį rodmenų pasikliautinuosius intervalus. Kaip jau minėta anksčiau, tai rodo, kad statistiškai reikšmingo skirtumo tarp antioksidacinio aktyvumo rodiklių nenustatyta. Galima teigti, kad šiuo atveju DPPH metodas buvo tikslesnis, nes rodmenų išsibastymas (dispersija) ir standartinis nuokrypis mažesni lyginant

su rodmenimis, gautais ABTS metodu. Preliminariai stebėti tikslesni tyrimų duomenys abiem metodais nustatant šaltalankių uogų pulpos aliejaus antioksidacinį aktyvumą.

### Išvados

Tyrimo duomenys patvirtino skirtingomis technologijomis gamintų šaltalankio uogų aliejų nevienodą sudėtį. Tirtuose produktuose nustatyti skirtingi karotinoidų kiekiai, skyrėsi ir riebalų rūgščių sudėtis. Tai turbūt turėjo lemiamos įtakos nustatytam skirtingam preparatų antioksidaciniam aktyvumui.

Panašų tirtų preparatų stabilumą patvirtino panašių antioksidacinio aktyvumo kitimo kinetika laikant jų pavyzdžius  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.

Antioksidacinis aktyvumas buvo nustatomas dviem skirtingais metodais. Sprendžiant iš tyrimo duomenų statistinio įvertinimo, abu metodai buvo pakankamai tikslūs ir gali būti naudojami šaltalankių uogų aliejų tyrinėjimams.

Toliau vykdant panašius tyrinėjimus, reikia išsamiu įvertinti galimą kilmės regionų įtaką bei klimato sąlygų poveikį kaupiamų junginių kokybinei ir kiekybinei aliejaus sudėčiai.

## Influence of sea buckthorn oil production technology on its antioxidant activity

Giedrė Kasparavičienė, Vitalis Briedis, Liudas Ivanauskas<sup>1</sup>

Department of Drug Technology and Pharmaceutical Management

<sup>1</sup>Department of Analytical and Toxicological Chemistry, Kaunas University of Medicine, Lithuania

**Key words:** sea buckthorn, fatty acids, carotenoids, antioxidant activity.

**Summary.** The aim of the study was to determine quality and quantity of the main components of sea buckthorn oils, which were produced by different technological procedures, and to evaluate their antioxidant activity. An influence of thermal shock to antioxidant activity of sea buckthorn oils was also evaluated. Two kinds of sea buckthorn oils were chosen. Oil of pulp was produced by separating oil from soft part of the berries. The other oil was produced using berries extracted with fatty oils. The content of carotenoids (by spectrophotometry at 450 nm) and relative content of fatty acids (gas chromatography) were determined in sea buckthorn oils. Antioxidant activity was evaluated for the first moment and after storing in a thermostat at  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperature for 1, 2 and 8 hours. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) methods were used. The results have demonstrated that extracted oil has 2.4 times more carotenoids. Analysis of sea buckthorn oils proved a difference of content of the fatty acids. Extracted oil is more potent antioxidant, showed by both methods. After storing samples at  $+60\pm 2^{\circ}\text{C}$  temperature, antioxidant activity decreased. The results proved that the oils obtained by different production procedures have different content and different antioxidant activity.

Correspondence to G. Kasparavičienė, Department of Drug Technology and Pharmaceutical Management, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 44307 Kaunas, Lithuania. E-mail: stakas@takas.lt

### Literatūra

1. Lampe J. Health effects of vegetables and fruits: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 1999;70(3):475-90.
2. Beveridge T, Li TSC, Oomah BD, Smith A. Sea Buckthorn products: manufactory and composition. *J Agric Food Chem* 1999;47:3480-8.
3. Ji YB, Gao Y. Effect of feeding sea buckthorn seed oil and sea buckthorn seed oil supplemented with sodium selenite in vivo on structural stability of erythrocyte ghost in rats. *Chinese Biochem J* 1991;7:441-6.
4. Yang B. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *J Trend Food Sci Tech* 2002;13:160-7.
5. Jiang YD, Zhou YC, Bi CF, Li J, Yang J, Yu ZD, et al. A clinical investigation of effects of sea buckthorn seed oil on hyperlipemia. *Hippophae* 1993;6:23-4.
6. Johansen A, Korte H, Yang B, Stanley JC, Kallio PH. Sea buckthorn berry oil inhibits platelet aggregation. *J Nutr Biochem* 2000;11:491-5.
7. Eccleston C, Yang B, Tahvonen R, Kallio H, Rimbach GH, Minihane AM. Effects of an antioxidant-rich juice (sea buckthorn) on risk factors for coronary heart disease in humans. *J Nutr Biochem* 2002;13:346-54.
8. Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 1995;43:27-32.
9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *J Free Radical Biol Med* 1999;26:1231-7.

*Straipsnis gautas 2004 04 07, priimtas 2004 05 31*  
*Received 7 April 2004, accepted 31 May 2004*