

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ЭКСТРАКТАХ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

В.А. Волков, П.М. Пахомов

Тверской государственной университет

*Выполнен количественный анализ общего содержания веществ с антирадикальной активностью в спиртовых экстрактах листьев 5 лекарственных растений, которое уменьшается в ряду *Hypericum perforatum* > *Tanacetum vulgare* = *Plantago major* = *Achillea millefolium* > *Pinus sylvestris* (хвоя второго года). Среднее количество антирадикальных компонентов в листьях *Hypericum perforatum* в 9 раз превышает таковое в хвое *Pinus sylvestris*. Установлено, что реакционная способность экстрактивных веществ в отношении радикала ДФПГ уменьшается в ряду *Achillea millefolium* > *Tanacetum vulgare* > *Hypericum perforatum*. Относительно высокая концентрация антирадикальных антиоксидантов в листьях зверобоя обусловлена высокой долей веществ с низкой реакционной способностью в отношении радикала ДФПГ.*

Поиск и исследование перспективных природных источников веществ, обладающих антирадикальной (АРА) и антиоксидантной (АОА) активностью, является весьма актуальной задачей. Нарушение естественного баланса скорости свободнорадикального окисления и активности антиоксидантной защиты организма, возникающее под воздействием неблагоприятных факторов (загрязнение окружающей среды, хронический эмоциональный стресс, высокое содержание легкоусвояемых углеводов и жиров в рационе с одновременным снижением содержания биоантиоксидантов), по данным многих исследований, играет важную роль в патогенезе многих заболеваний – сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных, эндокринных [3; 9– 1].

В настоящей работе авторами была поставлена задача сопоставить антирадикальные свойства спиртовых экстрактов высушенных листьев пяти лекарственных растений: *Hypericum perforatum*, *Tanacetum vulgare*, *Achillea millefolium*, *Plantago major* и *Pinus sylvestris* (хвоя второго года). Препараты на основе этих растений используются в традиционной и народной медицине при лечении многих заболеваний [5–8; 14]. Антиоксидантные или антирадикальные свойства были ранее обнаружены у экстрактов листьев подорожника, тысячелистника, пижмы и зверобоя.

**Материалы и методы исследования.** Образцы для анализов были собраны в Максатихинском и Калининском районах Тверской области в период цветения в 2004–2007 гг. и высушены при  $t=40^{\circ}\text{C}$  и принудительной вентиляции [2] (электросушилка «Суховей»).

Для анализа количественного содержания в экстрактах веществ, обладающих антирадикальными свойствами, был применен широко распространенный в исследовательской практике метод, основанный на взаимодействии этих веществ со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) [4; 13; 15]. При взаимодействии с антирадикальными АО (фенольные соединения, тиолы, ароматические амины, аскорбиновая кислота) ДФПГ переходит в нерадикальную форму, что сопровождается исчезновением максимума поглощения при  $\lambda=517$  нм в видимой области спектра.

Экстракция измельченного в течение 30 с в шаровой мельнице материала производилась 95% этанолом в течение 30 мин при непрерывном встряхивании с частотой  $180 \text{ мин}^{-1}$ . Соотношение навески и растворителя 1:120 (масса/объем).  $8,7 \cdot 10^{-5}$  М раствор ДФПГ (Sigma-Aldrich,  $\omega=97\%$ ) в этаноле, очищенном перегонкой, готовили

непосредственно перед экспериментом. Из исходного экстракта готовили серию последовательных разбавлений; 0,8 мл каждого из полученных растворов серии приливали к 2,4 мл раствора ДФПГ, и через 30 мин регистрировали значения оптической плотности при  $\lambda=517$  нм на спектрофотометре «Specord M40» (Carl Zeiss Jena, ГДР) [1]. В контрольном опыте вместо экстракта в реакционную систему вводили чистый этанол. По графику зависимости процента падения оптической плотности раствора ДФПГ в опыте по сравнению с контролем (Р1) от коэффициента разбавления исходного экстракта методом линейной интерполяции определяли значение коэффициента разбавления, необходимое для достижения концентрации экстракта  $IC_{50}$ , при которой падение оптической плотности за первые 30 мин реакции составляет 50%. Этот коэффициент разбавления служил мерой относительного содержания в образце веществ, обладающих антирадикальной активностью.

Средние значения и средние квадратические отклонения рассчитывали, исходя из анализов не менее трех экстрактов, приготовленных из образцов, собранных в разных местах обитания.

Кинетические кривые падения оптической плотности ДФПГ при взаимодействии с экстрактивными веществами растений записывали при температуре  $293 \pm 1$  К (использовали термостатируемые кюветодержатели). В кювету вводили 0,4 мл экстракта с концентрацией  $2 \cdot IC_{50}$ , 0,4 мл 0,4 М раствора уксусной кислоты в этаноле, 2,4 мл  $8,7 \cdot 10^{-5}$  М раствора ДФПГ в этаноле и быстро перемешивали содержимое кюветы. Кислота, подавляя ионизацию фенольных антиоксидантов, блокирует механизм SPLET (более быстрый) реакции ДФПГ с фенолами [12] и, таким образом, значительно снижает скорость реакции, облегчая проведение кинетических исследований. Кроме того, получаемые таким образом данные более адекватны с точки зрения сути изучаемой проблемы, поскольку алкоксильные, пероксильные, гидроксильные и другие нестабильные радикалы, способные к продолжению реакций цепного перекисного окисления липидов, отрывают атом водорода от молекулы липида по механизму НАТ, которой не подавляется введением кислоты в наших опытах. Оптимум концентрации 50 мМ подобран авторами экспериментально.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Данные по количественному анализу суммы антирадикальных АО, а также литературные сведения о содержащихся в исследуемых частях растений группах веществ, являющихся потенциальными антиоксидантами с точки зрения их химического строения, представлены в таблице. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что различия в количественном содержании антирадикальных АО в листьях растений разных видов могут быть весьма значительными. Так, в листьях *Plantago major* этих веществ содержится в среднем в 9 раз больше, чем в хвое *Pinus sylvestris*. При этом среднее квадратическое отклонение в пределах образцов одного вида растения не превышает 60 %.

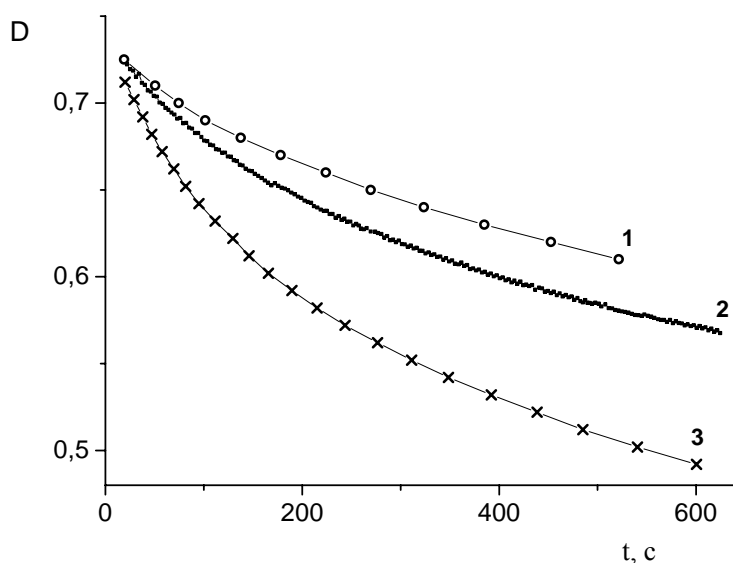
Однако кинетические кривые падения оптической плотности раствора ДФПГ при взаимодействии с антирадикальными АО экстрактов пижмы, зверобоя и тысячелистника, изображенные на рисунке, демонстрируют, что не следует количественное содержание антирадикальных компонентов в экстракте отождествлять с его антирадикальной активностью. Действительно, во всех проведенных нами опытах скорость взаимодействия антирадикальных экстрактивных веществ с ДФПГ убывало в ряду *Achillea millefolium* > *Tanacetum vulgare* > *Hypericum perforatum* (самая пологая кривая), несмотря на значительное превосходство зверобоя по количественному содержанию АО. По-видимому, высокая концентрация АО в листьях зверобоя достигается в основном за счет относительно малоактивных веществ.

Таблица

Относительные концентрации антирадикальных АО  
в листьях пяти лекарственных растений и данные литературы об их составе

Растение	Относительная концентрация антирадикальных АО	Потенциальные антирадикальные АО (литературные данные)

<i>Hypericum perforatum</i>	75±15	Витамины С, Е. Дубильные вещества 3,88 – 7,94 %. Флавоноиды (рутин 2%, кверцетин и др.). Лейкоантоцианидины. Антрахиноны (гиперицин и др.) Фенолкарбоновые кислоты (кофейная). Кумарины [6].
<i>Tanacetum vulgare</i>	20±10	Фенолкарбоновые кислоты (кофейная). Флавоноиды (зупателин, акацетин) [8].
<i>Achillea millefolium</i>	18±10	Дубильные вещества. Кумарины 0,19%. Флавоноиды 0,3%. Фенолкарбоновые кислоты. Флобафены [8].
<i>Plantago major</i>	18,4±0,8	Фенолкарбоновые кислоты (сиреневая, феруловая и др.). Флавоноиды (байкалеин, апигенин и др.). Тирозол [7;16].
<i>Pinus sylvestris</i> (хвоя второго года)	8,3±2,1	Витамины С, Е. Фенолы и их производные. Фенолкарбоновые кислоты (кофейная, хлорогеновая и др.). Лигнаны. Дубильные вещества (около 5%). Флавоноиды (кверцетин, рутин и др.). Процианидины [9].



Кинетические кривые реакций ДФПГ с антирадикальными АО экстрактов *Hypericum perforatum* (1), *Tanacetum vulgare* (2), *Achillea millefolium* (3)

Из данных литературы (см. таблицу) видно, что активность экстрактов исследуемых растений в отношении радикала ДФПГ обусловлена наличием фенольных соединений различного строения и аскорбиновой кислоты. Это подтверждается рядом исследований [13], в соответствии с которыми концентрация в растительных экстрактах веществ, активных в отношении радикала ДФПГ, коррелирует с содержанием общих фенолов. Однако практически все литературные данные по составу фенольных соединений носят только качественный характер, в силу чего невозможно сделать предположение о том, какие конкретные соединения вносят наибольший вклад в антирадикальную активность каждого из изучаемых экстрактов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков В.А., Дорофеева Н.А., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. Изучение кинетики взаимодействия антиоксидантов экстрактов лекарственных растений со стабильным радикалом ДФПГ // Тез. докл. VII Международ. конф. «Биоантиоксидант». М., 2006. С. 87–89.
2. Государственная фармакопея СССР, 11-е изд. М., 1990. Вып. 2.

3. *Дадали В.А.* Процессы перекисного окисления в организме и природные антиоксиданты // Введение в частную микронутриентологию / Под ред. Ю.П. Гичева, Э. Огановой Новосибирск, 1999.
4. *Китаева Д.Х., Туреханов Т.М., Ирискина Л.Б. и др.* Некоторые модельные реакции тестирования антиоксидантов. Черноголовка, 1987.
5. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Ranales – Thymelaeaceae. Л., 1985.
6. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Caryophyllales – Plantaginaceae. Л., 1990.
7. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). СПб., 1993.
8. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: Ч. I – Семейства Lycopodiaceae – Euphorbiaceae, ч. II – Дополнения к 1 – 7-му томам. СПб., 1996.
9. *Рыжикова М.А., Фархутдинов Р.Р., Загидуллин Ш.З.* Влияние лекарственных растений на процессы свободнорадикального окисления в модельных системах // Здравоохр. Башкортостана. 1998. № 5 – 6. С. 38 – 41.
10. *Ames B.N., Shigenaga M.K., and Hagen T.M.* Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 7915 – 7922.
11. *Halliwel B.* Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans // Free Rad. Res. 1996. V. 25. P. 57 – 74.
12. *Litwinenko G. and Ingold K.U.* Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstractions. I. The Reactions of Phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) in Alcohols // J. Org. Chem., 2003. V. 68. P. 3433 – 3438.
13. *Miliauskas G., Venskutonis P.R. and van Beek T.A.* Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts // Food Chem., 2004. V. 85, N. 2. P. 231-237.
14. *Samuelsen A.B.* The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review // J. Ethnopharm., 2000. V. 1. P. 1 – 21.
15. *Silva B. A., Ferreres F., Malva J. O., and Dias A. C. P.* Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts // Food Chem., 2005. V. 90, N.1 – 2, P. 157 – 167.

#### COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIRADICAL COMPONENTS IN SOME MEDICINAL PLANT EXTRACTS

**V.A.Volkov, P.M. Pakhomov**

Tver State University

A total amount of compounds with antiradical properties in alcoholic extracts of the leaves of five medicinal plants has been analysed. The order was *Hypericum perforatum* > *Tanacetum vulgare* = *Plantago major* = *Achillea millefolium* > *Pinus sylvestris* (second year needles). An average content of antiradical components in *Hypericum perforatum* leaves was 9 times higher than this value in the needles of *Pinus sylvestris*. It has been revealed that the reaction ability of compounds extracted from plant leaves toward DPPH radical decreases in following order: *Achillea millefolium* > *Tanacetum vulgare* > *Hypericum perforatum*. Relatively high antiradical antioxidant concentration in *Hypericum perforatum* leaves is due to high input of compounds with low reaction ability toward DPPH radical.