

УДК 615.322

**ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА И
АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО В
УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГОРОДА
ТВЕРИ**

Н.А. Соловьева, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов

Тверской государственный университет
Кафедра физической химии

Методом УФ-спектроскопии выполнен качественный анализ содержания фенольных соединений в экстрактах тысячелистника обыкновенного, произрастающего в промышленных зонах города Твери. Исследована антиоксидантная активность полифенолов спиртовых экстрактов тысячелистника в отношении стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (ДФПГ). Установлено, что количество растительных антиоксидантов и их активность зависят от места сбора изучаемого растения.

Ключевые слова: тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*), фенольные соединения, антиоксидантная активность, ДФПГ, УФ-спектроскопия.

В условиях урбанизированной (техногенной) среды у растений при сохранении внешне неизменного вида наблюдаются значительные изменения биохимического состава и физиологических процессов [1]. Наиболее опасным последствием воздействия на живой организм промышленных загрязнений можно считать развитие окислительного стресса, обязательным условием возникновения которого является избыточное образование активных форм кислорода, обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью. В настоящее время к числу активных форм кислорода относят производные кислорода радикальной природы (супероксид-радикал (анион-радикал) O^{2-} , гидроперекисный радикал $HO^{2\cdot}$, гидроксил-радикал HO^{\cdot}), а также его реактивные производные (перекись водорода H_2O_2 , синглетный кислород 1O_2 и пероксинитрит) [2– 4].

В нормальных условиях жизни образование активных форм кислорода – обычный метаболический процесс. Содержание активных форм кислорода в тканях невелико, но при чрезмерном их накоплении, что происходит в стрессовых условиях, возникают патологические последствия.

Окислительный стресс развивается при действии самых разных стрессовых экологических факторов: при засухе, в условиях засоления,

при низких положительных (+4...+5⁰С) и высоких температурах, под действием атмосферных поллютантов, при избытке тяжёлых металлов в почве и др. [5].

В экстремальных условиях важнейшим механизмом устойчивости растений является активизация многоуровневой биохимической системы антиоксидантной защиты, в которую входит большое число компонентов, проявляющие антиоксидантные свойства, в том числе фенольные соединения [6; 7].

Разнообразные фенольные соединения присутствуют во всех высших и в большинстве низших растений. Важнейшей функцией фенольных веществ является антиоксидантная активность [8]. Биологическая активность большинства растительных полифенолов обусловлена во многом именно способностью ингибировать свободно-радикальные процессы [9].

Увеличение содержания фенольных веществ в растении является предшественником видимых хлорозов и некрозов. Это позволяет оценить реакцию растения на действие неблагоприятных факторов среды на ранних стадиях до появления у него видимых изменений в форме хлорозов и некрозов [10]. Ввиду этого актуальным является изучение ответных реакций живых организмов и в первую очередь растений, на влияние антропогенных факторов и стрессовых условий. В качестве объектов исследования в данной статье были выбраны образцы тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*), широко используемого в медицине и являющегося официальным лекарственным растением фармакопей разных стран [11].

Цель работы – анализ качественного состава и антиоксидантной активности фенольных соединений тысячелистника обыкновенного, произрастающего в промышленных районах г. Твери.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являлись образцы тысячелистника обыкновенного, собранные на территории 5 промышленных зон г. Твери, а также контрольный образец готовой аптечной формы ЗАО «Здоровье» (табл. 1).

Сбор, сушку и хранение изучаемого растения производили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи, ГОСТов [12; 13] и справочными данными [14].

Места сбора тысячелистника	
№ образца	Места сбора
1	Вагоностроительный завод
2	ТЭЦ-1
3	ТЭЦ-3
4	Лакокрасочный завод
5	Полиграфический комбинат детской литературы
6	Аптечная форма ЗАО «Здоровье»

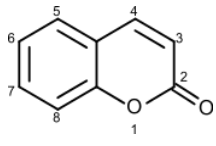
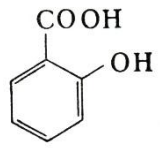
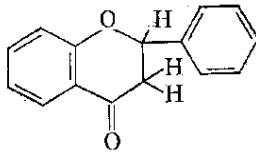
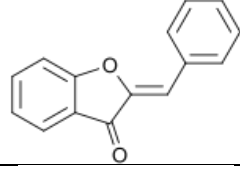
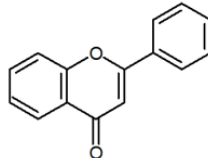
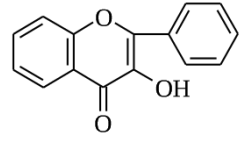
Электронные спектры поглощения водных и спиртовых (96 %) экстрактов тысячелистника были записаны на спектрометре УФ- и видимого диапазонов «Evolution Array» фирмы «Thermo Scientific». Навеску сырья экстрагировали при соотношении сырья и экстрагента 1:100 на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Спиртовое и водное извлечения фильтровали, после чего проводили серию разбавлений полученных экстрактов. В результате подбора оптимальных значений оптической плотности для спиртовых и водных экстрактов тысячелистника были выбраны следующие соотношения навески и растворителя: 1:3000 и 1:1000 соответственно. Спектры регистрировали в диапазоне 200–800 нм в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Кинетику взаимодействия радикала 1.1-дифенил-2-пикрилгидразида (ДФПГ) с антиоксидантами спиртовых экстрактов тысячелистника исследовали на основе метода, предложенного в работе [15], с использованием УФ-спектрометра «Perkin Elmer LAS» (Германия). Для изучения антиоксидантной активности наблюдали снижение оптической плотности радикала ДФПГ после его добавления к экстракту тысячелистника в начале реакции (первые 10 мин) при фиксированной длине волны ($\lambda=517$ нм). В кювету вводили 0.4 мл экстракта, 0.4 мл 0.4 М раствора уксусной кислоты в этаноле и 2,4 мл $7.61 \cdot 10^{-5}$ М раствора ДФПГ в этаноле и быстро перемешивали содержимое кюветы. Кислота значительно снижает скорость реакции, облегчая проведение кинетических исследований [15].

По литературным данным в составе тысячелистника обыкновенного потенциальными антирадикальными антиоксидантами являются дубильные вещества, кумарины, флавоноиды (флаваноны, флавоны, флавонолы, ауроны и др.), фенолкарбоновые кислоты [16].

Известно, что отдельные группы фенольных соединений различаются по спектральным характеристикам (табл. 2).

Таблица 2

Отнесение полос поглощения некоторых фенольных соединений
в УФ- и видимой областях [17]

Группа соединений	Общая формула группы фенольных соединений [18, 19]	Основной максимум полосы поглощения, нм	Дополнительный максимум, нм
Кумарины		220–230, 310–350	≈260 (30%), ≈300 (30%)
Оксибензойные кислоты		235 – 270, 290 – 305	300 – 350
Флаваноны		275–290, 290–330	310–330 (30%)
Ауроны		390–430	240–270 (32%)
Флавоны		250–270, 310–350	-
Флавонолы		250–270, 350–390 (3-гликозиды: 330–360 нм)	≈300 (40%)

Для идентификации фенольных соединений были записаны электронные спектры поглощения экстрактов образцов тысячелистника в области длин волн 200–500 нм (рис.1).

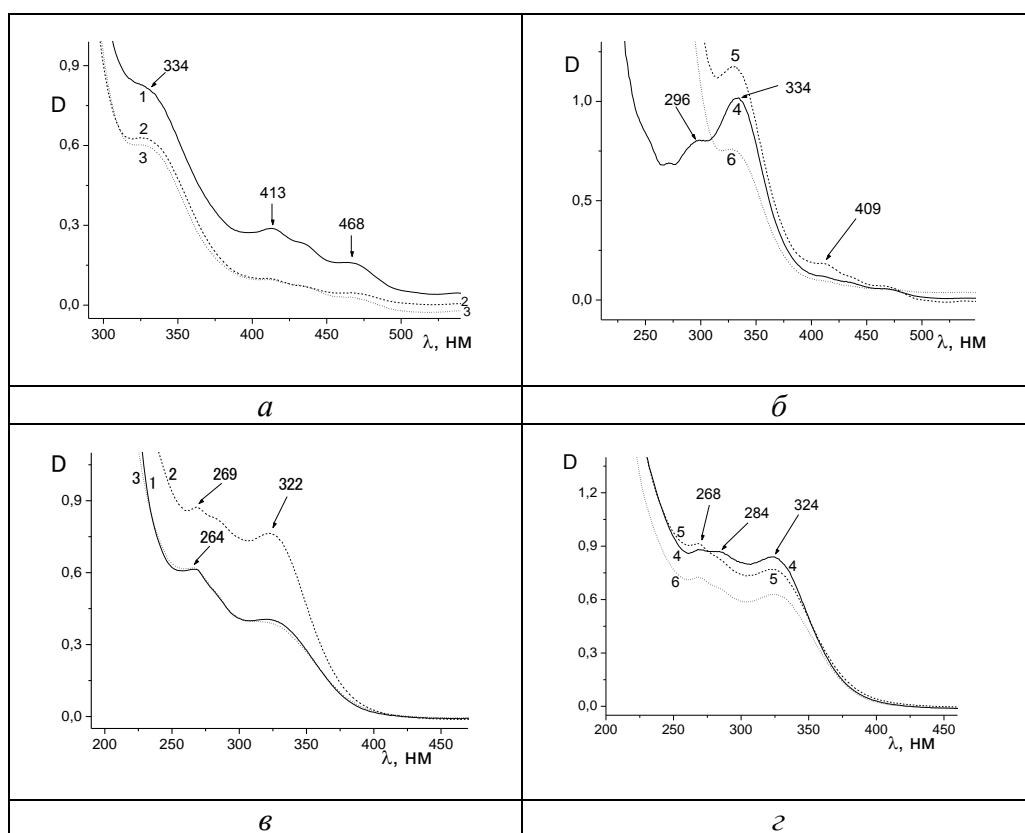


Рис. 1. Электронные спектры поглощения спиртовых (а, б) и водных экстрактов (в, г) тысячелистника обыкновенного: а, в – образцы №1–3; б, г – №4–6 в табл. 1

Фенольный состав спиртовых и водных экстрактов тысячелистника довольно разнообразен: присутствие флавонов, кумаринов в обоих экстрактах подтверждается появлением соответствующих полос поглощения $\lambda_{\max} \sim 334$ нм, $\lambda_{\max} \sim 322\text{--}324$ нм. Однако, кроме названных групп фенольных соединений, максимум $\lambda_{\max} \sim 334$ нм характерен также поглощению 3-гликозидов, а $\lambda_{\max} \sim 322\text{--}324$ нм – поглощению флаванонов.

В спектрах поглощения всех образцов водных экстрактов тысячелистника содержатся флавонолы ($\lambda_{\max} \sim 264\text{--}269$ нм). Во всех образцах спиртовых экстрактов наблюдаются полосы поглощения с максимумами $\lambda_{\max} \sim 406\text{--}413$ нм, что указывает на присутствие ауранов.

В спектрах водных экстрактов полосы поглощения в этой области отсутствуют, так как экстракция определенных групп фенольных соединений определяется растворителем.

В электронных спектрах поглощения образца №4, собранного у лакокрасочного завода, наблюдаются полосы, характерные флаванонам, однако в зависимости от используемого растворителя меняется положение полосы. Так, в спектрах водных экстрактов наблюдается сдвиг максимумов в сторону меньших длин волн по сравнению с максимумами в соответствующих диапазонах спектров спиртовых экстрактов: с $\lambda_{\text{max}} \sim 296$ нм на $\lambda_{\text{max}} \sim 284$ нм. Это можно объяснить некоторым различием в химической структуре флаванонов анализируемых экстрактов.

Интенсивность полосы поглощения в электронных спектрах, полученных для образцов № 4 (табл. 1), практически не меняется при переходе от одного растворителя к другому. Следовательно, тысячелистник обыкновенный менее устойчив к загрязнениям лакокрасочного завода.

С помощью метода УФ-спектроскопии также была исследована антиоксидантная активность фенольных соединений спиртовых экстрактов тысячелистника.

При взаимодействии с антирадикальными антиоксидантами ДФПГ переходит в нерадикальную форму, что сопровождается исчезновением максимума полосы поглощения на длине волны $\lambda=517$ нм, ответственной за наличие радикала ДФПГ в образце [15].

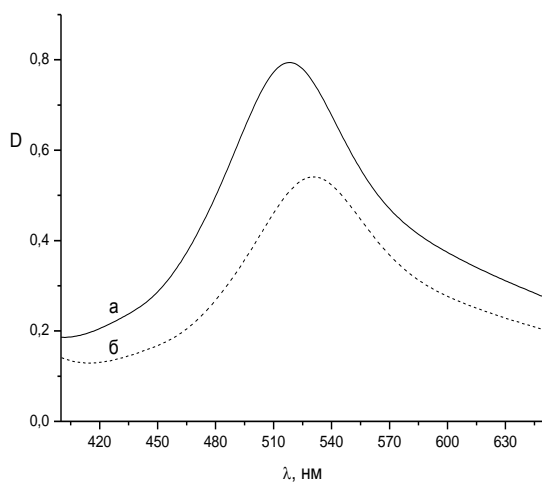


Рис. 2. Электронные спектры поглощения спиртового раствора стабильного радикала ДФПГ: спектр а был получен в день снятия кинетических кривых реакций ДФПГ с экстрактами образцов № 1–3, спектр б – спустя несколько дней с оставшимися образцами

На рис. 2 приведены спектры поглощения спиртового раствора стабильного радикала ДФПГ, записанные в разное время. При этом наблюдается сдвиг максимума полосы поглощения радикала ДФПГ с $\lambda=517\text{nm}$ на $\lambda=530\text{nm}$. Данный факт учитывался в оценке антиоксидантной активности фенольных соединений экстрактов тысячелистника в отношении радикала ДФПГ.

На рис. 3 представлены кинетические кривые уменьшения оптической плотности радикала ДФПГ в результате его взаимодействия с антиоксидантами экстрактов образцов тысячелистника.

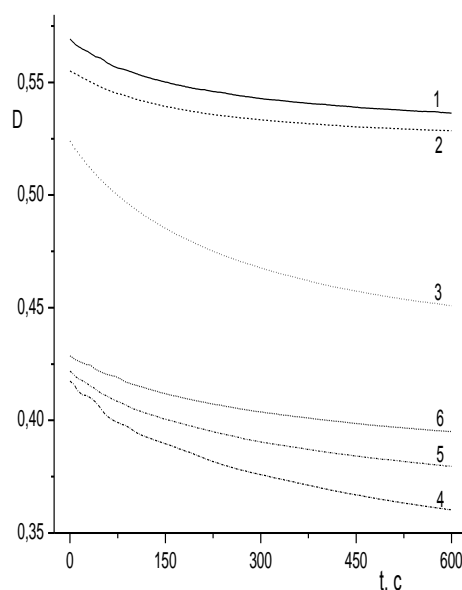


Рис. 3. Изменение оптической плотности полосы поглощения 517 нм во времени для спиртовых экстрактов тысячелистника обыкновенного: образцы №1– 6 (табл. 1)

В связи с тем, что скорость взаимодействия фенольных антиоксидантов экстрактов тысячелистника с радикалом ДФПГ оказалась различной (рис. 3), а также учитывая, что в стрессовых для растения ситуациях (в том числе антропогенного характера) увеличивается количество фенольных антиоксидантов, вероятно, их активность в отношении радикала ДФПГ также определяется степенью стресса растений. Таким образом, антиоксиданты образцов № 3 и 4 (табл. 1) обладают более высокой антирадикальной активностью (особенно образец № 3), что указывает на негативное влияние загрязнений ТЭЦ-3 и лакокрасочного завода на тысячелистник.

Таким образом, в ходе анализа было отмечено различное содержание фенольных соединений в образцах в зависимости от места сбора и экстрагента. Установлено, что в стрессовых для тысячелистника условиях (в особенности под влиянием загрязнений лакокрасочного завода и ТЭЦ-3) увеличивается количество фенольных соединений, усиливается антиоксидантная активность. Проведенное исследование позволяет сделать вывод о том, что степень стрессового воздействия неблагоприятных факторов среды, в том числе промышленных загрязнений, на растительный организм можно оценить, используя данные о содержании фенольных соединений, основных биологически активных веществ в составе растений и их антиоксидантной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации в рамках выполнения государственных работ в сфере научной деятельности, проект № 4.1325.2014/к; при поддержке Инжинирингового центра ТвГУ «Зелёная химия» и Немецко-Российского Междисциплинарного Научного Центра «German-Russian Interdisciplinary Science Center» (G-RISC) (проект С-2015а-2), финансируемого Германской службой академических обменов (DAAD). Эксперимент проведён на оборудовании лаборатории спектроскопии ЦКП ТвГУ и Свободного университета Берлина.

Авторы выражают благодарность Экарту Рюлю – профессору Свободного университета Берлина за оказанную помощь в работе.

Список литературы

1. Майснер А. Д. Жизнь растений в неблагоприятных условиях. Минск: Высш. шк., 1981. 98 с.
2. Мерзляк М.Н. // Физиология растений. 1989. Т. 6. С. 25–30.
3. Скулачев В.П. // Соросовский образовательный журнал. 1996 . № 3. С. 4–10.
4. Колупаев Ю.Е. // Вестн. Харьк. нац. аграр. ун-та. Сер. Биология. 2007. Вып. 3(12). С. 6–26.
5. Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект): монография. Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. 111с.
6. Alonso R., Elvira S., Castillo F.J., Gimeno B. S. // Cell and Environment. 2001 V. 24. P. 905–916.
7. Граскова И.А., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Войников В.К. // Физиология растений. 2004. Т. 51, № 5. С. 692–697.
8. Запрометов М.Н. Биохимия катехинов. М.: Наука. 1964. 295 с.
9. Halliwell B., Schabach R., Loliger J., Aguoma O. J. // Chem Toxic., 1995. V. 33, №7. P. 601
10. Федорова А. И., Никольская А.Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды. М.: ВЛАДОС, 2001. 288 с.

11. Калинкина Г.И., Дембицкий А.Д., Березовская Т.П. // Химия растительного сырья. 2000. № 3. С. 13–18.
12. Лекарственное растительное сырье: Государственные стандарты Союза ССР. М.: Изд-во стандартов, 1980. 196 с.
13. Государственная ФАРМАКОПЕЯ СССР. Общие методы анализа: (Лекарственное растительное сырьё). М.: «Медицина», 1990. Вып. 2.
14. Справочник по лекарственным растениям / А. М. Задорожный, А. Г. Кошкин, С. Я. Соколов и др. М.: Лесн. пром-сть, 1988. 415 с.
15. Волков В.А., Пахомов П.М. // Вестник ТвГУ. Серия: Биология и экология Тверь, 2007, №5. С. 64 – 67.
16. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: Ч. 1: Семейства Lycopodiaceae – Euphorbiaceae, ч. 2: Дополнения к 1 – 7-му томам. СПб., 1996.
17. Harborne J. B. Biochemistry of Phenolic Compounds. New York: Academic Press, 1964.
18. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений / А.А. Семенов. – Новосибирск: Наука, 2000. 664 с.
19. Беляева Л. А. Биохимия растений: тексты лекций по разделу «Растительные вещества вторичного происхождения» для студентов биологического факультета. Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2009. 108 с.

**THE RESEARCH OF THE QUALITY COMPOSITION
AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF YARROW PHENOLIC
COMPOUNDS UNDER CONDITIONS
OF TVER'S INDUSTRIAL POLLUTION**

N. A. Solovyeva, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov

Tver State University

Using a method UV spectroscopy, the quality analysis of phenolic compounds in extracts of yarrow growing in Tver's industrial areas was done. The antioxidant activity of polyphenols of yarrow ethanol extracts against a stable radical DPPH was investigated. It is established that the amount of plant antioxidants and their activity depend on the collection site of the studied plants.

Keywords: yarrow (*Achillea millefolium*), phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH, UV spectroscopy.

Об авторах:

СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна – аспирант 1 года обучения кафедры физической химии химико-технологического факультета Тверского государственного университета, e-mail: nattinata@mail.ru

ХИЖНЯК Светлана Дмитриевна – кандидат химических наук, ведущий инженер лаборатории спектроскопии ЦКП ТвГУ, e-mail: sveta_khizhnyak@mail.ru

ПАХОМОВ Павел Михайлович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой физической химии Тверского государственного университета, e-mail: pavel.pakhomov