

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ТАНИДОСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Е. И. Рябинина, Е. Е. Зотова, Н. И. Пономарева, А. П. Васильева

Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Аннотация. В статье представлены результаты исследования антиоксидантных свойств водных экстрактов лекарственных растений. Показано, что существенный вклад в антиоксидантную активность вносят таниды, причем гидролизуемые в большей степени. В случае совместного присутствия различных групп дубильных веществ наблюдается их взаимовлияние, в ряде случаев проявляется химический синергизм, а при достижении некоторой пороговой концентрации наблюдается антагонистический эффект.

Ключевые слова: дубильные вещества, антиоксидантная активность.

Abstract. The results of research on antioxidation properties of water extraction of herbs are presented in the article. It is shown that the tanides play an important role in antioxidation activity, and especially this concerns the hydrolysed tanides. The synergic action and interference is observed in case of presence of antagonistic effect takes place after the threshold concentration is reached.

Keywords: tannide, antioxidation activity.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие свободные радикалы и их роль в развитии заболеваний стали предметом многих исследований. Доказано, что они участвуют в развитии более 50 заболеваний, в том числе и трудно излечимых. Проблемы химической регуляции окислительного стресса и поиск биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью (АОА), находятся в центре внимания многих исследователей [1—4]. Природные антиоксиданты, как правило, подавляют реакции свободнорадикального окисления путем связывания свободных радикалов и образования стабильных химических соединений, создавая тем самым оптимальные условия для метаболизма и обеспечения нормального роста клеток и тканей. В ряде работ отмечено, что среди природных соединений антиоксидантную активность проявляют лекарственные травы, основными активными веществами которых являются полифенолы, в частности дубильные вещества [3, 4], представляющие собой сложную смесь близких по составу фенольных соединений и делящихся, по классификации К. Фрейзенберга, на две группы: гидролизуемые и конденсированные танины. Выделяют группы лекарственного растительного сырья, которые содержат только кон-

денсированные или только гидролизуемые дубильные вещества или их смеси [3, 4]. Сложный качественный и количественный состав настоев лекарственных трав затрудняет их анализ по величине антиоксидантной активности в отличие от водорастворимых индивидуальных соединений.

В настоящее время не разработан унифицированный стандартизованный метод определения АОА растительных экстрактов. Для оценки антиоксидантной активности экстрактов полифенолсодержащего растительного сырья представляет интерес амперометрический метод [5]. Данный метод имеет ряд преимуществ при определении АОА: время отдельного определения занимает несколько минут (без учета пробоподготовки); анализ (регистрация и обработка результатов) происходит в реальном времени. Чувствительность метода высокая, предел обнаружения полифенолов и флавоноидов на уровне нано-, пикограммов (10^{-9} — 10^{-12} г).

Цель данной работы — определение полифенольного состава и амперометрическое исследование антиоксидантной активности водных экстрактов наиболее широко используемых в медицинской практике лекарственных растений.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали готовое сырье надземной части пяти видов пряноароматических и эфиромасличных растений: череды

(*Satureja hortensis* L.), шалфея (*Salvia officinalis* L.), зверобоя (*Hypericum perforatum* L.), Melissa (*Melissa officinalis* L.), тысячелистника (*Achillea millefolium* L.), выпускаемых ЗАО фирма «Здоровье».

Водные экстракты готовились путем нагревания около 1,5 г сырья, измеренного на аналитических весах марки CAS CAUY имеющих I (специальный) класс точности по ГОСТ 24104-2001 и дискретность 0,1 мг, со 100 мл воды на водяной бане с обратным холодильником в течение 20 мин.

Обнаружение биологически активных веществ в исследуемых видах проводили с помощью качественных реакций (цветных и осадения) [6].

Количественное содержание конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ определяли потенциометрическим методом [7]. Процентное содержание дубильных веществ рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot K \cdot D \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{V_2 \cdot (100 - W) \cdot m},$$

где V_1 — объем 0.02М KMnO_4 , пошедшего на титрование, мл; V_2 — объем экстракта, взятого для титрования, мл; K — поправка на титр (по щавелевой кислоте); D — коэффициент пересчета на танин: для гидролизуемых дубильных веществ равен 0.004157, для конденсированных — 0.00582; V — общий объем экстракта, мл; m — масса навески сырья, г; W — влажность, %.

Величину АОА водных экстрактов растений оценивали амперометрическим методом на приборе «Цвет Яуза — 01-АА» разработки НПО «Химавтоматика». Сущность метода заключается в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале (1.3 В) и расходе элюента 1.200 мл/мин. При этом потенциале происходит окисление только групп -ОН природных антиоксидантов фенольной природы. Предварительно строили графическую зависимость сигнала образца сравнения (кверцетина) от его концентрации и с помощью полученной градуировки рассчитывали содержание фенолов в исследуемых образцах в единицах концентрации кверцетина. Расчет антиоксидантной активности (АОА, мг/г) исследуемого образца проводили по формуле:

$$AOA = \frac{CA \cdot V \cdot N}{m \cdot 1000},$$

где CA — величина антиоксидантной активности кверцетина по калибровочному графику, мг/дм³; V — объем анализируемой пробы, см³; m — навеска

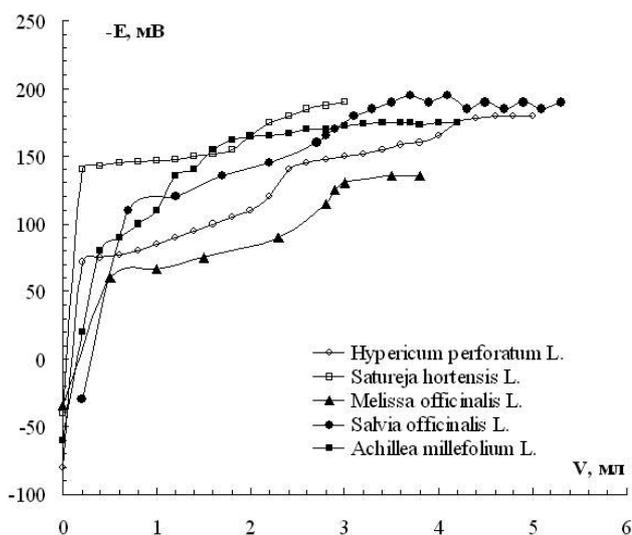


Рис. 1. Интегральные кривые титрования водных экстрактов лекарственных растений 0,02М раствором KMnO_4

анализируемого вещества, г; N — разбавление анализируемого образца.

Стандартное отклонение последовательных измерений анализируемых проб не превышало 3%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С помощью качественных химических реакций установлено наличие в исследуемых экстрактах флавоноидов (проба Синода), а также дубильных веществ, причем *Satureja hortensis* L. содержит только конденсированные, а *Melissa officinalis* L. только гидролизуемые дубильные вещества, остальные — их смеси.

Количественное содержание отдельных групп танидов в исследуемых образцах устанавливали методом потенциометрического титрования.

На рис. 1. представлены интегральные кривые титрования водных экстрактов лекарственного сырья 0.02М раствором перманганата калия. На полученных зависимостях наблюдается смещение потенциала в сторону отрицательных значений до ~ -180 мВ, при этом отмечается наличие не очень резкого, но заметного скачка потенциала. Для *Melissa officinalis* L. и *Satureja hortensis* L. характерно наличие одного перегиба при -110 мВ и -160 мВ соответственно, у остальных — два перегиба при этих же потенциалах. Отсутствие достаточно четкого скачка потенциала не позволяет достоверно определить точки эквивалентности. Для этого по полученным результатам были построены дифференциальные кривые титрования в координатах $dE/dV - V$ (рис. 2).

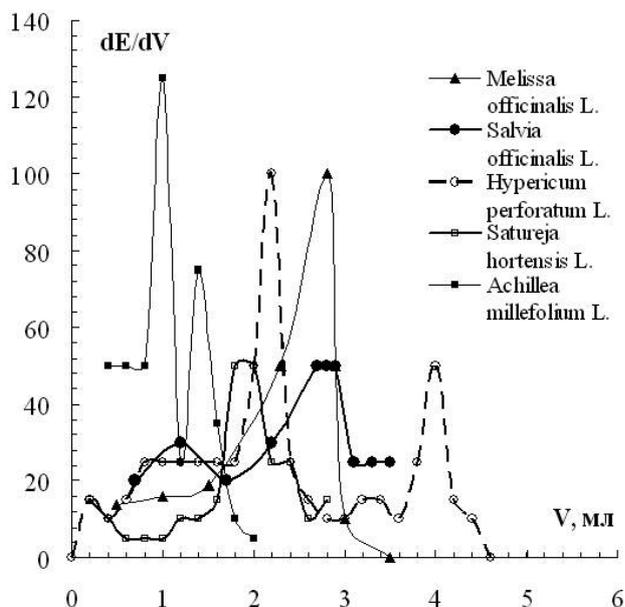


Рис. 2. Дифференциальные кривые титрования водных экстрактов лекарственных растений

Присутствие на дифференциальной кривой потенциометрического титрования двух максимумов свидетельствует о наличии двух окислительно-восстановительных процессов и отвечает окислению разных групп дубильных веществ. Максимум, при потенциале ~ -110 мВ, отвечает окислению гидролизуемых танидов, а при потенциале ~ -160 мВ — конденсированных [7]. Исходя из полученных зависимостей определен объем титранта, идущего на титрование экстрактов при данных потенциалах и рассчитано процентное содержание гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ. Результаты количественного определения танидов представлены в табл. 1.

В результате эксперимента амперометрическим методом была определена антиоксидантная активность растительных экстрактов. Данные опытов (табл. 1) показывают, что АОА водных извлечений убывает в ряду: *Hypericum perforatum* L. > *Salvia officinalis* L. > *Melissa officinalis* L. > *Satureja hortensis* L. > *Achillea millefolium* L.

Представляет интерес установление вклада каждого составляющего смеси компонента в антиоксидантную активность. Для этого исследовалась зависимость АОА от содержания, как разных групп дубильных веществ, так и суммарной танинокатехиновой составляющей. Исходя из полученных данных (табл.1) не обнаруживается корреляции между АОА и содержанием отдельных групп танидов, что, по-видимому, связано с их взаимодействием друг на друга. Однако, наблюдается зависимость антиоксидантной активности от суммарного содержания дубильных веществ (рис. 3). Поскольку исследуемые извлечения представляют собой довольно сложную многокомпонентную систему, в которой наряду с дубильными веществами, присутствуют флавоноиды, аскорбиновая кислота [8], анализ влияния которых на АОА не проводился, то полагаем, что можно говорить лишь о некоторой эффективной величине АОА растительных извлечений. Тем не менее, исходя из данных, представленных на рис. 3, можно утверждать, что существенный вклад в общую АОА экстрактов вносят таниды [8].

Поскольку химический состав сырья различен антиоксидантные свойства водных экстрактов оценивали для танидов разного класса. Так выявлено, что при одинаковом содержании дубильных веществ в *Melissa officinalis* L. и *Satureja hortensis*

Таблица 1

Антиоксидантная активность водных экстрактов и количественное содержание дубильных веществ в лекарственных растениях (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

Сырье	АОА мг/г	Содержание дубильных веществ (ДВ), %		
		сумма	конденсированные (КДВ)	гидролизуемые (ГДВ)
<i>Achillea millefolium</i> L.	23.516	2.8400±0.0180	1.5800±0.0800	1.2600±0.1100
<i>Satureja hortensis</i> L.	26.868	4.4600±0.0130	4.4600±0.0130	—
<i>Melissa officinalis</i> L.	37.770	4.5115±0.0030	—	4.5115±0.0030
<i>Salvia officinalis</i> L.	48.310	5.7680±0.0132	3.8350±0.0018	1.9330±0.0111
<i>Hypericum perforatum</i> L.	52.503	10.558±0.0412	6.9800±0.0190	3.5700±0.0210

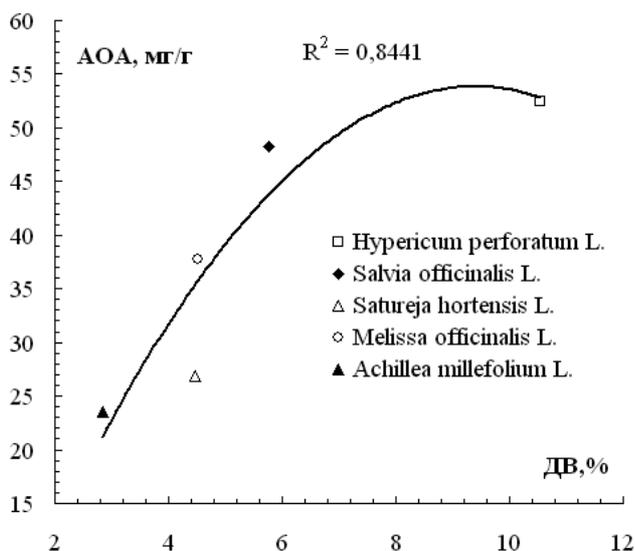


Рис. 3. Зависимости антиоксидантной активности от содержания дубильных веществ в растительных экстрактах

L. (~ 4.5%) антиоксидантная активность различна 37.770 мг/г и 26.868 мг/г соответственно, что связано с различной природой танидов.

Гидролизуемые танины в *Melissa officinalis* L. проявили более выраженную АОА, чем конденсированные в *Satureja hortensis* L.. С химической точки зрения, это объясняется тем, что гидролизуемые танины содержат больше гидроксильных групп в пересчете на одну молекулу: чем их больше, тем мощнее антиоксидант [3]. Следуя этому выводу можно было бы ожидать увеличение антиоксидантной активности в водных экстрактах лекарственных трав с увеличением относительного количества гидролизуемых танинов при совместном присутствии обеих групп дубильных веществ. Для этого нами была рассчитана АОА отдельных групп танидов из условия аддитивности их содержания в экстрактах, по формуле:

$$АОА_{расч.} = КДВ \% \cdot K_1 + ГДВ \% \cdot K_2,$$

где КДВ % и ГДВ % — процентное содержание конденсированных и гидролизуемых соответственно танидов в водных экстрактах; K_1 и K_2 — коэффициенты пересчета АОА на 1% танина: для гидролизуемых дубильных веществ равен 8.372, для конденсированных — 6.024, рассчитанные исходя из содержания танидов разной природы в *Melissa officinalis* L. и *Satureja hortensis* L. и проявляемой ими антиоксидантной активности.

На рис. 4. приведена диаграмма, построенная по результатам измерения антиоксидантной активности в водных экстрактах лекарственных трав с танино-катехиновой составляющей (левая колон-

ка). Правая колонка — значение АОА, вычисленное из условия аддитивности.

Сравнительный анализ полученных результатов показывает, что для водных экстрактов содержащих дубильные вещества смешанной природы наблюдается отклонение экспериментально полученных значений антиоксидантной активности от вычисленных, как в сторону увеличения, так и в сторону их уменьшения (*Hypericum perforatum* L.). Данные результаты свидетельствуют о проявлении химического синергизма фенольных компонентов экстрактов этих трав. Однако, в случае с *Hypericum perforatum* L. снижение АОА может быть обусловлено скрытой коагуляцией, которая более характерна для конденсированных танидов, т.е. при превышении некоторой пороговой величины их концентрации антиоксидантный эффект сменяется прооксидантным [9].

Механизм влияния отдельных групп танидов при их совместном присутствии на антиоксидантную активность достаточно сложен, пока не выявлен и будет являться темой отдельного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена сравнительная оценка антиоксидантных свойств водных экстрактов пяти распространенных лекарственных трав. Установлено, что существенный вклад в антиоксидантную активность вносят таниды.

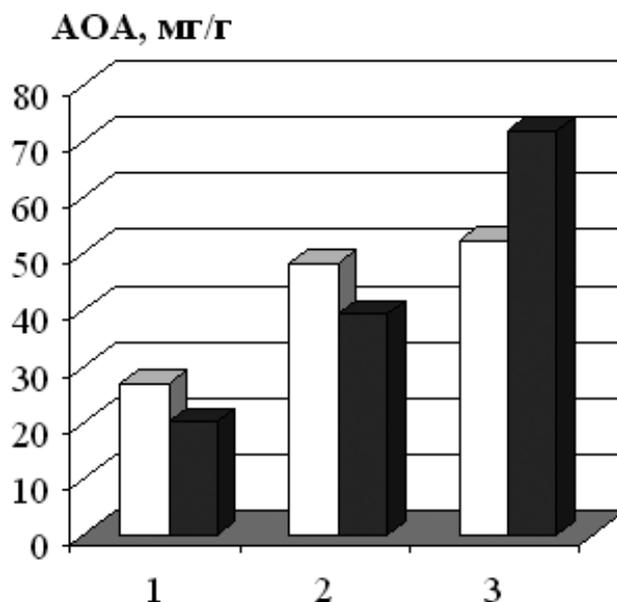


Рис. 4. Антиоксидантная активность водных экстрактов лекарственных трав. Левый столбик — измеренное значение в указанных смесях, правый — вычисленное значение из условия аддитивности. 1 — *Achillea millefolium* L.; 2 — *Salvia officinalis* L.; 3 — *Hypericum perforatum* L.

Выявлено, что гидролизуемые танины обладают большей АОА, чем конденсированные дубильные вещества.

Установлено, что при совместном присутствии различных групп дубильных веществ в ряде случаев проявляется химический синергизм, а при достижении некоторой пороговой концентрации наблюдается антагонистический эффект.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Зенков Н. К.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. — М., 2001. — 343 с.
2. *Голотин В. Г.* Биоантиоксиданты и их роль в жизнедеятельности организма / В. Г. Голотин, В. А. Голотин // Валеология. — 1995. Вып 2. С. 49—63.
3. *Прида А. И.* Природные антиоксиданты полифенольной природы (антирадикальные свойства и перспективы использования) / А. И. Прида, Р. И. Иванова // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. — 2004, №2. — С. 76—78.
4. *Рыжикова М. А.* Влияние водных извлечений из лекарственных растений на процессы свободно-радикального окисления / М. А. Рыжикова, Р. Р. Фархут-

динова, С. В. Сибиряк, Ш. З. Загудиллин // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 1999. Т. 62, №2. С. 36—38.

5. *Яшин А. Я.* Определения содержания природных антиоксидантов в пищевых продуктах и БАДах / А. Я. Яшин, Н. И. Черноусова // Пищевая промышленность. — 2007. №5. С. 28—30.

6. *Гринкевич Н. И.* Химический анализ лекарственных растений / Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. — М.: Высшая школа, 1983. — 175 с.

7. *Рябинина Е. И.* Сравнительное исследование Melissa лекарственной и шалфея лекарственного на содержание полифенолов / Е. И. Рябинина, Е. Е. Зотова, Н. И. Пономарева, С. В. Рябинин // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2009. — №2. — С. 32—36.

8. *Лапин А. А.* Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения / А. А. Лапин, М. Ф. Борисенков, А. П. Карманов, И. В. Бердник, Л. С. Кочева, Р. З. Мусин, И. М. Магдеев // Химия растительного сырья. 2007. №2. С. 79—83.

9. *Gutteridge V.* Oxygen damage in biological systems / V. Gutteridge, T. Westermarck, B. Halliwell // Free radical, Aging and Degenerative Disease. Ed. By Yohson Y., New York, 1986.

Рябинина Елена Ивановна — к.х.н., ассистент кафедры неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732)437688, e-mail: ryabinina68@mail.ru

Зотова Елена Евгеньевна — к.х.н., старший преподаватель кафедры неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732) 437688

Пономарева Наталья Ивановна — д.х.н., зав. кафедрой неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732) 437688

Васильева Анна Петровна — студентка I курса фармацевтического факультета Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко

Ryabinina Elena I. — candidate of chemical sciences (Ph.D.), assistant of chair of inorganic and physical chemistry at the Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732) 437688, e-mail: ryabinina68@mail.ru

Zotova Elena E. — candidate of chemical sciences (Ph.D.), head assistant of chair of inorganic and physical chemistry at the Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732)437688.

Ponomareva Natalia I. — doctor of chemical sciences, head of chair of inorganic and physical chemistry at the Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732)437688.

Vasileva Anna P. — student of the 1st year of pharmaceutical faculty at the Voronezh N. N. Burdenko State Medical Academy