

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 615.322: 582.475

DOI: 10.26456/vtchem2024.1.8

СУММАРНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ХВОИ СОСНЫ СИБИРСКОЙ И СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

В.В. Крайник

БУ ВО «Сургутский государственный университет», г. Сургут

Изучена суммарная антиоксидантная активность и определено количественное содержание некоторых биоантиоксидантов в экстрактах хвои сосны обыкновенной и сосны сибирской, собранных в начале и конце периода вегетации. Антиоксидантная активность, определенная методом FRAP, составила 18-52 ммоль Fe^{2+} ; общее содержание фенольных соединений – 13-17 мг-экв галловой кислоты на 1 г хвои. Результаты настоящего исследования показывают, что лучшим антиоксидантом является осенний образец сосны обыкновенной. Была получена достаточно высокая линейная корреляция ($R^2 = 0,9104$) между результатами антиоксидантной активности, определенными двумя методами (перманганатным и FRAP). Изучено влияние экстрактов хвои на окисление липидного компонента в субстрате, моделирующем структуру биомембран. Рассчитанные индексы окисленности свидетельствуют о том, что водные экстракты хвои на 40% снижают образование первичных продуктов окисления по сравнению с контрольной пробой

Ключевые слова: *сосна, антиоксидантная активность, FRAP, количество фенольных соединений, индекс окисленности.*

В последние годы все больше людей задумываются о безопасности продуктов питания и лекарственных препаратов. Исследователи ищут природные источники полезных для здоровья соединений, которые можно было бы использовать в том числе в продуктах питания. Особое место среди таких природных источников занимают соединения, обладающие антиоксидантными свойствами, способные защитить организм от окислительного стресса.

Род *Pinus*, включающий около 110 видов, несомненно, является группой уникальных растений, отвечающее этим потребностям [1-3]. Целебные свойства хвойных растений издавна известны человеку. Хвоя, почки, семена (орехи и скорлупа), кора, корни и древесина хвойных растений обладают широким спектром биологически активных веществ, обладающих противовоспалительными, отхаркивающими, поливитаминными и болеутоляющими свойствами.

Хвойные в основном распространены в северном полушарии, хотя они также встречаются в субтропических и тропических районах Центральной Америки и Азии. На территории России хвойные произрастают на северо-востоке европейской части, в Западной Сибири по всей лесной полосе, в восточной Сибири до границы вечной мерзлоты и занимают 81% лесопокрытой площади Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (ХМАО) [4]. Сосны занимают 65% всех хвойных пород ХМАО, самыми распространенными из которых являются сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*) и сосна сибирская (*Pinus sibirica*) или кедр сибирский.

В связи с этим определение антиоксидантной активности в растительном сырье хвойных растений ХМАО остается актуальной задачей и требует тщательного изучения.

Целью настоящего исследования было определение суммарной антиоксидантной активности экстрактов хвои сосны сибирской и сосны обыкновенной для оценки перспективности их применения в качестве источника антиоксидантов.

Обсуждение результатов

Согласно литературным данным [5-6] период прироста хвои у большинства сосновых северных широт начинается в середине-конце мая, при повышении температуры до +7-8°C. Продолжительность роста хвои в сосняках составляет 83– 96 сут. Осеннее пожелтение хвои свидетельствует об окончании вегетации и переходе растения к состоянию зимнего покоя. Эта фаза хорошо выражена только у видов с опадающей хвоей, тем не менее, наибольшее ее количество, как и у видов с опадающей хвоей, опадает также в течение непродолжительного времени. Как правило, у многих видов сосны опадение 3-4-летней хвои начинается в августе и продолжается до весны следующего года, но массовое опадение хвои происходит в октябре и первой декаде ноября.

В связи с вышесказанным, отбор проб было принято проводить в начале (май) и конце (октябрь) периода вегетации хвойных северных широт. Условно данные пробы были названы «весна» и «осень».

Результаты изучения АОА по методу FRAP и количественного содержания фенольных соединений показаны в таблице 1. Получены значения FRAP (17,96-51,52), соответствующие аналогичному показателю побегов сосны обыкновенной (21,79 – 47,25) mg GAE /g, указанным в литературе [7]. Установлено, что экстракты сосны обыкновенной имеют более высокие значения обоих показателей, чем экстракты сосны сибирской. Данная закономерность подтверждает результаты нашего более раннего исследования [8], в котором определялись сумма флавоноидов (total flavonoid content (TFC)) и относительная антиоксидантная активность перманганатометрическим методом по методике, указанной в [9]. Результаты настоящего

исследования показывают, что лучшим антиоксидантом является осенний образец сосны обыкновенной.

Таблица 1

Антиоксидантная активность и содержание фенольных соединений
в экстрактах хвои исследуемых растений

| Исследуемый показатель | сосна сибирская <i>Pinus sibirica</i> | | сосна обыкновенная <i>Pinus sylvestris</i> | |
|---|--|------------|---|------------|
| | весна | осень | весна | осень |
| TPC, (mg GAE /g) | 12,77±0,09 | 14,03±0,13 | 17,00±0,09 | 16,58±0,06 |
| AOA(FRAP), ($\mu\text{M Fe}^{2+}$ /g) | 17,96±1,19 | 39,96±1,78 | 37,81±1,78 | 51,52±2,09 |

Был проведен корреляционный анализ более ранних [8] и полученных в настоящем исследовании результатов. Значения коэффициентов корреляции представлены на рис. 1 и в таблице 2.

Была получена достаточно высокая линейная корреляция ($R^2 = 0,9104$) между результатами антиоксидантной активности, определенными двумя методами (KMnO_4 и FRAP). Таким образом подтверждается закономерность, что осенние образцы хвои обоих исследуемых видов обладают более высокими значениями антиоксидантной активности.

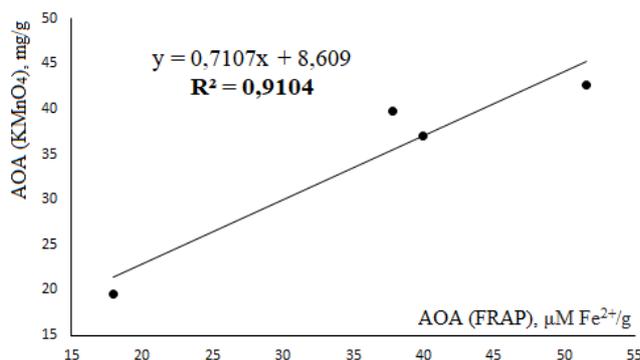


Рис. 1. Коэффициент корреляции между значениями антиоксидантной активности, определенной методами перманганатным и FRAP

Известно [10], что в зависимости от местообитания, онтогенетического состояния, стадии вегетации, органа растения, условий экстрагирования суммарное содержание растительных метаболитов, в том числе различных групп фенольных соединений варьируется. В естественных условиях обитания растения подвергаются действию различных стрессовых факторов, которые могут отражаться на уровне антиоксидантной защиты. В нашем случае стрессовый фактор

подготовки растения к зиме вызывает изменения в суммарной антиоксидантной активности.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между проведенными исследованиями

| R ² | TFC | TPC | AOA (FRAP) |
|--------------------------|--------|--------|------------|
| AOA (KMnO ₄) | 0,8698 | 0,7318 | 0,9104 |
| AOA (FRAP) | 0,9123 | 0,5721 | |
| TPC | 0,7949 | | |

Полученные нами [8] значения (1,1-2,1) общего количества флавоноидов (TFC) в хвое соответствуют нижней границе аналогичного показателя для ядер и скорлупы семян различных сосновых (1,3-7,1) g RE/100g (RE – рутиновый эквивалент), известных в литературе [11]. Тем не менее, обнаружена линейная корреляция между антиоксидантной активностью по методам FRAP ($R^2 = 0,9104$), перманганатным методом ($R^2 = 0,8698$) и TFC, что подтверждает указанную ранее закономерность.

В литературе [3, 11] указано что, содержание фенольных соединений (TPC) обычно коррелирует с антиоксидантной активностью экстрактов орехов и эфирных масел из хвои сосновых. Однако в данной работе статистически значимой корреляции между TPC и антиоксидантной активностью, определенной обоими методами, обнаружить не удалось.

Как известно, основной группой фенольных соединений являются флавоноиды. Поэтому их содержание должно коррелировать между собой. В данном исследовании получена незначительная линейная корреляция ($R^2 = 0,7949$). Данный факт может быть объяснен тем, что на исследованной территории характерным является отсутствие рутина (он использовался в качестве стандарта при расчете числа флавоноидов), что известно в литературе для других растений [12]. Кроме того, имеются данные [13], что при перегревах реакционной массы рутин гидролизует с образованием кверцетина, что могло повлиять на результаты количественного определения флавоноидов.

Следующим этапом исследований было изучение влияния экстрактов хвои исследуемых сосновых на процесс каталитического окисления липидного субстрата, моделирующего структуру биомембран. В качестве критерия был выбран индекс окисленности, используемый для оценки качества растительных масел.

Все первичные и часть вторичных продуктов окисления используемого нами липидного субстрата содержат двойные связи, сопряженные с гидропероксидной или карбонильной группой, что позволяет изучать эти процессы по УФ-спектрам.

На 1-м этапе работы были получены спектры поглощения гексановых экстрактов органической фазы модельной системы в интервале длин волн 190–300 нм. Типичные спектры органической фазы пробы в процессе окисления при 24°C в присутствии водного экстракта Сосны сибирской представлены на рисунке 2.

Показано, что появляется интенсивная полоса с максимумом ($\lambda_{\text{макс}}$) при 202–204 нм (первая полоса), небольшое плечо в области 215–225 нм (вторая полоса) и широкая, менее интенсивная полоса с $\lambda_{\text{макс}}$ при 260–280 нм (третья полоса). Первая полоса была отнесена к поглощению $\text{C}=\text{C}$ связей образца, вторая - к поглощению первичных продуктов (алкенил- гидропероксидов), и третья - к поглощению вторичных продуктов (α , β -ненасыщенных карбонильных соединений) [14-15].

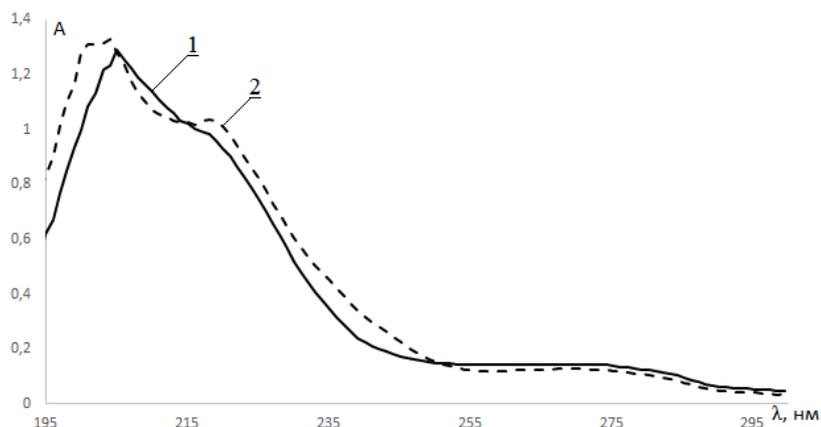


Рис. 2. УФ-спектры гексановых экстрактов проб через 1 - 0,5; 2 – 1 ч окисления

В процессе окисления возрастает интенсивность указанных полос, что говорит о накоплении продуктов окисления липидного компонента модельной системы.

Спектры поглощения позволяют оценить очень важный параметр – индекс окисленности (ИО), который характеризует качество липидного комплекса [16-17]. Он отражает накопление суммы продуктов пероксидного окисления жирно-кислотных остатков липидов. Данный параметр мы рассчитали несколькими способами, описанными в литературе и указанными ранее. Нами была применена данная методика несколько в иной интерпретации - оценивалось не качество липидного субстрата, а влияние экстрактов исследуемых растений на стойкость липидного субстрата к окислению.

Поэтому следующая серия экспериментов относилась к окислению модельной системы в присутствии водных и водно-спиртовых экстрактов исследуемых растений. Полученные УФ-спектры обрабатывали с целью определения индекса окисленности. Рассчитанные значения ИО модельного липидного субстрата в присутствии экстрактов

хвои исследуемых растений через 2 ч окисления представлены на рисунке 3.

ИО, рассчитанный как соотношение значения оптических плотностей A_{225}/A_{203} показывает соотношение содержания первичных продуктов окисления — конъюгированных гидропероксидов в образце [16-17]. Все водные экстракты хвои (рис. 3а) значительно (на 40%) снижают ИО по сравнению с контрольной пробой. Водно-спиртовые экстракты (рис. 3с) ведут себя иначе. Экстракты хвои сосны сибирской не изменяют ИО относительно контроля, экстракты хвои сосны обыкновенной снижают накопление первичных продуктов окисления. Характер влияния экстрактов сосны обыкновенной на ИО подтверждает результаты предыдущих экспериментов. Чем выше АОА, определенная по методам ($KMnO_4$ и FRAP), тем меньше накапливаются первичные продукты окисления в модельном эксперименте.

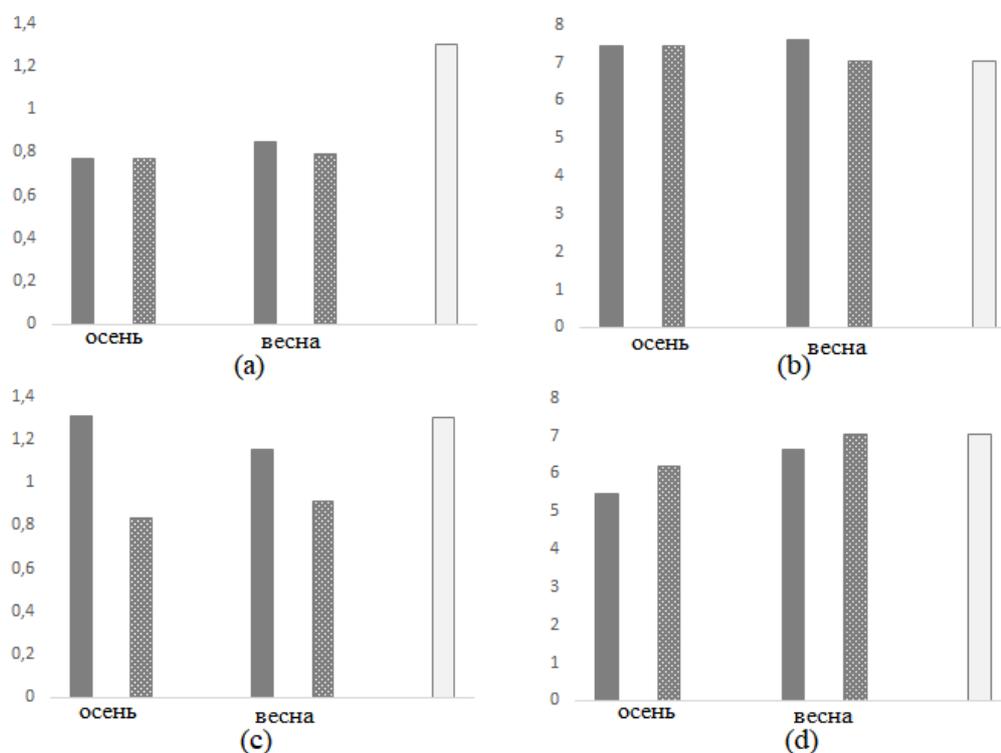


Рис. 3. Индексы окисленности модельного липидного субстрата через 2 ч окисления: а-в водные, с-д - водно-спиртовые экстракты; отношение оптических плотностей а,с - A_{225}/A_{203} , б,д - A_{225}/A_{270} ; ■ сосна сибирская, ▨ сосна обыкновенная, □ контроль

Индекс окисленности, рассчитанный по второму способу, как соотношение значения оптических плотностей A_{225}/A_{270} , отражает соотношение первичных и вторичных продуктов окисления [16-17].

Поскольку значение ИО, рассчитанного по второму способу значительно выше ИО, рассчитанного по первому способу, в модельном эксперименте преобладает накопление первичных продуктов окисления как в контрольном образце, так и в исследуемых образцах. Как следует из рис. 3 b, d, и водные и водно-спиртовые экстракты хвои исследуемых растений существенно не изменяют ИО по сравнению с контрольной пробой. Исключение составляют осенние водно-спиртовые экстракты, незначительно снижающие ИО (рис 3. d), что свидетельствует о преобладании интенсивности нарастания вторичных продуктов окисления над первичными.

Статистически значимой корреляции между антиоксидантной активностью, определенной ранее указанными методами (KMnO_4 и FRAP) и изменением ИО обнаружить не удалось.

Отсутствие указанной корреляции и закономерного изменения индексов окисленности, рассчитанных разными способами свидетельствует о сложном характере влияния природных антиоксидантов хвои на процесс окисления липидного субстрата, моделирующего биомембраны. В реальных объектах антиоксиданты могут действовать синергетически, а иногда оказывать и прооксидантный эффект. Таким образом, ни один метод не может дать исчерпывающую информацию и исследование антиоксидантной активности необходимо проводить при помощи комплекса различных методов.

Экспериментальная часть

Объект исследования: биомасса хвои сосны сибирской и сосны обыкновенной 10-летнего возраста, собранная на территории городского парка (Россия, ХМАО, г. Сургут) в 2022г. Собранная хвоя объединялась в общую пробу и сушилась традиционным способом до воздушно-сухого состояния без доступа света. Из высушенной хвои готовили средние образцы, из которых отбирались навески для дальнейшего исследования.

Определение суммы фенольных соединений проводили спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [18]. Экстракт готовили с использованием 95% этилового спирта. Суммарное содержание фенольных соединений (total phenol content, TPC) выражали в мг-экв галловой кислоты на 1 г хвои, рассчитанное по калибровочной кривой.

Определение суммарной антиоксидантной активности в данной работе проводили двумя методами. Первый метод - FRAP (ferric reducing antioxidant power - способность антиоксидантов восстанавливать железо). Суть метода заключается в том, что при добавлении к спиртовому экстракту хвои комплекса Fe^{3+} -ортофенантролин в результате реакции Fe^{3+} восстанавливается и образуется окрашенный комплекс, который фиксируется спектрофотометрически [19].

Калибровочные кривые готовили с использованием рабочих растворов $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в диапазоне концентраций. Восстанавливающую способность тестируемых хвойных экстрактов рассчитывали относительно сигнала реакции, даваемого раствором Fe^{2+} . Значения FRAP выражали в ммоль Fe^{2+} /г хвои.

Второй метод – определение индексов окисленности модельного липидного субстрата в отсутствие (контроль) и присутствии водных и водно-спиртовых экстрактов хвои исследуемых растений. Водные экстракты готовили кипячением с обратным холодильником в воде навески хвои, водно-спиртовые – выдерживанием навески хвои в 70% этиловом спирте.

Каталитическое окисление кислородом воздуха пробы, стоящей из липидного субстрата (этилолеата), эмульгатора (Triton X-100), катализатора (катионы Cu^{2+}) осуществляли при 25°C и оптимальном перемешивании. Конечная концентрация в растворе: липидный субстрат – 0,7; эмульгатор - $(1-5) \cdot 10^{-3}$; медь - $(2-3) \cdot 10^{-2}$; моль/л соответственно.

Во времени отбирали по 100 мкл пробы. Органическую фазу отделяли, экстрагируя гексаном, и записывали спектры в области поглощения продуктов окисления в диапазоне 190-300 нм.

Индекс окисленности, отражающий накопление суммы продуктов пероксидного окисления рассчитывали 2 способами [16-17]: отношение оптической плотности гексанового экстракта органической фазы окисленной пробы при $\lambda=225$ нм к оптической плотности при $\lambda=203$ нм (соответствует содержанию первичных продуктов окисления); отношение оптической плотности гексанового экстракта органической фазы при $\lambda=225$ нм к оптической плотности при $\lambda=270$ нм (соответствует содержанию первичных и вторичных продуктов окисления).

Экспериментальные данные получены в 3-5 повторностях. Результаты рассчитывали на единицу абсолютно сухого вещества хвои. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы MS Excel. Статистически обработанные данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение.

Заключение

Различными методами проанализирована суммарная антиоксидантная активность экстрактов хвои сосны сибирской и сосны обыкновенной, произрастающих на территории ХМАО. Выявлены различия исследуемых показателей для осенних и весенних образцов, наиболее эффективным антиоксидантом является осенний образец хвои сосны обыкновенной. Сложный характер изменения индексов окисленности модельного липидного субстрата в присутствии экстрактов хвои исследуемых сосновых свидетельствует о многообразии механизмов действия биоантиоксидантов. Полученные результаты

свидетельствуют о перспективности применения хвои сосны в качестве источника антиоксидантов.

Список литературы

1. Koutsaviti, S. Toutoungy, R. Saliba, S. Loupassaki, O. Tzakou, V. Roussis ; E. Ioannou. Antioxidant potential of pine needles: a systematic study on the essential oils and extracts of 46 species of the genus *Pinus*. // Foods. 2021. Vol. 10. P. 142–161.
2. А.Ф. Шафиева, Г.А. Усманова, С.В. Нехорошев, А.В. Нехорошева, Э.Х. Ботиров. Исследование компонентов хвои сосны сибирской (кедровой) *Pinus sibirica* Du Tour. Препринт. – 2020. – 14 с. 10.13140/RG.2.2.26135.60328.
3. L. Zhihong, F. Weixin, X. Qing. Chemical composition, total phenolic content, and antioxidant activity of the essential oils extracted from the needle of ten *Pinus* taxa // J. of Chemistry. 2022. Vol. 2022. P. 1–10.
4. Н.В. Ларина. Современное состояние и тенденции развития лесопромышленного комплекса ХМАО–ЮГРА // Экономика и эффективность организации производства. – 2013. – № 18. – С. 64–67.
5. И.Т. Кищенко. Сезонное формирование надземной фитомассы средневозрастных сосновых древостоев различных типов леса в средней тайге // Лесоведение. – 2019. – № 1. – С. 19–28
6. В.В. Шестопалова. Особенности роста, развития и устойчивости видов сосновых в условиях Ботанического сада Воронежского государственного университета // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2003. – № 1. – С. 89–95.
7. M. Dzedziński, V. Kobus–Cisowska, D. Szablewska–Powalowska, K. Stuper–Szablewska, M. Baranowska. Polyphenols composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Pinus Sylvestris* L. shoots extracts depending on different drying methods // Emirates J. of Food and Agriculture. 2020. Vol. 32. Issue. 3. P. 229–237.
8. V.V. Kraynik, Antioxidant activity of *Pinus sylvestris* and *Pinus sibirica* needles extracts / International scientific conference Actual Problems of the Chemistry of Natural Compounds. Tashkent. 15–16.03.2023. Tashkent: Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. 2023. P. 54.
9. Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман М.Г. Сравнение антиоксидантной активности образцов различной природы // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2021. – № 1(43). – С. 23–29.
10. Е.Р. Khramova. Influence of Abiotic environmental factors on the accumulation of phenolic metabolites of *Dasiphora fruticose* // Contemporary problems of ecology. 2022. Vol. 15. No. 5. P. 508–520.
11. S. Zhang, L. Zhang, L.Wang, Yu. Zhao. Total phenols, flavonoids, and procyanidins levels and total antioxidant activity of different Korean pine (*Pinus koraiensis*) varieties // J. For. Res. 2019. Vol. 30 P. 1743–1754.
12. Г.В. Демина, Р.Ш. Хазиев, Р.В. Егорова. Особенности накопления и качественный состав флавоноидов в листьях и почках *Betula L.* // Ученые

- записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2013. – Т. 155. – № 3. – С. 155–161.
13. А.А. Лобанова, В.В. Будаева, Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. – 2004. – №1. – С. 47–52.
 14. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных. М.: Мир. 2006. 438 с.
 15. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии. Л.: Химия. 1985. 248 с.
 16. Рыбакова О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Определение спектральных характеристик спиртовых растворов растительных масел и масляных экстрактов методом УФ–спектрофотометрии // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2007. – №. 2. – С. 171–173.
 17. Тринеева О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Изучение стабильности растительных масел и масляных экстрактов методом УФ–спектрофотометрии // Фармация. – 2014. – № 7. – С. 11–16.
 18. Патент № 2700787 С1 РФ, МПК G01N 33/00, A01G 7/00. Способ определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных объектах: № 2019110069 : заявл. 05.04.2019: опубл. 23.09.2019 / Т. Н. Николаева, П. В. Лапшин, Т. Л. Нечаева, Н. В. Загоскина ; заявитель ФГБУ науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. 12 с.
 19. Berker KI, Güçlü K, Tor I, Apak R. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents // Talanta. 2007.Vol. 72. Issue 3. P. 1157–1165.

Об авторах:

КРАЙНИК Виктория Викторовна – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры химии БУ ВО «Сургутский государственный университет» (628403, г. Сургут, пр. Ленина, д. 1); e-mail: krajnik_vv@surgut.ru.

**TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY
OF *PINUS SIBIRICA* AND *PINUS SYLVESTRIS*
NEEDLES EXTRACTS**

V.V. Kraynik

Surgut State University, Surgut

The total antioxidant capacity and content of some bioantioxidants of *Pinus Sibirica* and *Pinus Sylvestris* needles extracts, collected at the beginning and at the end of the vegetation period were studied. FRAP, total phenol content values ranged from 18 to 52 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$, from 13 to 17 mg GAE/g respectively. *Pinus Sylvestris* autumn sample extract exhibited the highest antioxidant capacity. Ferric reducing antioxidant power values were positively correlated (R^2 0.9104) with antioxidant capacity determined by permanganate method.

The influence of needle extracts on the lipid oxidation in biomembrane modeling system were studied. Calculated oxidation index exhibited that aqueous needle extracts reduced the formation of primary oxidation products by 40% compared to the control sample.

Keywords: *pine, antioxidant capacity, FRAP, total phenol content, oxidation index.*

Дата поступления в редакцию: 27.12.2023.

Дата принятия в печать: 18.01.2024.