
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.11.087>

УДК 541.183: 542.924

Член-корреспондент НАН Украины **Т.М. Черевченко¹, Р.В. Иванников¹, И.В. Лагута², Л.И. Буюн¹, О.Н. Ставинская², О.И. Дзюба¹**

¹ Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев

² Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, Киев

E-mail: namor.iv22@gmail.com

Скрининг антиоксидантных свойств экстрактов из листьев растений семейства *Orchidaceae* Juss

С использованием растений, выращенных в условиях ex situ и in vitro, получены экстракты из листьев 17 видов семейства орхидных. Изучены антиоксидантные свойства экстрактов и содержание в них флавоноидов. Обнаружено, что экстракты из листьев десяти видов имеют высокие антиоксидантные свойства и/или высокое содержание флавоноидов, эти растения можно рассматривать как ценное сырье для получения антиоксидантов природного происхождения. Растения пяти видов обладали высоким содержанием биоактивных соединений при выращивании в условиях in vitro; эти растения могут быть использованы в биотехнологических процессах производства антиоксидантов.

Ключевые слова: растительные экстракты, *Orchidaceae* Juss., антиоксиданты, флавоноиды, *in vitro*, *ex situ*.

В настоящее время во многих исследовательских центрах проводятся работы по биоскринингу растений, направленные на поиск эффективных антиоксидантов природного происхождения [1]. Потенциально интересной группой растений — источником биологически активных соединений — являются представители семейства орхидных (*Orchidaceae* Juss.) [2]. Орхидные традиционно используются в восточной медицине, особенно в таких странах, как Китай, Вьетнам, Лаос, Япония, где эти растения широко распространены в природных условиях [3, 4]. В Украине наибольшая коллекция орхидных, насчитывающая более 450 видов (из 170 родов) [5], сосредоточена в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины. С 1999 г. она признана объектом национального достояния Украины (постановление Кабинета Министров Украины № 527 от 01.04.1999 г.). В НБС проводятся работы по изучению морфологии, анатомии, биологии развития этих растений, разработки агротехник *ex situ*, репродуктивной биологии, особенностям культуры *in vitro* [6–8]. В то же время возможность использования орхидных для выделения биологически активных веществ до сих пор не изучена. В связи с необходимостью получения эффективных и недорогих антиоксидантов актуальным является не только поиск ценного растительного сырья с высоким содержанием биоактивных

соединений, но и разработка биотехнологических процессов наработки биомассы *in vitro* для последующего использования в производстве природных антиоксидантов.

Цель настоящего исследования — скрининг коллекции орхидных, выявление растений, экстракты которых обладают высокими антиоксидантными свойствами, и сравнение по вышеуказанным параметрам растений, выращенных в условиях *ex situ* и *in vitro*.

В эксперименте использовали растения, принадлежащие к двум родам семейства орхидных — *Dendrobium* и *Anoectochilus*. Список изучаемых растений и экстрактов приведен в табл. 1. Растения выращивали в искусственных субстратах в условиях оранжерей ботанического сада, а также *in vitro*. В последнем случае стерильные семена помещали в питательную среду, основой которой служила пропись Мурасиге—Скуга [9], в стеклянных колбах и выдерживали при 16-часовом искусственном освещении.

Экстракты получали из свежих листьев растений путем экстракции в 70 % раствор этанола согласно методике, описанной в работе [10]. Соотношение сырья и экстрагента составляло 1 г / 100 мл, время экстракции — 30 мин.

Для определения антирадикальной активности экстрактов использовали реакцию со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом (DPPH) [11]. К 2 мл 70%-го спирта добавляли 2 мл 0,15 мМ раствора DPPH и 1 мл экстракта. Концентрацию стабильных радикалов через различные промежутки времени после начала реакции определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности в максимуме поглощения 520 нм. Для контроля использовали раствор с той же концентрацией DPPH, но без антиоксиданта. Для описания свойств экстрактов использовали стандартную характеристику — величину DPPH-30, которая показывает долю радикалов, восстановленных экстрактом в течение 30 мин. Для более детального исследования свойств экстрактов в некоторых случаях изучали также кинетику восстановления радикалов.

Таблица 1. Содержание флавоноидов и антирадикальная активность экстрактов

Название таксона	Содержание флавоноидов (%) в сухих листьях		Доля радикалов DPPH (%), ингибированных экстрактами за 30 мин	
	<i>ex situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>ex situ</i>	<i>in vitro</i>
<i>Dendrobium anosmum</i> Lindl.	—	0,9	—	25
<i>Dendrobium aphyllum</i> (Roxb.) C.E.C.Fisch.	1,2	0,8	16	16
<i>Dendrobium bellatulum</i> Rolfe	—	1,3	—	12
<i>Dendrobium chrysanthum</i> Wall. ex Lindl.	1,7	1,1	82	12
<i>Dendrobium draconis</i> Rchb.f.	1,7	1,3	61	29
<i>Dendrobium henryi</i> Schltr.	—	1,6	—	25
<i>Dendrobium linguella</i> Rchb.f.	2,2	1,6	31	14
<i>Dendrobium lomatochilum</i> Seidenf.	1,0	1,2	45	43
<i>Dendrobium moniliforme</i> (L.) Sw.	1,1	1,0	51	32
<i>Dendrobium moschatum</i> (Buch.-Ham.) Sw.	1,0	—	24	—
<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	1,9	1,3	28	12
<i>Dendrobium parishii</i> H.Low	1,8	—	31	—
<i>Dendrobium bigibbum</i> var. <i>superbum</i> Rchb.f.	1,3	1,1	38	17
<i>Anoectochilus roxburghii</i> (Wall.) Lindl.	—	2,0	—	94
<i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata	—	2,8	—	84

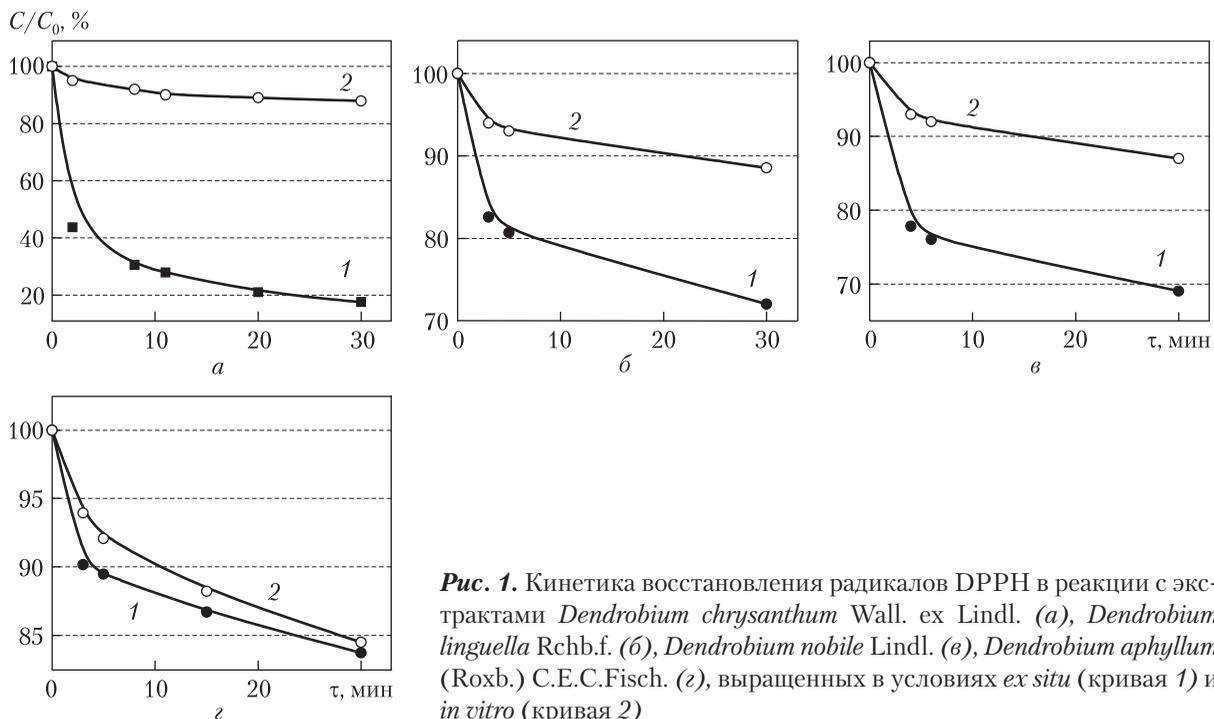


Рис. 1. Кинетика восстановления радикалов DPPH в реакции с экстрактами *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. (а), *Dendrobium linguella* Rchb.f. (б), *Dendrobium nobile* Lindl. (в), *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C.E.C.Fisch. (г), выращенных в условиях *ex situ* (кривая 1) и *in vitro* (кривая 2)

Для определения общего содержания флавоноидов использовали метод, основанный на способности этих соединений образовывать окрашенный комплекс с хлоридом алюминия [12]. 1 мл экстракта помещали в мерную колбу, добавляли 5 мл 2%-го раствора $AlCl_3$ в 95%-м этаноле и доводили объем до 25 мл добавлением 95%-го этанола. Смесь перемешивали в течение 30 мин и измеряли оптическую плотность раствора при 410 нм. В качестве образцов для калибровки использовали растворы рутина в 95%-м этаноле.

В табл. 1 приведены данные об изменении концентрации стабильного свободного радикала DPPH через 30 мин после контакта с исследуемыми экстрактами; этот экспресс-тест, согласно данным [11], широко используется для оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ. Как следует из полученных данных, все экстракты проявляют заметную антирадикальную активность. Наиболее активные образцы (экстракты *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., *Anoectochilus formosanus* Hayata) восстанавливают до 90 % радикалов за 30 мин; четыре экстракта (*Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl., *Dendrobium draconis* Rchb.f., *Dendrobium lomatochilum* Seidenf., *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.) ингибируют около 50 % радикалов или больше. Сравнение свойств экстрактов растений, выращенных в условиях *ex situ* и *in vitro*, показывает, что в большинстве случаев экстракты растений, выращенных в грунте, проявляют большую антиоксидантную активность. В то же время самые высокие антирадикальные свойства обнаружены у экстрактов орхидей *A. roxburghii*, *A. formosanus*, выращенных *in vitro*.

В табл. 1 также приведены данные о содержании в экстрактах флавоноидов. Флавоноиды относятся к соединениям с высокими антиоксидантными свойствами и являются ценными биоактивными веществами, обладающими также иммуностимулирующей, антибактериальной и Р-витаминной активностью [13]. Как видно из таблицы, наибольшее содержание флавоноидов имеют экстракты *A. roxburghii*, *A. formosanus*, *Dendrobium linguella* Rchb.f.,

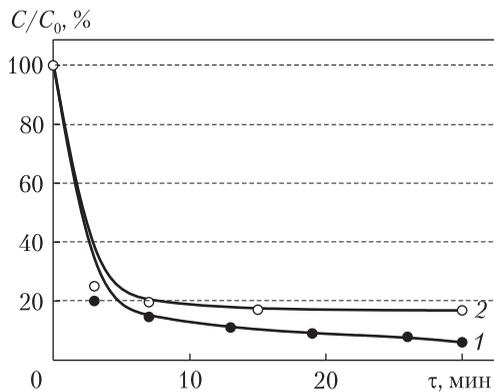


Рис. 2. Кинетика восстановления радикалов DPPH в реакции с экстрактами растений *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (кривая 1) и *Anoectochilus formosanus* Hayata. (кривая 2), выращенных в условиях *in vitro*

Dendrobium parishii H.Low, *Dendrobium nobile* Lindl., *D. draconis*, *D. chrysanthum*. Эти растения можно считать ценным сырьем для получения флавоноидов. Растения, выращенные *ex situ*, в большинстве случаев содержат большее количество флавоноидов, чем растения, выращенные *in vitro*. Сравнение

данных о содержании флавоноидов и об антирадикальной активности экстрактов не обнаруживает прямой зависимости между двумя этими характеристиками. Так, например, экстракты *D. linguella*, *D. parishii*, *D. nobile* с высоким содержанием флавоноидов проявляют сравнительно низкую активность в реакции с DPPH.

На рис. 1 приведены кривые гибели радикалов DPPH в реакции с экстрактами растений, относящихся к одному виду, но выращенных в различных условиях. Как видно из рис. 1 и как отмечалось выше, в большинстве случаев экстракты растений, выращенных в грунте, проявляют большую антирадикальную активность. Так, в случае *D. linguella* и *D. nobile* значения DPPH-30 для растений, выращенных в условиях *ex situ* и *in vitro*, отличаются приблизительно в 2 раза (см. рис. 1, б, в), а в случае *D. chrysanthum* — приблизительно в 7 раз (см. рис. 1, а).

В то же время следует отметить, что в некоторых случаях свойства растений, выращенных *ex situ* и *in vitro*, отличаются не существенно. Так, в случае *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) С.Е.С.Фисч. и *D. lomatochilum* экстракты растений, выращенных в условиях *ex situ* и *in vitro*, характеризуются практически одинаковыми значениями DPPH-30 (см. табл. 1) и имеют близкую кинетику восстановления радикалов (см. рис. 1, з).

Особенного внимания заслуживают данные о свойствах экстрактов, полученных из растительного материала *A. roxburghii* и *A. formosanus*. Несмотря на то что эти растения были выращены в условиях *in vitro*, их экстракты имеют самую высокую концентрацию флавоноидов и проявляют самую высокую антирадикальную активность (см. табл. 1). Приведенные на рис. 2 данные о кинетике ингибирования радикалов DPPH экстрактами этих видов орхидных показывают, что восстановление большей части радикалов DPPH происходит уже в первые 5 мин. Это может указывать на присутствие в экстрактах биологически активных соединений, характеризующихся быстрой кинетикой восстановления радикалов и относящихся к группе наиболее активных антиоксидантов. Согласно литературным данным, такими соединениями могут быть, в частности, флавоноиды [14].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что растения семейства орхидных могут быть ценным источником антиоксидантов и флавоноидов. Проведенный скрининг антиоксидантных свойств экстрактов позволяет выделить восемь видов рода *Dendrobium* (*D. chrysanthum*, *D. draconis*, *D. henryi*, *D. linguella*, *D. lomatochilum*, *D. moniliforme*, *D. nobile*, *D. parishii*) и два вида из рода *Anoectochilus* (*A. formosanus*, *A. roxburghii*) с высоким содержанием антиоксидантов и/или флавоноидов. Установлено, что растения *A. roxburghii*, *A. formosanus* и *D. lomatochilum* характеризуются высоким содержанием антиоксидантов при выращивании *in vitro* и могут быть использованы в биотехнологических процессах произ-

водства антиоксидантов. Для получения в условиях *in vitro* флавоноидов могут также быть использованы представители таких видов, как *D. linguella* и *D. henryi*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Целевой комплексной междисциплинарной программы научных исследований НАН Украины “Молекулярные и клеточные биотехнологии для нужд медицины, промышленности и сельского хозяйства” (постановление Президиума НАН Украины от 11.02.15 № 22).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols // Food Chemistry. — 2006. — **94**. — P. 550–557.
2. Gutierrez R.M.P. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology // J. Med. Plants Res. — 2010. — **4**. — P. 592–638.
3. Bulpitt C.J., Li Y., Bulpitt P.F., Wang J. The use of orchids in Chinese medicine // J. R. Soc. Med. — 2007. — **100**. — P. 558–563.
4. Kong J.M., Goh N.K., Chia L.S., Chia T.F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids // Acta Pharmacol. Sin. — 2003. — **24**. — P. 7–21.
5. Cherevchenko T., Buyun L., Kovalska L., Ivannikov R. Tropical orchids collections in Ukraine: research, educational and conservational missions // Proc. of the 4th Int. Sci. Congr. "Science and Education in the Modern World" (New Zealand, Auckland, 5–7 January 2015). — Auckland, 2015. — P. 343–347.
6. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.М., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. — Киев: Наук. думка, 2008. — 560 с.
7. Buyun L.I., Ivannikov R.V., Kovalska L.A. Tropical orchids in Ukraine: *ex situ* conservation and perspectives of application as a source of biologically active substances // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. Part I: The sci. proc. of the intern. Network AgroBioNet. — Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. — P. 74–77.
8. Buyun L.I., Cherevchenko T.M., Kovalska L.A., Ivannikov R.V. Reproductive biology of *Angraecum eburneum* subsp. *superbum* (Orchidaceae) under glasshouse conditions // Environmental and Experimental Biology. — 2015. — **13**. — P. 33–39.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473–479.
10. Комарова М.Н., Николаева Л.А., Регир В. Г. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья: методические указания к лабораторным занятиям. — Санкт-Петербург: Гос. хим.-фарм. академия, 1998. — 60 с.
11. Alonso A.M., Domianguz C., Guilleán D., Barroso C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content // J. Agric. Food Chem. — 2002. — **50**. — P. 3112–3115.
12. Андреева В.Ю., Калинин Г.И. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L. S. L. // Химия раст. сырья. — 2000. — № 1. — С. 85–88.
13. Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids // Pharmacol Ther. — 2002. — **96**. — P. 67–202.
14. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids // Free Radic. Biol. Med. — 1996. — **20**. — P. 7933–7956.

REFERENCES

1. Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. Food Chemistry, 2006, **94**: 550–557.
2. Gutierrez R.M.P. J. Med. Plants Res., 2010, **4**: 592–638.
3. Bulpitt C.J., Li Y., Bulpitt P.F., Wang J. J. R. Soc. Med., 2007, **100**: 558–563.
4. Kong J.M., Goh N.K., Chia L.S., Chia T.F. Acta Pharmacol. Sin., 2003, **24**: 7–21.
5. Cherevchenko T., Buyun L., Kovalska L., Ivannikov R. Proceedings of the 4th International Sciences Congress "Science and Education in the Modern World", New Zealand, Auckland, 2015: 343–347.

6. Cherevchenko T.M., Lavrentieva A.N., Ivannikov R.V. Biotechnology of tropical and subtropical plants in vitro, Kiev: Naukova Dumka, 2008 (in Russian).
7. Buyun L.I., Ivannikov R.V., Kovalska L.A. Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. Part I, The sci. proc. of the intern. Network AgroBioNet, Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015: 74–77.
8. Buyun L.I., Cherevchenko T.M., Kovalska L.A., Ivannikov R.V. Environmental and Experimental Biology, 2015, **13**: 33–39.
9. Murashige T., Skoog F. Physiol. Plant., 1962, **15**: 473–479.
10. Komarova M.N., Nikolaeva L.A., Regir V.G. Phytochemical analysis of medicinal plants: guidelines for laboratory studies, Saint-Petersburg: State Chemical-Pharmaceutical Academy, 1998 (in Russian).
11. Alonso A.M., Domianguz C., Guillean D., Barroso C.G. J. Agric. Food Chem., 2002, **50**: 3112–3115.
12. Andreeva V. Yu., Kalinkina G. I. Khimiva rastitel'nogo syr'ya, 2000, No 1: 85–88 (in Russian).
13. Havsteen B.H. Pharmacol Ther., 2002, **96**: 67–202.
14. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Free Radic. Biol. Med., 1996, **20**: 7933–7956.

Поступило в редакцію 29.03.2016

Член-кореспондент НАН України Т.М. Черевченко¹,
Р.В. Іванніков¹, І.В. Лагута², Л.І. Буюн¹, О.М. Ставінська², О.І. Дзюба¹

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Київ

² Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Київ

E-mail: namor.iv22@gmail.com

СКРИНІНГ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕКСТРАКТІВ З ЛИСТЯ РОСЛИН РОДИНИ ORCHIDACEAE JUSS.

З використанням рослин, вирощених в умовах *ex situ* та *in vitro*, одержано екстракти з листя 17 видів родини орхідних. Вивчено антиоксидантні властивості екстрактів та вміст у них флавоноїдів. Виявлено, що екстракти із листя десяти видів орхідних мають високі антиоксидантні властивості та/чи високий вміст флавоноїдів; ці рослини можна розглядати як цінну сировину для одержання антиоксидантів природного походження. Рослини п'яти видів характеризуються високим вмістом біоактивних сполук при вирощуванні в умовах *in vitro*; ці рослини можуть бути використані в біотехнологічних процесах виробництва антиоксидантів.

Ключові слова: рослинні екстракти, Orchidaceae Juss., антиоксиданти, флавоноїди, *in vitro*, *ex situ*.

Corresponding Member of the NAS of Ukraine T.M. Cherevchenko¹,
R.V. Ivannikov¹, I.V. Laguta², L.I. Buyun¹, O.N. Stavinskaya², O.I. Dzyuba¹

¹ M.M. Gryshko National Botanic Garden of the NAS of Ukraine, Kiev

² Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: namor.iv22@gmail.com

SCREENING THE PLANTS OF ORCHIDACEAE JUSS. FAMILY FOR THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE EXTRACTS OF LEAVES

Using plants grown *ex situ* and *in vitro*, the extracts from leaves of seventeen species of Orchidaceae Juss. family are prepared. Antioxidant activity of the extracts is studied, and the content of flavonoids in the extracts is estimated. The extracts from leaves of ten species are found to possess high antioxidant properties and/or a high content of flavonoids that makes them potentially interesting raw materials for the production of effective antioxidants of nature originals. Five of these ten species had a high content of bioactive compounds, being cultivated *in vitro*; these plants may be used in biotechnological processes of antioxidants/flavonoids production.

Keywords: plants extracts, Orchidaceae Juss., antioxidants, flavonoids, *in vitro*, *ex situ*.