

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫБОРОЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ КУК ФЫОНГ И КАТ ТЬЕН (ВЬЕТНАМ)

ВОЛОДИН В.В.⁽¹⁾, ВО ТХИ ХОАЙ ТХУ⁽²⁾, ВОЛОДИНА С.О.⁽¹⁾, ВУ ТХИ ЛОАН⁽²⁾

1. ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в процессе тканевого дыхания, основного способа получения энергии в митохондриях в форме молекул... (АТФ), от окисляемого вещества отнимаются два атома водорода (два протона и два электрона) и по дыхательной цепи, состоящей из ферментов и коферментов, передаются на молекулярный кислород, доставляемый кровью из воздуха, с образованием молекулы воды. Однако при этом часть кислорода превращается в активные формы, или свободные радикалы (гидроксил радикал $\text{HO}^\cdot$, супероксид радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, перекись водорода H_2O_2 и другие), которые, обладая высокой химической активностью, вызывают реакции свободно-радикального окисления, затрагивая молекулы белков, липидов и нуклеиновых кислот. Свободные радикалы, окисляя чужеродные мембранные белки и липиды патогенных микроорганизмов, выполняют защитную функцию. Однако в условиях внешних повреждающих факторов, например, ионизирующего излучения и УФ-облучения, а также таких внутренних факторов, как высокие физические и психические нагрузки, хронический стресс, происходит избыточное образование свободных радикалов, которые, разрушая мембраны и ... (ДНК) в организме человека, приводят к развитию окислительного стресса и возникновению заболеваний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, катаракта, нейродегенеративные заболевания и т.д. Образованию избыточного количества радикалов в организме препятствует антиоксидантная защитная система: ферменты супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, а также витамины А, С и Е. В условиях окислительного стресса рекомендован также дополнительный прием экзогенных антиоксидантов, которые подразделяются на два типа - индукторы активности ферментов антиоксидантной защиты (например, многие вещества-адаптогены- тритерпеновые и стероидные гликозиды, экидистериолы) и вещества - ловушки свободных радикалов (витамин Е, полифенолы и биофлавоноиды растений). К настоящему времени выявлена антиоксидантная активность в экстрактах многих видов растений и установлена природа веществ, ответственных за антиоксидантное действие. Вместе с тем, поиск новых источников антиоксидантов остается актуальной областью исследований. Полагая, что биосинтез полифенолов и флавоноидов в растениях может увеличиваться в условиях повышенной инсоляции и УФ-излучения, считается, что более выраженными антиоксидантными свойствами обладают растения субтропиков и тропиков, а также растения, произрастающие в условиях гор. Настоящая работа посвящена изучению содержания полифенолов и флавоноидов, а также их вклада в антиоксидантную активность у выборочных видов растений флоры Вьетнама.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение экстрактов растений

Образцы растений были собраны на территории Северного и Южного Вьетнама в национальных парках Кук Фьонг и Кат Тьен. Образцы растений высушивали при 50°C, затем измельчали до однородного состояния. Для приготовления спиртовых экстрактов к 1 г образца добавляли 30 мл 96%-ного этанола, и смесь выдерживали при комнатной температуре в течение суток. После этого экстракт фильтровали. Процедуру экстракции повторяли дважды, экстракты объединяли и выпаривали досуха на роторном испарителе при пониженном давлении и температуре не выше 50°C.

2.2. Определение общего содержания полифенолов

Общее содержание фенольных веществ в исходных образцах определялось спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу (ФЧ) при длине волны 765 нм. Суммарное содержание полифенолов выражали в миллиграммах галловой кислоты в 10 мг сухого экстракта. Для построения калибровочной кривой использовали 0,1%-ный раствор галловой кислоты, на основе которого готовили серию растворов с концентрациями 10, 20, 30, 40 и 50 мкг/мл. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду вместе реактива ФЧ (рис. 1) [2, 7, 10, 12].

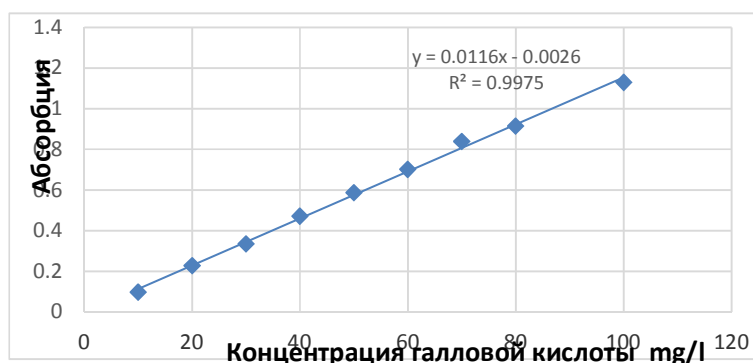


Рис 1. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности стандартных растворов галловой кислоте от концентрации в них галловой кислоты

2.3. Определение общего содержания флавоноидов

Общее содержание флавоноидов определяли колориметрическим методом, основанном на образовании флавоноид-алюминиевого комплекса, при $\lambda = 415$ нм. Суммарное содержание флавоноидов выражали в миллиграммах кверцетина в 10 мг сухого экстракта. Для построения калибровочной кривой использовали раствор 0,1 г кверцетина в 100 мл 80%-ного этилового спирта. Готовили серию растворов с концентрациями 10, 20, 30, 40 и 50 мкг/мл. Для получения флавоноид-алюминиевого комплекса использовали 0,5 мл вышеупомянутых растворов раствора, к ним добавляли 1,5 мл 95%-ного этанола, 0,1 мл 1%-ного раствора хлорида алюминия, 0,1 мл

1М раствора ацетата калия и 2,8 мл дистиллированной воды. Раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. Далее измеряли оптическую плотность при длине волны 445 нм. Аналогично готовили раствор изучаемых экстрактов растений (рис.2) [4, 8].

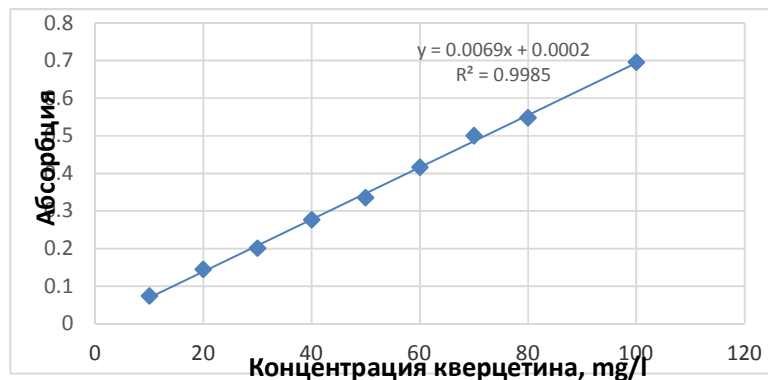


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности стандартных растворов кверцетина от концентрации в них кверцетина

2.4. Определение антиоксидантной активности с перекисью водорода

В начале готовили раствор перекиси водорода с концентрацией 40 мМоль в фосфатном буфере с pH 7,4. Экстракт смешивали с водой в концентрации 0.1 мг/мл. К 1 мл раствора экстракта добавляли 0,6 мл раствора перекиси водорода. Полученный раствор выдерживали в течение 10 мин, после чего определяли оптическую плотность при длине волны 230 нм. В качестве раствора сравнения использовали фосфатный буфер без добавления перекиси водорода [6, 8]. Антирадикальную активность ($A\%$) рассчитывали по формуле: $A\% = (1 - A_{\text{обр.}} / A_{\text{контр.}}) \times 100\%$

где: $A_{\text{контр.}}$ - оптическая плотность раствора сравнения;

$A_{\text{обр.}}$ - оптическая плотность образца

2.5. Определение антиоксидантной активности с помощью DPPH

Метод основан на способности веществ, содержащихся в растительных экстрактах, связывать свободный радикал 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH). Для этого 10 мг экстракта помещали в мерную колбу на 100 мл и добавляли этанол до метки. Отбирали 0,2 мл раствора в пробирку и добавляли 3 мл раствора DPPH с концентрацией 25 мг/л. Для контроля брали 0,2 мл этанола и 3 мл раствора DPPH той же концентрации. Нулевой раствор готовили путем добавления к 0,2 мл раствора 3 мл этанола. Все три пробирки выдерживали 20 минут в темноте при комнатной температуре. После этого измеряли оптическую плотность при длине волны 517 нм [1, 11]. Антирадикальную активность ($A\%$) рассчитывали по формуле:

$$A\% = [(1 - (A_{\text{обр.}} - A_{\text{нулевой}}) / A_{\text{контр.}})] \times 100$$

где: $A_{\text{контр.}}$ - оптическая плотность контроля;

$A_{\text{нулевой}}$ - оптическая плотность нулевого раствора;

$A_{\text{обр.}}$ - оптическая плотность образца.

2.6. Статическая обработка данных

Измерения проводились в трехкратной повторности, экспериментальные данные обработаны с помощью программы Microsoft Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения антиоксидантной активности и вклада в это действие полифенолов и флавоноидов авторами были исследованы образцы выборочных видов растений флоры Вьетнама, в которых авторы ранее обнаружили фитоэкдистероиды: *Vitex leptobotris* и *V. stylosa* (Verbenaceae), *Sida rhombifolia* (Malvaceae), *Cyathula prostrata* и *Achyranthes bidentata* (Amaranthaceae), а также другие выборочные виды (таблица 1).

Известно, что значительным антиоксидантным действием обладают полифенолы и флавоноиды. По результатам авторов исследований наибольшее количество полифенолов содержится в метанольном экстракте коры дерева *Sandoricum Koetjape* (Meliaceae) (3,4 мг/10 мг сухого экстракта), несколько меньшее количество содержится в листьях этого вида (2,2 мг). Повышенное содержание полифенолов было также обнаружено в метанольных экстрактах биомассы *Teucrium viscidum* (Lamiaceae) (2,0 мг), листьях *Vitex leptobotris* и *V. stylosa* (соответственно, 1,5 и 1,3 мг) и биомассы *Commelina bengalensis* (1,1 мг). Самое высокое содержание флавоноидов найдено в метанольном экстракте листьев *Sandoricum Koetjape* (0,8 мг/10 мг сухого экстракта). Высокое содержание флавоноидов обнаружено также в метанольных экстрактах листьев *Teucrium viscidum* (0,7 мг), *Commelina bengalensis* (0,5 мг), *Vitex leptobotris* (0,4 мг) и *Sida acuta* (0,3 мг).

Следует отметить, что при использовании этанола в качестве экстрагента были получены аналогичные результаты по содержанию полифенолов и флавоноидов в ряду изученных видов растений, однако, несколько меньшие по абсолютному значению.

Антиоксидантную активность экстрактов изучаемых видов растений определяли двумя методами: 1) по способности нейтрализовать перекись водорода (H_2O_2) и 2) по способности ингибировать стабильный радикал 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH). В качестве препаратов сравнения использовали соответственно, витамин С и кверцетин (таблица 1). Как показали исследования авторов, по методике с использованием H_2O_2 , среди анализируемых растений выявились образцы с очень высокой антиоксидантной активностью, сравнимой с витамином С. Это этанольный экстракт листьев *Sandoricum Koetjape* (49,6%) и метанольный экстракт листьев *Teucrium viscidum* (49,6%). В тесте с использованием H_2O_2 высокая антиоксидантная активность была выявлена в экстрактах коры *Vitex stylosa* и *Sandoricum Koetjape*, листьях и стеблях *Achyranthes bidentata*, листьях *Vitex leptobotris* и *V. stylosa*, коры *Nageia fleuryi*, биомассы *Commelina bengalensis*.

Таблица 1. Общее содержание полифенолов (ОСП), флавоноидов (ОСФ) и данные антиоксидантной активности экстрактов выборочных видов растений Вьетнама

№ п/п	Вид растения	Часть растения	Содержание 20Е, %	ОСП, (мг ГК/10мг свэ)		ОСФ, (мг К/ 10мг свэ)		способность нейтрализовать Н ₂ О ₂ , %		Способность ингибировать DPPH, %	
				MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH
1	<i>Vitex stylosa</i> (Verbenaceae)	лист	0,15	1,3	1,0	0,2	0,1	37,3	30,1	7,3	6,5
		кора		1,3	1,0	0,1	0,1	45,2	42,1	3,1	2,6
2	<i>Vitex leptobotrys</i> (Verbenaceae)	лист	0,13	1,5	1,0	0,4	0,2	43,4	39,2	25,3	18,9
		кора		3,4	1,2	0,1	0,1	41,6	35,8	81,8	86,9
3	<i>Sandoricum Koetjape</i> (Meliaceae)	лист		2,2	1,2	0,8	0,5	23,2	38,2	30,0	23,8
4	<i>Crateva nurvala</i> (Capparaceae)	кора		0,4	0,7	0,1	0,05	34,2	29,6	24,5	16,3
		лист	0,28	0,9	0,8	0,3	0,3	13,2	11,2	15,2	12,9
5	<i>Sida acuta</i> (Malvaceae)	Ветки, стбель		0,4	0,4	0,1	0,04	9,2	8,7	4,5	3,0
6	<i>Commelina bengalensis</i> (Commelinaceae)	общая биомасса		1,1	1,0	0,5	0,4	31,0	28,8	21,1	18,3
7	<i>Teucrium viscidum</i> (Lamiaceae)	общая биомасса		2,0	1,6	0,7	0,6	49,6	40,3	60,0	52,8
8	<i>Nageia fleuryi</i> (Podocarpaceae)	кора	0,05	0,3	0,3	0,1	0,1	37,6	36,6	4,5	4,3
		стебель	0,05	0,2	0,1	0,1	0,04	43,2	38,6	3,0	2,9
9	<i>Achyranthes bidentata</i> (Amaranthaceae)	лист	0,02	0,2	0,2	0,02	0,01	45,4	40,4	5,0	4,4
		общая биомасса		0,01	0,01	0,01	0,01	10,2	10,0	15,0	14,2
		стебель	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	10,2	9,0	11,0	10,0
10	<i>Cyathula prostrata</i> (Amaranthaceae)	лист	0,11	0,01	0,01	0,01	0,01	9,2	9,2	11,8	10,6
		корень	0,36	0,01	0,01	0,01	0,01	11,0	10,0	16,1	15,1
11	Vitamin C							50			
12	Quercetin									94,2	

В экспериментах с DPPH наибольшую антирадикальную активность проявили этанольный и метанольный экстракты коры *Sandoricum Koetjape* (соответственно, 86,9 и 81,8%). Высокую антирадикальную активность показали оба экстракта биомассы *Teucrium viscidum* (60,0 и 52,8%). Повышенной антирадикальной активностью обладают экстракты листьев *Sandoricum Koetjape* и *Vitex leptobotris*, коры *Crateva nurvala*, биомассы *Commelina bengalensis*.

Связь между содержанием полифенолов, флавоноидов и антиоксидантной и антирадикальной активностью экстрактов наблюдается в случае *Sandoricum Koetjape* и *Teucrium viscidum*. В других случаях связь между содержанием полифенолов, флавоноидов и, возможно, других сопутствующих компонентов носит более опосредованный характер, т.к., например, антиоксидантная активность полифенолов и флавоноидов зависит от числа гидроксильных групп в молекуле. В антиоксидантное действие экстрактов растений родов *Vitex* и *Sida*, *Achyranthes bidentata* могут вносить вклад обнаруженные в них фитостероиды, для которых характерно это действие [9]. В будущих исследованиях следует более детально исследовать вклад полифенолов и экистероидов в адаптогенное и антиоксидантное действие рарабатываемых галеновых и новогаленовых препаратов на основе экистероидсодержащих растений рода *Vitex* и *Sida*.

Большую перспективу для углубленных фитохимических и фармакологических исследований представляет сантол (*Sandoricum Koetjape*, сем. *Meliaceae*), в экстрактах листьев и коры которого авторами было выявлено большое количество полифенолов и флавоноидов, а также установлено выраженное антиоксидантное и антирадикальное действие. Сантол - вечно-зелёное быстрорастущее плодовое дерево высотой 15÷45 м, произрастающее во Вьетнаме, Камбодже, Южном Лаосе и Малайском полуострове Юго-Восточной Азии. Плоды сантола, которые называют также дикими мангостинами, съедобны в свежем виде. Из них изготавливаются джемы, желе, мармелад и алкогольные напитки. Листья и кора сантола используется в медицине для приготовления припарок, некоторые части листьев обладают противовоспалительным действием [7]. Также было обнаружено, что экстракты из коры сантола имеют противораковый эффект [3, 5].

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изучено всего 10 видов растений, среди которых были виды, содержащие фитоэкдистероиды. При сравнении содержания суммы полифенолов и флавоноидов в метанольных и этанольных экстрактах коры и листьев было установлено, что наибольшее количество полифенолов содержится в метанольном экстракте коры и листьях плодового дерева *Sandoricum Koetjape* (Meliaceae) (3,4 мг/10 мг сухого экстракта). Самое высокое содержание флавоноидов найдено в метанольном экстракте листьев *Sandoricum Koetjape* (0,8 мг/10 мг сухого экстракта). Высокая антиоксидантная активность экстрактов наблюдается в случае *Sandoricum Koetjape* (49,6% для экстракта листьев с использованием перекиси водорода и соответственно, 86,9 и 81,8% для этанольный и метанольный экстракты коры с DPPH). Для дальнейших фитохимических и фармакологических исследований большой интерес представляет кора и листья древесного растения сантол (*Sandoricum Koetjape*, сем. Meliaceae), плоды которого съедобны, а в экстрактах листьев и коры которого выявлено большое количество полифенолов и флавоноидов. В будущих исследованиях следует также более детально исследовать вклад полифенолов и экдистероидов в адаптогенное и антиоксидантное действие разрабатываемых препаратов на основе растений родов *Vitex* и *Sida*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Đặng Xuân Cường, Vũ Ngọc Bội, Trần Thị Thanh Vân và Ngô Đăng Nghĩa. *Sàng lọc hoạt tính kháng oxi hóa của 1 số loài rong nâu Sargassum ở Khánh Hòa, Việt Nam*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 2013, **25**:36-42.
2. Lê Trung Hiếu, Trương Thị Như Tâm, Nguyễn Thị Ánh Huyền, Lê Thùy Trang. *Bước đầu nghiên cứu đánh giá khả năng kháng oxy hóa của một số đối tượng làm nguồn dược liệu*, Tạp chí khoa học và công nghệ, trường ĐH Huế, 2014, **1**(1):22-30.
3. Aisha A.F.A., Sahib H.B., Abu-Salah K.M., Darwis Y. and Abdul Majid A.M.S., *Cytotoxic and Anti-Angiogenic Properties of the Stem Bark Extract of Sandoricum koetjape*, International Journal of Cancer Research, 2009, **No5**: 105-114.

4. Mubo Adeola Sonibare and Oluwaseun Victoria Olatubosun, *Pharmacognostic and free radical scavenging Evaluation of Cyathula prostata (Blume) L*, PHCOG J, 2015, **7**(2):107-116.
5. Norito Kaneda, et al., «*Plant Anticancer Agents, L. Cytotoxic Triterpenes from Sandoricum koetjape Stems*». Journal of Natural Products, 1992, **№55**:654-659.
6. Nouredine Benkeblia, *Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (Allium cepa L.) and garlic (Allium sativum L.) extracts*, Braz. Arch. Biol. Technol, 2005, vol.48, **№5**:753-759.
7. Rasadah M. A. et al, *Anti-inflammatory agents from Sandoricum koetjape Merr*, Phytomedicine, 2004, **11**(2):261-263.
8. Serhat Keser, Sait Celik, Semra Turkoglu, Ökkes Yilmaz and Ismail Turkoglu, *Hydrogen Peroxide Radical Scavenging and Total Antioxidant Activity of Hawthorn*, Chemistry Journal, 2012, **2**(1):9-12.
9. Безматерных К. В., Смирнова Г. В., Володина С. О., Володин В. В., Октябрьский О. Н., *Влияние полифенол- и экистероидсодержащих экстрактов растений на устойчивость Escherichia coli к пероксидазному стрессу и антибиотикам*, Российский иммунологический журнал, 2015, Т. 9(18), **№2**(1):632-634.
10. Денисенко Т.А., Вишникин А.Б., Цыганок Л.П., *Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу*, Аналитика и контроль, 2015, **19**(4):373-380.
11. Капканарь Т., *Изучение влияния общего содержания полифенолов на антиоксидантную активность экстрактов пряной зелени*, Журнал «Meridian ingineresc», 2010, **№3**:74-80.
12. Ткаченко Е.К., Носійчук С.В., *Разработка лабораторной технологии получения и количественное определение суммарного содержания полифенолов в концентрате надземной части Achillea Millefolium L.*, Вісник стоматології, 2009, **2**:82-85.

TÓM TẮT

HỢP CHẤT POLYPHENOL VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA MỘT SỐ LOÀI THỰC VẬT Ở RỪNG QUỐC GIA CÚC PHƯƠNG VÀ CÁT TIỀN

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng polyphenol có giá trị cao hơn cả trong dịch chiết methanol của mẫu vỏ *Sandoricum Koetjape* (3,4 mg/10 mg chiết xuất khô), mẫu lá của loài này (2,2 mg), trong các chiết xuất methanol của mẫu cây *Teucrium viscidum* (Lamiaceae) (2,0 mg), mẫu lá của *Leptobotris Vitex* và *V. stylosa* (Verbenaceae) (1,5 và 1,3 mg tương ứng) và mẫu cây *Commelina bengalensis* (Commelinaceae) (1,1 mg). Hàm lượng flavonoid cao nhất được tìm thấy trong dịch chiết methanol của mẫu lá *Sandoricum Koetjape* (0,8 mg), trong các mẫu dịch chiết methanol của lá *Teucrium viscidum* (0,7 mg), chi *Commelina bengalensis* (0,5 mg), *Vitex leptobotris* (0,4 mg) và *Sida acuta* (Malvaceae) (0,3 mg).

Hoạt tính chống oxy hóa có giá trị cao trong dịch chiết ethanol của mẫu lá *Sandoricum Koetjape* (49,6%), dịch chiết methanol của lá *Teucrium viscidum* (49,6%), mẫu vỏ *Vitex stylosa* (45,2%) và mẫu vỏ *Sandoricum Koetjape* (41,6%) khi đối chiếu với chất chuẩn vitamin C bằng phương pháp H_2O_2 . Với phương pháp DPPH, khi so sánh với chất chuẩn quercetin thu được các mẫu có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn cả là dịch chiết ethanol và methanol của mẫu vỏ *Sandoricum Koetjape* (86,9% và 81,8%), dịch chiết ethanol và methanol của *Teucrium viscidum* (60,0% và 52,8%). Nghiên cứu cho thấy trong cây sầu tía (*Sandoricum Koetjape*, họ Meliaceae) chứa một lượng lớn các polyphenol và flavonoid được chiết xuất từ lá và vỏ cây, có tác dụng chống oxy hóa rõ rệt.

Từ khóa: Hàm lượng polyphenol, flavonoid, hoạt tính chống oxy hóa, *Sandoricum Koetjape*, họ Meliaceae.

Nhận bài ngày 29 tháng 9 năm 2017

Hoàn thiện ngày 20 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН

⁽²⁾ Российско-Вьетнамский научно-исследовательский и технологический тропический центр