

И. В. Лагута, О. Н. Ставинская, О. И. Дзюба, Р. В. Иванников

Анализ антиоксидантных свойств экстрактов растений

(Представлено академиком НАН Украины Н. Т. Картелем)

Получены этанольные экстракты из листьев 21 растения. С использованием метода Фолина–Чоколтеу и ДФПГ-теста изучены их антиоксидантные свойства. Обнаружено, что некоторые из экстрактов обладают высокими антиоксидантными свойствами, при этом особенно активными в тестовых реакциях оказались экстракты витекса, магнолий, стевии, актинидии. Показано, что такие свойства растений, выращенных в грунте и *in vitro*, сопоставимы друг с другом. Таким образом, эти растения можно рассматривать как потенциально перспективное сырье для получения эффективных антиоксидантов природного происхождения.

Ключевые слова: экстракты растений, антиоксиданты, метод Фолина–Чоколтеу, ДФПГ-тест.

В настоящее время во многих исследовательских центрах широко проводятся работы фундаментального и прикладного характера, направленные на всестороннее изучение биологически активных соединений растительного происхождения [1]. В частности, большой интерес представляет поиск эффективных природных антиоксидантов (АО). АО — вещества, способные значительно замедлять или предотвращать окисление субстрата [2, 3], — широко используются в составе лекарственных средств, в косметологии, пищевой промышленности, ветеринарии. Растущие потребности фармацевтической промышленности, косметологических производств, сельского хозяйства в эффективных и недорогих АО делают актуальной задачу подбора доступных сырьевых ресурсов и разработку оптимальных биотехнологических процессов производства природных АО и лекарственных препаратов на их основе.

Известно, что растения могут быть богатыми источниками таких антиоксидантов, как фенолы, флавоноиды, каротиноиды, токоферол, аскорбиновая кислота [1]. Важным моментом в процессе создания технологий получения эффективных и дешевых АО является первичный отбор растений, потенциально перспективных для выделения биоактивных продуктов. Большое значение для решения задачи промышленного получения биологически активных веществ имеет также разработка технологических процессов быстрого наращивания биомассы. Альтернативой традиционному выращиванию растений в грунте является культивирование клеток и тканей растений в системе *in vitro*, что позволяет уменьшить зависимость выхода биомассы от природных условий и дает возможность получать более чистый продукт по сравнению с природным сырьем. Задачей настоящей работы является первичный скрининг ряда растений с целью выявления материала, наиболее богатого антиоксидантами, а также сравнение антиоксидантных свойств экстрактов растений, выращенных в природных и искусственных условиях.

В эксперименте использовали 7 видов растений семейства орхидных (*Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl., *D. lomatochilum* Seidenf., *D. parishii* H. Low, *D. phalaenopsis*

Fitzg., *D. nobile* Lindl., *D. crumenatum* Sw., *D. aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch.), 4 вида магнолиевых (*Magnolia sieboldii* K. Koch, *M. kobus* DC., *M. × soulangeana* Soul.-Bod., *M. stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim.), 3 вида витекса (*Vitex negundo* var. *cannabifolia* (Siebold & Zucc.) Hand.-Mazz. (syn. *V. cannabifolia* Siebold & Zucc.), *V. agnus-castus* L., *V. negundo* L.), а также растения стевия медовая (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni), актинидия острая (*Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.), калина обыкновенная (*Viburnum opulus* L.), дурман обыкновенный (*Lycium barbarum* L.), лимонник китайский (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.), пшеница летняя (*Triticum aestivum* L.). Список изучаемых растений приведен в табл. 1. Растения выращивали в условиях *ex situ* и *in vitro*. В последнем случае (после стерилизации) семена помещали в питательную среду Мурасиге–Скуга в стеклянных колбах и выращивали при шестнадцатичасовом искусственном освещении.

Биологически активные вещества извлекали из свежих листьев растений путем экстракции в 70%-й раствор этанола, согласно методике, описанной в работе [4]. Соотношение сырья и экстрагента составляло 1 г/100 мл, время экстракции — 30 мин.

Качественный анализ содержащихся в экстрактах антиоксидантов проводили с применением методов тонкослойной хроматографии [5] и масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией (ЛДИ). В качестве реперных соединений для хроматографического анализа использовали рутин, кверцетин, кверцетрин, морин, гесперидин и метилизофлавонол. ЛДИ

Таблица 1. Антиоксидантные свойства экстрактов из листьев растений, выращенных в открытом грунте

№ п/п	Вид растений	Общий фенольный индекс, о. е.	Эквивалентная концентрация аскорбиновой кислоты, ммоль/л	Доля радикалов ДФПГ, прореагировавших с АО через 30 мин, %
1	<i>Dendrobium chrysanthum</i>	1,8	0,9	~100
2	<i>Dendrobium lomatochilum</i>	0,9	0,5	55
3	<i>Dendrobium parishii</i>	1,2	0,6	25
4	<i>Dendrobium phalaenopsis</i>	1,1	0,6	30
5	<i>Dendrobium nobile</i>	1,0	0,5	35
6	<i>Dendrobium crumenatum</i>	0,7	0,4	57
7	<i>Dendrobium aphyllum</i>	0,4	0,2	24
8	<i>Magnolia sieboldii</i>	7,40	3,7	~100
9	<i>Magnolia kobus</i>	6,0	3,0	~100
10	<i>Magnolia × soulangeana</i>	8,0	4,0	~100
11	<i>Magnolia stellata</i>	5,6	2,8	~100
12	<i>Vitex negundo</i> var. <i>cannabifolia</i>	15,0	7,5	~100
13	<i>Vitex agnus-castus</i>	14,8	7,4	~100
14	<i>Vitex negundo</i>	25,0	12,5	~100
15	<i>Stevia rebaudiana</i>	4,0	2,0	~100
16	<i>Actinidia arguta</i>	4,7	2,3	~100
17	<i>Viburnum opulus</i>	2,6	1,3	~100
18	<i>Shisandra chinensis</i>	2,6	1,3	~100
19	<i>Lycium barbarum</i>	1,6	0,8	~100
20	<i>Berberis vulgaris</i>	1,4	0,7	~100
21	<i>Triticum aestivum</i>	0,6	0,3	19
22	Аскорбиновая кислота, 1 ммоль/л	2,0	1,0	~100
23	Кверцетин, 1 ммоль/л	3,0	1,5	~100
24	Рутин, 1 ммоль/л	3,0	1,5	~100

масс-спектры регистрировали с помощью масс-спектрометра Autoflex II (“Bruker Daltonics Inc”, Германия), оборудованного азотным лазером ($\lambda = 337$ нм).

Для характеристики антиоксидантных свойств экстрактов и композитов использовали метод Фолина–Чоколтеу и дифенилпикрилгидразил-тест (ДФПГ-тест). Для определения общего фенольного индекса к 1 мл экстракта в 70%-м спирте последовательно добавляли 11,5 мл воды, 5 мл 20%-го раствора карбоната натрия, 1,25 мл реактива Фолина–Чоколтеу и 6,25 мл воды, так что суммарный объем раствора составлял 25 мл. Раствор перемешивали в течение получаса, измеряли поглощение при 750 нм и рассчитывали общий фенольный индекс, согласно методике, описанной в статье [6].

Определение антирадикальной активности АО осуществляли реакцией со стабильным свободным радикалом ДФПГ [7, 8]. К 2-м мл 70%-го спирта добавляли 2 мл 0,15 ммоль/л раствора ДФПГ и 1 мл исходного экстракта или экстракта, разведенного в соотношении 1 : 20 — 1 : 50. Концентрацию стабильных радикалов через различные промежутки времени после начала реакции определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности в максимуме поглощения 520 нм. Контроль проводили в растворе с той же концентрацией ДФПГ, но без АО.

Значения общего фенольного индекса для экстрактов изучаемых растений, а также для таких известных антиоксидантов, как аскорбиновая кислота, рутин и кверцетин, приведены в табл. 1. Сопоставление полученных значений фенольного индекса экстрактов с соответствующими данными для аскорбиновой кислоты [9] позволяет оценить эквивалентную концентрацию АО в растворах. Как видно из данных таблицы, наибольшие значения фенольного индекса и соответственно наибольшая эквивалентная концентрация аскорбиновой кислоты наблюдается для экстрактов растений *Vitex negundo* var. *cannabifolia*, *V. agnus-castus*, *V. negundo*, *Magnolia sieboldii*, *M. kobus*, *M. × soulangeana*, *M. stellata*, *Stevia rebaudiana*, *Actinidia arguta*. В то же время такие растения, как пшеница и орхидеи, очевидно, содержат сравнительно низкие концентрации фенолов и, по-видимому, представляют меньший интерес в качестве сырья для получения АО.

Общий фенольный индекс, как известно, характеризует количество фенолов в растворе и потенциальную антиоксидантную способность соединений, в то время как активность экстрактов в конкретных реакциях с радикалами может определяться другими свойствами АО [6]. В табл. 1 для всех полученных экстрактов приведены данные об изменении концентрации стабильного свободного радикала ДФПГ через 30 мин (ДФПГ-30) после контакта с экстрактами; этот экспресс-тест, согласно литературным данным [7, 8], широко используется для оценки антирадикальной активности биологически активных веществ. Полученные результаты свидетельствуют о высоких антиоксидантных свойствах экстрактов витекса, магнолий, стевии, актинидии, калины, лимонника, дерезы и барбариса, а также позволяют выделить листья этих растений в качестве потенциально перспективного сырья для получения АО. Среди экстрактов орхидей наибольшую антирадикальную активность наблюдали у образцов *Dendrobium chrysanthum*, экстракт пшеницы показал слабую активность в реакции с ДФПГ. Сравнивая значения ДФПГ-30 и общего фенольного индекса, можно отметить, что антиоксидантная активность экстрактов коррелирует с содержанием в них фенолов. Так, экстракты растений (магнолий, витекса, стевии, актинидии, лимонника, дерезы, барбариса, орхидея *Dendrobium chrysanthum*), характеризующиеся значениями общего фенольного индекса $\sim 1,5$ и выше, ингибируют 100% радикалов ДФПГ через 30 мин реакции. Экстракты с меньшим фенольным индексом проявляют и более слабое антирадикальное действие (большая часть экстрактов орхидей и пшеница).

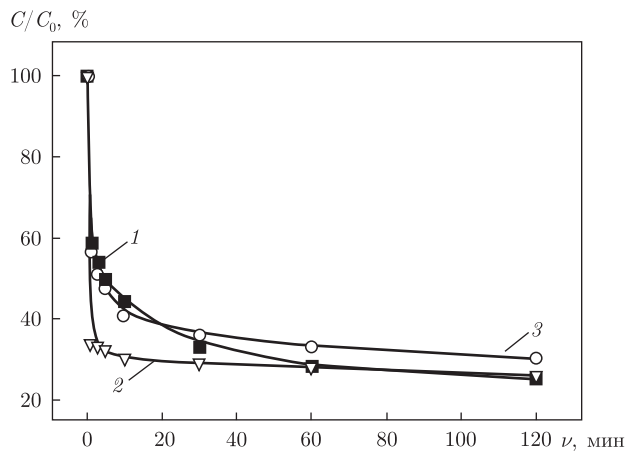


Рис. 1. Кинетические кривые гибели радикала ДФПГ в реакции с экстрактами *Vitex negundo* var. *cannabifolia* (1), *Vitex agnus-castus* (2), *Vitex negundo* (3). Разбавление исходных экстрактов 1 : 50 [τ — время, ч; C/C_0 — отношение концентрации радикала в растворе к исходной концентрации, %]

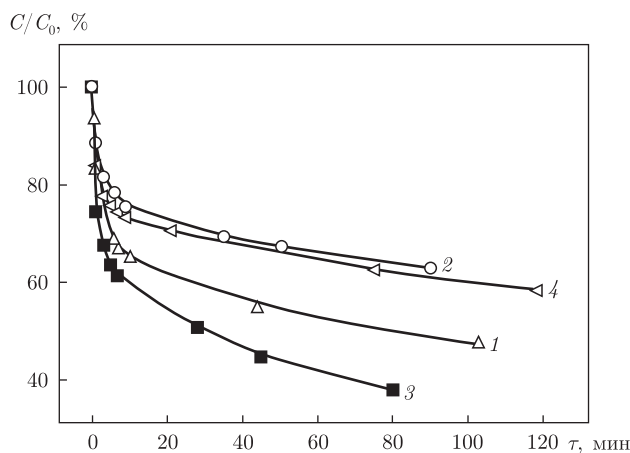


Рис. 2. Кинетические кривые гибели радикала ДФПГ в реакции с экстрактами *Magnolia sieboldii* (1), *Magnolia kobus* (2), *Magnolia x soulangeana* (3), *Magnolia stellata* (4). Разбавление исходных экстрактов 1 : 40 [τ — время, ч; C/C_0 — отношение концентрации радикала в растворе к исходной концентрации, %]

Результаты более детального изучения антирадикальных свойств ряда выбранных экстрактов, а именно, кинетические кривые гибели радикалов ДФПГ в реакции с АО, присутствующими в экстрактах из листьев витекса, магнолий, актинидии и калины демонстрируют рис. 1–3. Как видно из приведенных рисунков, несмотря на значительное разбавление экстрактов (1 : 20 — 1 : 50) все образцы показывают эффективное восстановление радикала ДФПГ. Данные по скорости восстановления радикала коррелируют с общим фенольным индексом образцов, но не определяются только концентрацией фенолов. Так, экстракты магнолий *Magnolia sieboldii* и *Magnolia x soulangeana* с более высоким, чем у экстрактов *Magnolia kobus* и *Magnolia stellata* (см. табл. 1), содержанием фенолов действительно характеризуются и более высокой скоростью реакции с ДФПГ (см. рис. 2). Экстракт калины характеризуется меньшим значением фенольного индекса по сравнению с экстрактом актинидии (см. табл. 1) и более слабой активностью в реакции с радикалом (см. рис. 3). Среди

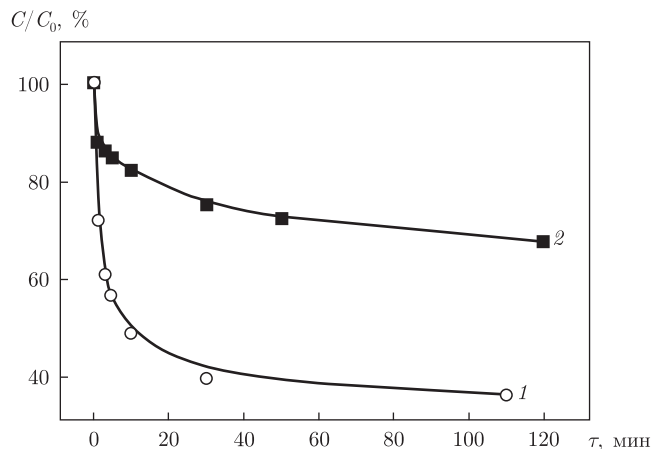


Рис. 3. Кинетические кривые гибели радикала ДФПГ в реакции с экстрактами *Actinidia arguta* (1), *Viburnum opulus* (2).

Разбавление исходных экстрактов 1 : 20 [τ — время, ч; C/C_0 — отношение концентрации радикала в растворе к исходной концентрации, %]

растений рода *Vitex* экстракт *V. negundo* характеризуется наибольшим фенольным индексом (см. табл. 1), но проявляет меньшую антирадикальную активность, чем экстракты *Vitex negundo* var. *cannabifolia* и *Vitex agnus-castus* (см. рис. 1).

На кинетических кривых ингибирования радикалов (см. рис. 1–3) можно выделить быструю (первые 5–7 мин) и медленную стадии реакции. Аналогичный характер кривых гибели радикалов ДФПГ при их взаимодействии с растительными экстрактами наблюдали в работе [10] при изучении экстрактивных веществ пижмы обыкновенной и тысячелистника обыкновенного. Наличие быстрой и медленной фаз процесса связано, очевидно, со сложным составом экстрактов, с присутствием в них АО, отличающихся по скорости и стехиометрии реакции с радикалом, а также с тем, что в реакции могут принимать участие не только исходные АО, но и продукты их взаимодействия с ДФПГ.

Одними из наиболее часто встречающихся в листьях растений АО являются флавоноиды. В экстрактах витекса, магнолий, стевии методом хроматографии были обнаружены такие флавоноиды, как кверцетин, кверцетрин и рутин. Методом ЛДИ масс-спектрометрии в экстрактах магнолий был обнаружен флавоноид морин, а также такие антиоксиданты, как кумариновая, хлорогеновая и кофейная кислоты. В экстрактах витекса с помощью метода ЛДИ масс-спектрометрии показано присутствие кофейной кислоты и кемпферола. В экстрактах актинидии и калины методом хроматографического анализа был зарегистрирован флавоноид гесперидин, в экстрактах лимонника, дерезы и барбариса — метилизофлавоны. В растениях семейства орхидных флавоноиды обнаружены не были; возможные АО в этих экстрактах представлены такими соединениями, как тимол, эвгенол, салициловая и коричная кислоты. Вероятно, именно отсутствие в экстрактах орхидей флавоноидов является причиной того, что при достаточно высоком общем содержании фенолов экстракты *Dendrobium parishii*, *D. phalaenopsis*, *D. nobile* проявляют сравнительно слабую антирадикальную активность.

Как отмечалось выше, получение значительных количеств природных АО требует применения специальных технологий, позволяющих быстро наращивать биомассу растений. Свойства растений, выращенных *in vitro*, могут отличаться от свойств растений того же

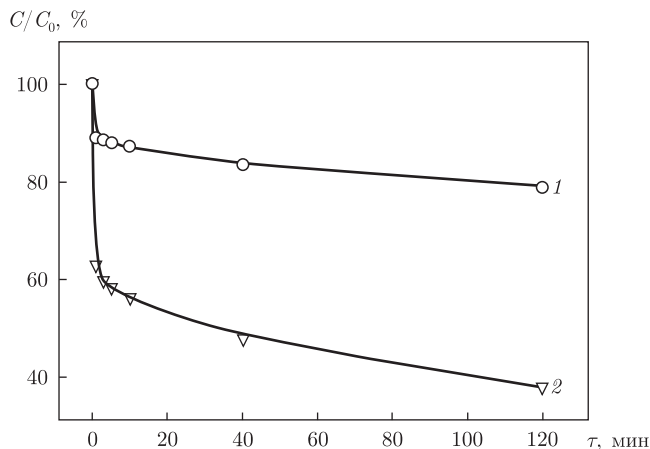


Рис. 4. Кинетические кривые гибели радикалаДФПГ в реакции с экстрактами из листьев растений *Stevia rebaudiana*, выращенных в открытом грунте (1) и в системе *in vitro* (2). Разбавление исходных экстрактов 1 : 50 [τ — время, ч; C/C_0 — отношение концентрации радикала в растворе к исходной концентрации, %]

вида, растущих в открытом грунте. В табл. 2 и на рис. 4 приведены данные об антиоксидантных свойствах экстрактов трех видов орхидей и стевии, полученных из растений, выращенных в различных условиях. Согласно представленным результатам, выращивание орхидей *in vitro* не обязательно приводит к уменьшению количества АО. Так, выращенные *in vitro* растения *Dendrobium chrysanthum* действительно уступают по антиоксидантным свойствам тем же растениям, выращенным в грунте. В то же время для *Dendrobium lomatochilum* аналогичные отличия незначительны, а в случае *Dendrobium parishii* растения, выращенные в искусственных условиях, обладают даже лучшими антиоксидантными характеристиками. Аналогичная ситуация наблюдается для стевии: большее количество фенольных соединений и более высокие антирадикальные свойства наблюдаются для образцов, выращенных *in vitro*, при этом для грунтовых растений общий фенольный индекс (см. табл. 2) и скорость ингибирования радикалаДФПГ (см. рис. 4) оказываются почти в 2 раза ниже.

Таким образом, полученные данные показывают, что листья витекса, магнолий, стевии и некоторых других растений (актинидии, калины, лимонника, барбариса) являются ценным сырьем для получения таких эффективных природных антиоксидантов, как кверцетин, кверцетрин, рутин, гесперидин, кемпферол, метилизофлавонон, кофейная кислота. Экстракты из листьев этих растений характеризуются высокими значениями общего фенольного индекса и высокой активностью в реакции со стабильным радикаломДФПГ. Экстракты

Таблица 2. Сравнение антиоксидантных свойств экстрактов растений, выращенных в открытом грунте и *in vitro*

Вид растений	Общий фенольный индекс, о. е.		Доля радикаловДФПГ, прореагировавших с АО за 30 мин, %	
	грунт	<i>in vitro</i>	грунт	<i>in vitro</i>
<i>Dendrobium chrysanthum</i>	1,8	0,3	~100	16
<i>Dendrobium lomatochilum</i>	0,9	1,0	55	49
<i>Dendrobium parishii</i>	1,2	1,4	25	37
<i>Stevia rebaudiana</i>	4,0	8,0	~100	~100

растений, выращенных в грунте и в системе *in vitro*, могут обладать сопоставимыми антиоксидантными характеристиками, что указывает на перспективность выращивания растений в искусственных условиях для последующего получения из них эффективных антиоксидантов.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Национального ботанического сада им. Н. Н. Гришко НАН Украины Л. Шпак, Н. Скрипченко, Н. Дидык, Н. Левчик за предоставленные для исследований образцы экстрактов растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Целевой комплексной междисциплинарной программы научных исследований НАН Украины "Молекулярные и клеточные биотехнологии для нужд медицины, промышленности и сельского хозяйства".

Цитируемая литература

1. *Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M.* Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols // *Food Chem.* – 2006. – **94**. – P. 550–557.
2. *Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives* / Ed. by D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunhe // New York: CRC Press, 1996. – 512 p.
3. *Bekker E. M., Nissen L. R., Skibsted L. H.* Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects // *Eur. Food Res. Technol.* – 2004. – **219**. – P. 561–571.
4. *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.
5. *Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М.* Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. думка, 1973. – 591 с.
6. *Alonso A. M., Domianquez C., Guillean 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.
7. *Yang J.-H., Lee S.-Y., Han Y.-S., Park K.-C., Choy J.-H.* Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2003. – **24**. – P. 49–503.
8. *Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // *LWT – Food Sci. Technol.* – 1995. – **28**. – P. 25–30.
9. *Лагута И. В., Ставинская О. Н., Оранская Е. И., Чернявская Т. В.* Взаимодействие аскорбиновой кислоты с высокодисперсным кремнеземом // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 12. – С. 152–157.
10. *Волков В. А., Пахомов П. М.* Кинетика взаимодействия радикала ДФПГ с экстрактивными веществами растений в различных средах // *Ползунов. вестн.* – 2008. – № 3. – С. 309–313.

References

1. *Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M.* *Food Chem.*, 2006, **94**: 550–557.
2. *Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives*, D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunhe (Ed.), New York: CRC Press, 1996.
3. *Bekker E. M., Nissen L. R., Skibsted L. H.* *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, **219**: 561–571.
4. *Komarova M. N., Nikolaeva L. A., Regir V. G.* *Phytochemical analysis of medicinal plants: guidelines for laboratory studies*, St. Petersburg: SPKhPhA, Saint-Petersburg: State Chemical-Pharmaceutical Academy, 1998 (in Russian).
5. *Grodzinskii A. M., Grodzinskii D. M.* *Brief handbook on plants physiology*, Kiev: Naukova Dumka, 1973 (in Russian).
6. *Alonso A. M., Domianquez C., Guillean D., Barroso C. G.* *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**: 3112–3115.
7. *Yang J.-H., Lee S.-Y., Han Y.-S., Park K.-C., Choy J.-H.* *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, **24**: 49–503.
8. *Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.* *LWT – Food Sci. Technol.*, 1995, **28**: 25–30.
9. *Лagута I. V., Stavinskaya O. N., Oranskaya E. I., Chernyavskaya T. V.* *Dopov. NAN Ukraine*, 2009, No 12: 152–157 (in Russian).

Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
НАН Украины, Киев
Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 29.12.2014

I. V. Laguta, O. M. Stavinska, O. I. Dzyuba, R. V. Ivannikov

Аналіз антиоксидантних властивостей екстрактів рослин

Институт хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ
Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України, Київ

*Отримано етанольні екстракти з листя 21 рослини. За допомогою методу Фоліна–Чоколтеу та ДФПГ-тесту вивчено їх антиоксидантні властивості. Знайдено, що деякі екстракти володіють високими антиоксидантними властивостями, при цьому особливо активними в тестових реакціях виявилися екстракти вітексу, магнолій, стевії, актинідії. Показано, що такі властивості рослин, вирощених у ґрунті та *in vitro*, порівнянні один з одним. Таким чином, ці рослини можна розглядати як потенційно перспективну сировину для отримання ефективних антиоксидантів природного походження.*

Ключові слова екстракти рослин, антиоксиданти, метод Фоліна–Чоколтеу, ДФПГ-тест.

I. V. Laguta, O. N. Stavinskaya, O. I. Dzyuba, R. V. Ivannikov

Analysis of antioxidant properties of plants extracts

O. O. Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev
M. M. Gryshko National Botanic Garden of the NAS of Ukraine, Kiev

*Ethanol extracts from leaves of 21 plants are prepared, and their antioxidant characteristics are investigated, by using the Folin-Ciocalteu method and the DPPH test. Some of these extracts are found to possess high antioxidant properties, with the extracts of Vitex, Magnolia, Stevia, Actinidia being especially active in test reactions. The antioxidant properties of the plants cultivated both *ex situ* and *in vitro* are found to be comparable with one another. Thus, these plants may be considered as potentially interesting raw materials for the production of effective antioxidants of the natural origin.*

Keywords: plants extracts, antioxidants, Folin–Ciocalteu method, DPPH test.