

УДК 66.061.3:544.421

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЯ НА АНТИРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Анохина И.Н., Скрыпник Л.Н.

*ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», Калининград,
e-mail: henrietta.amati@mail.ru*

Многие природные соединения, получаемые из лекарственных растений, обладают выраженным антиоксидантным действием. Антиоксиданты могут послужить фактором, позволяющим уменьшить окислительный стресс окружающей среды, который является следствием действия свободных радикалов, разрушающих клеточную систему организма. Эффективное извлечение активных природных соединений из растений зависит от типа растворителя, используемого при экстракции растительного сырья. В статье изучены вопросы влияния используемого экстрагента на антиоксидантные свойства растительных экстрактов некоторых лекарственных растений. В качестве объекта исследования использовали готовое сырьё восьми видов лекарственных растений: Melissa officinalis, Mentha pulegioides, Matricaria inodora, Lavandula angustifolia, Sambucus nigra, Salix alba, Hypericum perforatum, Lonicera xylosteum. Экстракция осуществлялась в одинаковых условиях индивидуальными растворителями (этанол 98%, диметилсульфоксид (ДМСО), ацетон, диэтиловый эфир). Антирадикальную активность определяли по способности растительных экстрактов связываться со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH). Показано, что кинетика протекания реакции DPPH-радикала с растительными экстрактами зависела как от используемого растворителя, прежде всего его полярности, так и от вида растения, то есть от качественного и количественного состава его антиоксидантных компонентов. Установлено, что наиболее выраженными антиоксидантными свойствами обладала липа сердцевидная при использовании в качестве экстрагентов ДМСО, этанола и ацетона. Максимальный выход антиоксидантов для всех исследуемых видов растений достигался при экстрагировании растительного сырья диметилсульфоксидом. При использовании диэтилового эфира извлечение веществ с антиоксидантными свойствами практически не происходило. Полученные результаты могут быть использованы при адаптации методики определения антиоксидантной активности с DPPH радикалом для растительных экстрактов, полученных при применении различных растворителей.

Ключевые слова: антиоксидант, антиоксидантная активность, лекарственные растения, растительное сырьё, метод DPPH

EFFECT OF SOLVENT ON ANTIRADICAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS

Anokhina I.N., Skrypnik L.N.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, e-mail: henrietta.amati@mail.ru

Many natural compounds obtained from medicinal plants have an antioxidant effect. Antioxidants can serve as a factor that reduces the oxidative stress of the environment, which is a consequence of the action of free radicals that destroy the body's cellular system. The effective extraction of active natural compounds from plants depends on the type of solvent used in the extraction. In this article the influence of the extractant on the antioxidant properties of the plant extract was studied. As an object of research the eight types of medicinal plants were used: lemon balm, common knotgrass, chamomile, black elderberry, blueberry, small-leaved linden, dwarf everlast and saussurea amara, purchased in the pharmacy network. The extraction was carried out under the same conditions by individual solvents (ethanol 98%, dimethylsulfoxide (DMSO), acetone, diethyl ether). Antiradical activity was determined by the ability of plant extracts to bind a stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. It was shown that the kinetics of the reaction of the DPPH radical with plant extracts depended both on the solvent, primarily its polarity, and on the plant species, that is, on the qualitative and quantitative composition of its antioxidant components. It was established that the extracts of small-leaved linden characterized by highest antioxidant activity especially by using dimethylsulfoxide, ethanol, and acetone as solvents. The maximum yield of antioxidants for all studied plant species was achieved by extraction with dimethylsulfoxide. By using of diethyl ether, the extraction of substances with antioxidant properties practically did not occur. The results of this work can be used to adapt the protocol of determination the antioxidant activity with the DPPH radical for plant extracts obtained with various solvents.

Keywords: antioxidant, antioxidant activity, medicinal plants, plant raw materials, DPPH method

В настоящее время применение целебных трав и аптечных сборов на их основе в традиционной и народной медицине особенно актуально, что обусловлено существенным преимуществом растений по сравнению с химическими медикаментозными препаратами. Главное из них – отсутствие побочных эффектов и комплексное воздействие на организм [1]. Лечебные эффекты

многих лекарственных растений можно объяснить наличием природных антиоксидантов. Антиоксидант – это соединение с одним непрочно присоединённым электроном, который легко отдаётся свободному радикалу, стабилизируя и нейтрализуя его молекулу, переводя её в устойчивое состояние [2].

Основными источниками антиоксидантов для человека являются продукты пита-

ния на основе растительного сырья. Растения обладают достаточной устойчивостью к окислительным повреждениям, которые возникают при резком изменении физиологического состояния организма. Это обусловлено существованием в растительной клетке эффективных антиоксидантов, которые способны обеспечить защиту от кислородных радикалов [3].

В литературе предлагается большое число методов анализа количества и активности антиоксидантов в различных объектах. В данной работе применялся метод DPPH, который широко используется для определения антиоксидантной активности природных веществ. Преимуществами DPPH метода определения антиоксидантной активности являются простота регистрации реакции, высокая воспроизводимость, общедоступность необходимого оборудования, высокая чувствительность [4]. Имеются литературные данные, которые утверждают, что данный метод ограничивается возможностью определения только жирорастворимых антиоксидантов [5]. Да и сама методика рассчитана на применение стандартных растворителей (вода, этанол и метанол) [6].

Таким образом, целью работы являлось изучение особенностей измерения антирадикальной активности растительных экстрактов при использовании различных растворителей с применением стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали готовое сырьё различных частей восьми видов лекарственных растений, приобретённых в аптечной сети: цветки бузины чёрной (*Sambucus nigra* L.), траву Melissa лекарственной (*Melissae officinalis* L.), цветки ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.), траву сосюрей горькой (*Saussurea amara* L.), траву горца птичьего (*Polygonum aviculare* L.), цветки липы сердцевидной (*Tilia cordata* L.) и побеги черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.).

Для определения антирадикальной активности (АОА) растительных экстрактов применялся метод DPPH [6]. Анализ основан на спектрофотометрическом определении изменения концентрации стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. В качестве растворителей использовали: диметилсульфоксид (х.ч.), этанол 98 % (ГОСТ

Р 51999-2002), ацетон (ос.ч.), диэтиловый эфир (х.ч.). Растворители обладают различной полярностью, что позволит экстрагировать из растительного сырья различные по структуре соединения. По полярности растворители можно распределить следующим образом: диэтиловый эфир < ацетон < этанол < диметилсульфоксид.

Для исследования антирадикальной активности лекарственных растений растительное сырьё массой 0,1 г растирали с 10 мл растворителя в фарфоровой ступке и количественно переносили в пробирку. Далее гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 6 тыс. об/мин при комнатной температуре. Из исходного экстракта готовили серию последовательных разбавлений: 0,25 мл каждого из полученных растворов серии приливали к 2,85 мл раствора DPPH и через 30 минут регистрировали значения оптической плотности при длине волны 515 нм на спектрофотометре (Shimadzu UV-3600, Япония). Каждый образец анализировали в трёх повторностях. В контрольном опыте вместо экстракта в реакционную систему вводили только растворитель. Исходя из полученных данных строили графики зависимости оптической плотности от количества исходного экстракта. Используя полученное уравнение кривой, вычисляли концентрацию экстракта, необходимую для реагирования 50% от исходной концентрации DPPH (EC_{50}). В качестве стандарта использовали растворы аскорбиновой кислоты и тролокса (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновой кислоты) известной концентрации. Тролокс является водорастворимым аналогом витамина Е и считается более предпочтительным стандартом при определении антирадикальных и антиоксидантных свойств экстрактов липофильных компонентов. Стандарт аскорбиновой кислоты используют для определения водорастворимых антиоксидантов. Данные по антирадикальной активности экстрактов лекарственных растений выражали в мг эквивалента аскорбиновой кислоты (АК) на грамм сухой массы (мг-экв. АК/г) и в мг эквивалента тролокса на грамм сухой массы (мг экв. тролокса/г).

Результаты исследования и их обсуждение

Для более точного определения концентрации в экстрактах растений веществ, активных в отношении радикала DPPH, необходимо было установить характер зависимости глубины превращения радикала

за первые 30 минут реакции от начальной концентрации антиоксидантов в реакционной системе. На графиках представлены кинетические кривые на примере экстрактов липы сердцевидной (рис. 1) и Melissa лекарственной (рис. 2) в зависимости от растворителей.

Как видно из представленных на рис. 1 данных, при использовании в качестве растворителей диметилсульфоксида (ДМСО) и ацетона в течение первых 10 минут на-

блюдалось резкое падение оптической плотности, затем реакция замедлялась, но не останавливалась полностью. При использовании этанола резкое падение наблюдалось в первые 15 минут реакции, затем реакция практически прекращалась. С диэтиловым эфиром лишь в самом начале процесса наблюдалось падение оптической плотности реакционной системы на незначительную величину, а затем реакция останавливалась.

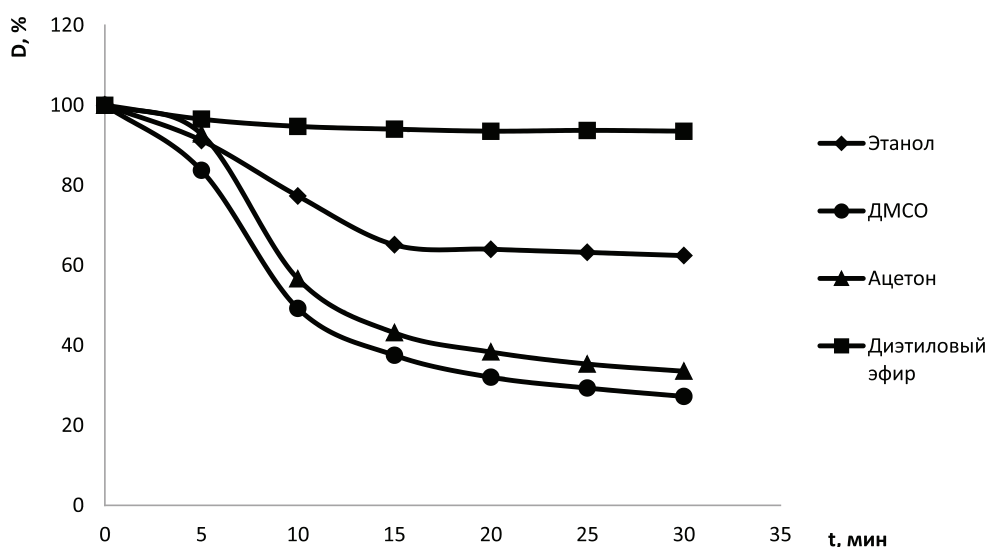


Рис. 1. Кинетические кривые оптической плотности раствора стабильного радикала DPPH при взаимодействии с АО экстрактов липы сердцевидной в среде разных растворителей

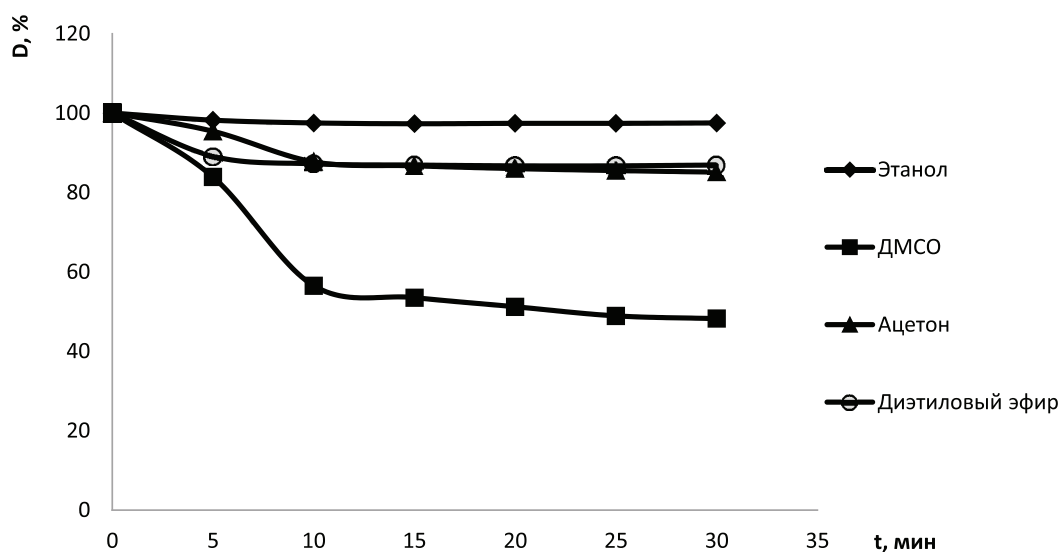


Рис. 2. Кинетические кривые оптической плотности раствора стабильного радикала DPPH при взаимодействии с АО экстрактов Melissa лекарственной в среде разных растворителей

Результаты исследования кинетических зависимостей протекания реакции взаимодействия DPPH-радикала с экстрактом Melissa лекарственной представлены на рис. 2. При использовании в качестве растворителя ДМСО наблюдалось резкое падение оптической плотности в течение первых 10 минут, затем реакция протекала очень медленно. С ацетоном и диэтиловым эфиром падение оптической плотности наблюдалось также первые 10 минут, затем реакция останавливалась. С этанолом реакция протекала очень медленно без существенных колебаний.

Антирадикальные свойства характеризуются количественным соотношением высоко- и низкоактивных компонентов [4]. Это соотношение отражает форма кинетической кривой. За начальные участки кривых отвечают более активные компоненты экстрактов.

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что ДМСО, как более полярный по сравнению с другими растворителями, извлекает больше веществ, обладающих антирадикальной способностью. Это подтвердилось и в ходе сравнительного анализа антирадикальных свойств экстрактов различных лекарственных растений. Резуль-

таты данного исследования представлены в табл. 1–2 в виде средних значений с указанием стандартного отклонения.

Как видно из табл. 1–2, антирадикальная активность экстрактов лекарственных растений зависела от используемого растворителя. Так, при использовании в качестве растворителей ДМСО и этанола наибольшую антирадикальную активность проявляли экстракты липы сердцевидной, наименьшую – сосюреи горькой. Например, при использовании в качестве экстрагента ДМСО антирадикальная активность для липы составила $110,7 \pm 1,30$ мг·экв. АК/г и $153,4 \pm 1,45$ мг экв. тролокса/г, тогда как для сосюреи горькой эти показатели были практически в 4 раза ниже – $28,3 \pm 4,12$ мг·экв. АК/г и $36,7 \pm 3,95$ мг·экв. тролокса/г.

В целом анализ полученных результатов позволяет расположить изученные растения в зависимости от АОА их экстрактов при использовании различных растворителей следующим образом (в порядке возрастания):

При использовании ДМСО: трава сосюреи < цветки ромашки < цветки бузины < цветки бессмертника < трава Melissa < трава горца < побеги черники < цветки липы.

Таблица 1

Значение антирадикальной активности растительного сырья в зависимости от растворителя (стандарт – аскорбиновая кислота)

Анализируемый объект	АОА в зависимости от растворителя, мг·экв. АК/г			
	ДМСО	Спирт 98%	Ацетон	Диэтиловый эфир
Липа сердцевидная	$110,7 \pm 1,30$	$72,9 \pm 2,41$	$76,5 \pm 1,91$	$1,3 \pm 0,24$
Ромашка аптечная	$32,7 \pm 0,74$	$6,2 \pm 0,31$	$5,6 \pm 0,56$	$0,6 \pm 0,11$
Сосюрея горькая	$28,3 \pm 4,12$	$4,6 \pm 0,86$	$10,5 \pm 1,15$	$2,0 \pm 0,48$
Черника обыкновенная	$79,1 \pm 0,46$	$19,9 \pm 0,53$	$13,3 \pm 0,38$	$1,0 \pm 0,12$
Мелисса лекарственная	$75,0 \pm 1,72$	$5,9 \pm 1,21$	$13,6 \pm 1,62$	$3,5 \pm 0,51$
Бессмертник песчаный	$50,4 \pm 2,10$	$13,3 \pm 1,42$	$13,6 \pm 1,24$	$5,0 \pm 0,74$
Горец птичий	$77,2 \pm 1,85$	$12,2 \pm 1,11$	$18,4 \pm 0,78$	$1,1 \pm 0,22$
Бузина чёрная	$49,5 \pm 3,32$	$8,9 \pm 0,61$	$6,0 \pm 0,47$	$0,7 \pm 0,17$

Таблица 2

Значение антирадикальной активности растительного сырья в зависимости от растворителя (стандарт – тролокс)

Анализируемый объект	АОА в зависимости от растворителя, мг·экв. тролокса/г			
	ДМСО	Спирт 98%	Ацетон	Диэтиловый эфир
Липа сердцевидная	$153,4 \pm 1,45$	$115,0 \pm 2,72$	$78,4 \pm 2,00$	$1,4 \pm 0,22$
Ромашка аптечная	$45,2 \pm 0,82$	$9,9 \pm 0,28$	$5,7 \pm 0,66$	$0,8 \pm 0,17$
Сосюрея горькая	$36,7 \pm 3,95$	$7,6 \pm 0,81$	$10,8 \pm 1,17$	$2,2 \pm 0,44$
Черника обыкновенная	$114,0 \pm 0,67$	$24,6 \pm 0,61$	$13,6 \pm 0,36$	$1,1 \pm 0,10$
Мелисса лекарственная	$107,2 \pm 1,81$	$8,6 \pm 1,37$	$13,9 \pm 1,44$	$3,8 \pm 0,49$
Бессмертник песчаный	$70,0 \pm 2,34$	$18,4 \pm 1,51$	$14,0 \pm 1,31$	$5,4 \pm 0,70$
Горец птичий	$106,6 \pm 2,05$	$17,3 \pm 1,13$	$18,9 \pm 0,86$	$1,3 \pm 0,23$
Бузина чёрная	$64,4 \pm 3,49$	$12,4 \pm 0,54$	$6,2 \pm 0,46$	$0,9 \pm 0,15$

При использовании этанола: трава соссуреи < трава мелиссы < цветки ромашки < цветки бузины < трава горца < цветки бессмертника < побеги черники < цветки липы.

При использовании ацетона: цветки ромашки < цветки бузины < трава соссуреи < побеги черники < трава мелиссы < цветки бессмертника < трава горца < цветки липы.

При использовании диэтилового эфира: цветки ромашки < цветки бузины < побеги черники < трава горца < цветки липы < трава соссуреи < трава мелиссы < цветки бессмертника.

Кроме того, следует отметить, что при экстракции диэтиловым эфиром наблюдались очень низкие показатели антирадикальной активности для экстрактов всех исследуемых видов растений. Необходимо подчеркнуть, что при экстракции растительного сырья диэтиловым эфиром происходило заметное окрашивание экстрактов в зависимости от вида растения, так, например, экстракт бессмертника песчаного имел ярко-жёлтый цвет, а мелиссы лекарственной – зелёный. При этом при экстракции другими растворителями – окраска была более тусклой или цвет практически не менялся. Это свидетельствует о том, что диэтиловый эфир как растворитель извлекает вещества, которые практически не проявляют антирадикальной активности. Несмотря на то, что содержания экстрагированных веществ в экстрактах ацетона и этанола различны, их антирадикальные активности соизмеримы. Это обусловлено близкими показателями диэлектрической константы этих растворителей. Показатели антирадикальной активности между ними близки по сравнению с показателями при использовании ДМСО и диэтилового эфира.

Выводы

1. Кинетика протекания реакции радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с растительными экстрактами зависела как от используемого растворителя, прежде всего от его полярности, так и от вида растения,

то есть от качественного и количественного состава его антирадикальных компонентов.

2. Наибольшей антирадикальной активностью из анализируемых лекарственных растений обладали экстракты цветков липы сердцевидной.

3. Диметилсульфоксид является оптимальным растворителем, способным наиболее полно извлечь из сырья природные антиоксиданты.

Список литературы

1. Исследование антиоксидантной активности растительности Ферганской долины / Д.М. Аронбаев [и др.] // Молодой учёный. – 2015. – Т. 84, № 4. – С. 30–34.
2. Сейфулла Р.Д. Антиоксиданты / Р.Д. Сейфулла, Е.А. Рожкова, Е.К. Ким // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 3. – С. 60–64.
3. Чупахина Г.Н. Природные антиоксиданты: монография / Г.Н. Чупахина, П.В. Масленников, Л.Н. Скрыпник. – Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. – 112 с.
4. Волков В.А. Физико-химические закономерности взаимодействия 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с антиоксидантами растительного происхождения: автореф. дис. ... канд. хим. наук (02.00.04). – Тверь, 2010. – 20 с.
5. Мониторинг окислительного стресса в биологических объектах / М.Я. Ходос [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2017. – Т. 14, № 3. – С. 262–274.
6. Tonutare T. Possibilities to Affect Antioxidant Properties of Strawberries and Some Methodical Aspects in Their Determination: Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of agriculture / Tonu Tonutare. – Tartu. Estonian university of life sciences, 2015. – 150 p.

References

1. Issledovanie antioksidantnoj aktivnosti rastitel'nosti Fer-ganskoj doliny' / D.M. Aronbaev [i dr.] // Molodoy uchyony'j. – 2015. – T. 84, № 4. – pp. 30–34.
2. Sejfulla R.D. Antioksidanty' / R.D. Sejfulla, E.A. Rozhkova, E.K. Kim // E'ksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. – 2009. – T. 72, № 3. – pp. 60–64.
3. Chupaxina G.N. Prirodny'e antioksidanty': monografiya / G.N. Chupaxina, P.V. Maslennikov, L.N. Skry'pnik. – Kaliningrad: Izd-vo BFU im. I. Kanta, 2011. – 112 p.
4. Volkov V.A. Fiziko-ximicheskie zakonomernosti vzaimodejstviya 2,2-difenil-1-pikrilgidrazila s antioksidantami rastitel'nogo proisxozhdeniya: avtoref. dis. ... kand. xim. nauk (02.00.04). – Tver', 2010. – 20 p.
5. Monitoring oksislitel'nogo stressa v biologicheskix ob'ektax / M.Ya. Xodos [i dr.] // Vestnik ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki. – 2017. – T. 14, № 3. – pp. 262–274.
6. Tonutare T. Possibilities to Affect Antioxidant Properties of Strawberries and Some Methodical Aspects in Their Determination: Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of agriculture / Tonu Tonutare. – Tartu. Estonian university of life sciences, 2015. – 150 p.