

СРАВНЕНИЕ ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАНИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Е.И. Рябина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова, Н.И. Пономарева

*Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко
394036 Воронеж, ул. Студенческая, 10
ryabinina68@mail.ru*

Поступила в редакцию 16 февраля 2011 г.

Исследован состав водных извлечений лекарственных растений. Для изученных образцов была различными методами определена концентрация танидов. Показано, что наиболее специфичным к фенольным соединениям растительных экстрактов являются спектрофотометрический и потенциометрический методы. Определена антиоксидантная активность растительных экстрактов двумя альтернативными методами: по ингибированию супероксидрадикала в реакции аутоокисления адреналина и амперометрическим способом. Обе методики дают объективные результаты. Выявлена корреляционная связь между суммарным содержанием биологически активных веществ в растительном сырье и антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: растительное сырье, таниды, антиоксидантная активность, аутоокисление адреналина, амперометрический метод.

Рябина Елена Ивановна – кандидат химических наук, ассистент кафедры неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко.

Область научных интересов – изучение состава и антиоксидантной активности растительного сырья; кинетика электрохимических процессов на металлах и сплавах.

Автор 32 опубликованных работ.

Зотова Елена Евгеньевна - кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко.

Область научных интересов – изучение состава и антиоксидантной активности растительного сырья; кинетика электрохимических процессов на металлах и сплавах.

Автор 20 опубликованных работ.

Ветрова Елена Николаевна - кандидат химических наук, ассистент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко.

Область научных интересов – изучение состава и антиоксидантной активности растительного сырья; свойства тонкоплочных разбавленных твердых растворов.

Автор 10 опубликованных работ.

Пономарева Наталия Ивановна – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко.

Область научных интересов – изучение состава и антиоксидантной активности растительного сырья; синтез гидроксипатита, композитов и покрытий на его основе.

Автор 124 опубликованных работ.

Введение

Состояние окружающей среды, избыточное потребление синтетических лекарств, пищевых добавок и консервантов оказывают существенное влияние на биологическое производство свободных радикалов, лежащих в основе целого ряда

заболеваний и патологических состояний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания и др. Для коррекции указанных состояний и в профилактических целях все чаще применяют растительное сырье, содержащее большой набор антиоксидантов: ви-

таминов, флавоноидов и дубильных веществ, обладающих мягким воздействием на организм и сравнительно низкой токсичностью. Однако необходимо контролируемое потребление антиоксидантов, поскольку при большом содержании они становятся проантиоксидантами [1]. Рекомендуемые уровни потребления антиоксидантов приняты в РФ в 2004 году [2] (350-1300 мг/сутки), а в других странах 800-1000 мг/сутки. Практическое использование антиоксидантов растительного происхождения для регуляции свободнорадикальных процессов в организме человека выдвигает на первый план проблему количественной оценки антиоксидантной эффективности комплексных препаратов на основе лекарственного растительного сырья. Методы исследования антиоксидантной активности различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисляющего соединения. Эти методы дают широкий набор результатов, которые нельзя использовать по отдельности, а результаты должны быть интерпретированы с осторожностью [3]. На наш взгляд, это является нарушением ФЗ «Обеспечении единства измерений».

Цель данной работы – проведение сопоставления используемых методов анализа растительного сырья, выбор и рекомендация к применению наиболее достоверных.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали готовое сырье надземной части шести видов лекарственных растений: мята перечная (*Mentha piperita* L.), череда (*Satureja hortensis* L.), шалфей (*Salvia officinalis* L.), зверобой (*Hypericum perforatum* L.), мелисса (*Melissa officinalis* L.), тысячелистник (*Achillea millefolium* L.), выпускаемых ЗАО фирма «Здоровье» и приобретенных в аптечной сети.

Водное извлечение готовилось 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.

В полученных экстрактах определяли содержание дубильных веществ, следующими методами:

- методом Левенталя, основанном на окислении дубильных веществ перманганатом калия с использованием индигокармина в качестве индикатора [4];
- методом Дейса - гравиметрического определения продуктов взаимодействия с избытком формальдегида [5];
- спектрофотометрическим методом, с применением раствора аммония молибденовокислого [6].

В качестве стандартного образца использовали ГСО танина. Указанные три метода позволяют оценить лишь общее содержание дубильных веществ, представляющих собой сложную смесь близких по составу фенольных соединений, делящихся на две большие группы: гидролизуемые и конденсированные. Для количественного определения отдельных групп танино-катехиновой смеси использовали потенциометрический метод [7]. Количественное содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически [8], а аскорбиновой кислоты – титриметрическим методом [4]. Относительная погрешность измерения не превышала 5 %, доверительный интервал вычисляли по стандартной процедуре с использованием коэффициента Стьюдента (доверительная вероятность составляет 0,95).

Для подвергнутых фитохимическому анализу образцов исследуемых растений была определена антиоксидантная активность, которую оценивали с использованием нескольких методик. Согласно первой методике, об антиоксидантной активности фитопрепаратов судили по их способности ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro* и тем самым предотвращать образование активных форм кислорода [9]. Для этого к 4 мл 0,2 М натрий-карбонатного буфера, pH = 10,65 (устанавливаемое добавлением к 0,2 М раствору Na₂CO₃ сухого реактива NaHCO₃) добавляли 0,2 мл 0,1 % (5,46 мМ) аптечного раствора адреналина гидрохлорида, тщательно и быстро перемешивали, помещали в спектрофотометр СФ-46 и определяли оптическую плотность через 30 с в течение 10 мин при длине волны 347 нм в кювете толщиной 10 мм (D_1). Далее к 4 мл буфера (pH = 10,65) добавляли 0,06 мл исследуемого экстракта и 0,2 мл 0,1 % адреналина гидрохлорида, перемешивали и измеряли оптическую плотность, как описано выше (D_2). Антиоксидантную активность (АА) исследуемых препаратов выражали в процентах ингибирования аутоокисления адреналина и вычисляли по формуле:

$$AA = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 100}{D_1}$$

Значение АА более 10 % свидетельствует о наличии антиоксидантной активности. При расчете антиоксидантной активности также учитывали то, что экстракты имели собственную окраску, которая поглощает определенную длину волны в видимой области спектра.

Сообразно второй методике, для определения антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья использовали амперометрический метод [10]. Измерения проводили на приборе «Цвет Яуза-01-АА» разработки НПО «Химавтоматика». Сущность метода заключается в измерении электрического тока, возникающего при окислении групп –ОН природных

антиоксидантов фенольной природы на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале. 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. Антиоксидантную активность (АОА, мг/г) исследуемых экстрактов, определяемую амперометрическим методом, вычисляли по формуле

$$AOA = CA \cdot V \cdot N \cdot m^{-1} \cdot 10^{-3},$$

где CA – величина антиоксидантной активности кверцетина по калибровочному графику, мг/дм³; V – объем анализируемой пробы, см³; m – навеска анализируемого вещества, г; N – разбавление анализируемого образца.

Среднестатистическое отклонение последовательных измерений анализируемых проб не превышало 3 % отн.

Результаты и их обсуждение

Результаты количественного определения содержания биологически активных веществ в исследуемых образцах лекарственных растений представлены в таблице. Полученные данные показывают, что содержание биологически активных веществ в растениях варьируется в широких пределах. Так, например, массовая доля дубильных веществ в растительном сырье колеблется в довольно значительных пределах от ~1,2 % у *Mentha piperita* L. до ~10 % у *Hypericum perforatum* L. Причем концентрации дубильных веществ, полученные для каждого

образца разными способами, в большинстве случаев совпадают в пределах погрешности измерений. Значительно отличается точность измерения содержания танидов.

Метод Дейса показал наибольшую погрешность в определении дубильных веществ, причем с уменьшением их концентрации наблюдается возрастание погрешности. Это связано, по-видимому, с наличием в растворе низкомолекулярных продуктов, влияющих на результаты измерения. Кроме того, данный метод является небезопасным, т.к. для проведения реакции используются значительные количества токсичного формальдегида.

Метод Левенталья, наиболее часто используемый в фармакопее, показал сравнительно хорошую воспроизводимость. Однако некоторая завышенность результатов определений обусловлена: субъективностью определения конца титрования по появлению золотисто-желтой окраски; сильной зависимостью результатов от интенсивности перемешивания титруемого раствора и освещения; зависимостью расхода перманганата калия от скорости титрования; неприемлемостью применения единого пересчетного коэффициента для растительного сырья, содержащего танинокатехиновую смесь (показано, что в зависимости от исследуемых объектов он может составлять от 0,00416 до 0,00735 [4]).

Применение спектрофотометрического и потенциометрического методов выявило наибольшую сходимость результатов определения дубильных веществ, причем с наименьшей погрешностью. На наш взгляд данные методы позволяют получать наиболее достоверные результаты. В дальнейшем для анализа данных

Таблица

Состав и антиоксидантная активность водных экстрактов исследуемого растительного сырья

Исследуемое растительное сырье	Содержание, % мас.						АА, %	АОА, мг/г
	танидов				флавоноидов	аскорбиновой кислоты		
	методом Левенталья	методом Дейса	спектрофотометрическим методом	потенциометрическим методом				
<i>Mentha piperita</i> L.	1,35 ± 0,03	1,18 ± 0,32	1,22 ± 0,02	1,22 ± 0,01	2,21 ± 0,04	0,28 ± 0,01	21,7	16,548
<i>Satureja hortensis</i> L.	5,10 ± 0,08	4,77 ± 0,24	4,48 ± 0,02	4,46 ± 0,01	1,12 ± 0,02	0,07 ± 0,01	46,0	26,868
<i>Salvia officinalis</i> L.	5,80 ± 0,08	5,74 ± 0,19	5,76 ± 0,04	5,77 ± 0,01	2,79 ± 0,03	0,08 ± 0,01	60,2	48,310
<i>Hypericum perforatum</i> L.	11,04 ± 0,05	...	10,58 ± 0,05	10,56 ± 0,04	4,32 ± 0,01	0,19 ± 0,01	65,3	52,503
<i>Melissa officinalis</i> L.	4,63 ± 0,04	4,58 ± 0,22	4,52 ± 0,02	4,51 ± 0,01	2,06 ± 0,05	0,25 ± 0,01	57,7	37,770
<i>Achillea millefolium</i> L.	3,32 ± 0,03	...	2,99 ± 0,02	2,84 ± 0,02	1,94 ± 0,01	0,10 ± 0,01	38,8	23,516

Примечание: «...» – анализ не проводился.

были использованы значения концентрации танидов, определенные потенциометрически.

Сумма флавоноидов в образцах изученных растений варьирует от 1,12 до 4,32 % мас. Наибольшее содержание флавоноидов определили в *Hypericum perforatum* L. и *Salvia officinalis* L. Наименьшее содержание этой группы веществ установили в *Satureja hortensis* L.

Содержание аскорбиновой кислоты в сырье изученных растений изменяется от 0,067 до 0,283 % мас. Наименьшее содержание аскорбиновой кислоты найдено в *Satureja hortensis* L., а наибольшее - в *Mentha piperita* L.

Поскольку реальные объекты представляют собой довольно сложные по химическому составу системы, то проблемой практического использования антиоксидантов растительного происхождения является количественная оценка их антиоксидантной активности, которая реализуется за счет суммарного содержания и действия восстановителей различной природы. Кроме того, при оценке антиоксидантной способности необходимо учитывать не только природу и содержание восстановителей в исследуемом объекте, но и возможность их взаимного влияния (например, синергизм или антагонизм).

В данной работе нами использован усовершенствованный метод оценки антиоксидантной активности антиоксидантов на начальных этапах свободнорадикального окисления

по ингибированию супероксидрадикала в реакции аутоокисления адреналина в адренохром в щелочной среде [9].

На рис. 1. представлена динамика реакции аутоокисления адреналина имеющая сигмовидный вид. Форма начального участка кривой указывает на существование индукционного периода реакции. Введение в реакционную смесь растительных экстрактов, различающихся концентрацией биологически активных веществ (**БАВ**), не оказывает влияние на форму кривой. Ингибирующее действие рассматриваемых экстрактов проявляется в уменьшении значения оптической плотности (по сравнению с контрольной пробой) и во влиянии на индукционный период, продолжительность которого различна в зависимости от используемого растительного сырья.

Согласно данной методике антиоксидантная активность (**АА**) не может определяться прямым способом, а рассчитывается как относительная величина, и определяется соотношением экстинкций при определенном времени протекания реакции, т.е. времени экспозиции. Поэтому проблемой в оценке АА является выбор времени экспозиции, от которого зависят получаемые экспериментальные данные. В качестве критерия оценки АА нами были выбраны два параметра: традиционный – время экспозиции

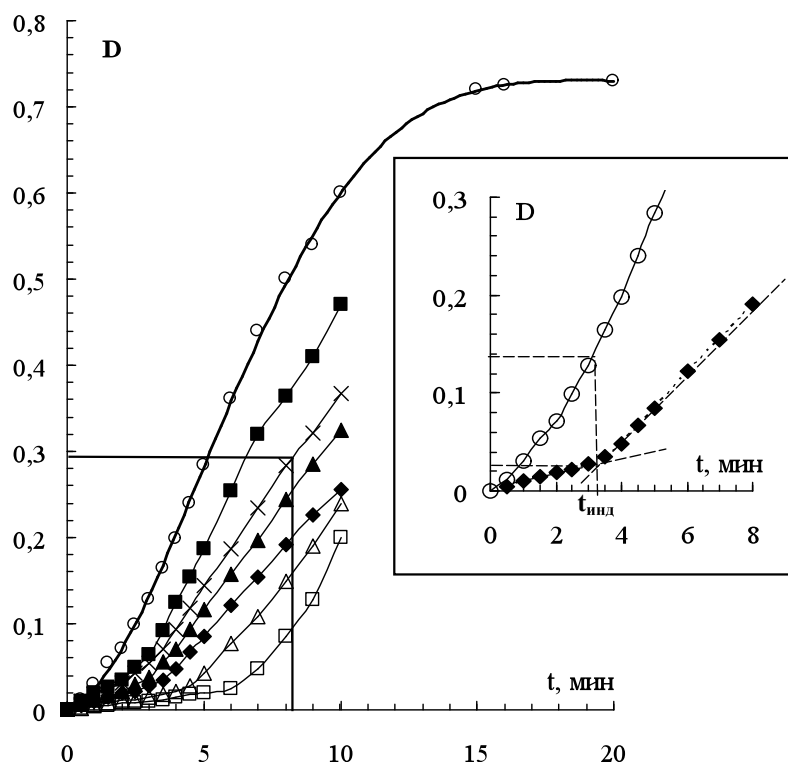


Рис. 1. Зависимость оптической плотности D от времени реакции аутоокисления адреналина t в отсутствие и в присутствии экстрактов растений: \circ – чистый адреналин; \blacksquare - *Mentha piperita* L.; \square - *Hypericum perforatum* L.; \blacktriangle - *Satureja hortensis* L.; \blacklozenge - *Melissa officinalis* L.; \times - *Achillea millefolium* L.; \triangle - *Salvia officinalis* L.

зиции и, второй, предложенный нами, - период индукции.

Для оценки влияния растительных экстрактов на процесс аутоокисления адреналина было выбрано время экспозиции равное 10 мин, поскольку интенсивность образования продукта окисления адреналина наиболее высока в этот промежуток времени. Расчет АА показал, что все исследуемые растительные экстракты обладают высокой антиоксидантной активностью (таблица). Анализируя полученные данные можно отметить, что прослеживается корреляция между показателем АА образцов лекарственных растений и суммарным содержанием в них всех БАВ: дубильных веществ, флавоноидов и аскорбиновой кислоты (рис. 2). Для аппроксимации экспериментальных данных был использован метод наименьших квадратов. Наилучший результат аппроксимации был получен с использованием полиномиальной зависимости. Наблюдающееся отклонение от линейной зависимости, при достижении определенной концентрации (~7-8 % мас.) биологически активных веществ, на наш взгляд связано со сменой антиоксидантного действия прооксидантным.

Для доказательства правильности выбранного критерия, полученные данные были сопоставлены с результатами прямого определения антиоксидантной активности (АОА) амперометрическим методом, которые представлены в таблице. Так же, как и в случае спектрофотометрического метода, наибольшая корреляция прослеживается между показателем АОА и суммарным содержанием БАВ (рис. 3). К тому же эти зависимости удовлетворительно согласуются между собой (рис. 4).

В качестве второго критерия оценки АА мы предлагаем рассмотреть период индукции, который имеется на всех кривых аутоокисления адреналина в присутствии растительных экстрактов (рис. 1) и увеличивающийся с ростом содержания БАВ в экстрактах. Скорее всего, именно в это время БАВ и проявляют свое антиоксидантное действие. При истощении раствора (уменьшении концентрации БАВ) лимитирующей становится реакция окисления адреналина и на кривой наблюдается второй, более вертикальный, участок. Для определения индукционного периода ($t_{\text{инд}}$, мин) рассчитывали точку пересечения прямых линий – горизонтальной, характеризующей длительность индукционного периода, и наклонной, характеризующей протекание самой реакции (рис. 1). Для расчета антиоксидантной активности сначала определяли показатель экстинкции (D_2), отражающий скорость ингибирования аутоокисления адреналина в присутствии исследуемых экстрактов при $t_{\text{инд}}$, а затем показатель экстинкции (D_1), отражаю-

щий аутоокисление адреналина в данный момент времени. Если перестроить график рис. 2 в координатах АА, рассчитанной по оптической плотности растворов в момент времени, равный $t_{\text{инд}}$ от суммарного массового содержания биологически активных веществ (БАВ, %) (рис. 5) и считать, что зависимость имеет тот же полиномиальный характер, то, во-первых, наблюдается возрастание коэффициента корреляции ($R^2 = 0,9935$), а, во-вторых, сходимость между результатами двух методов

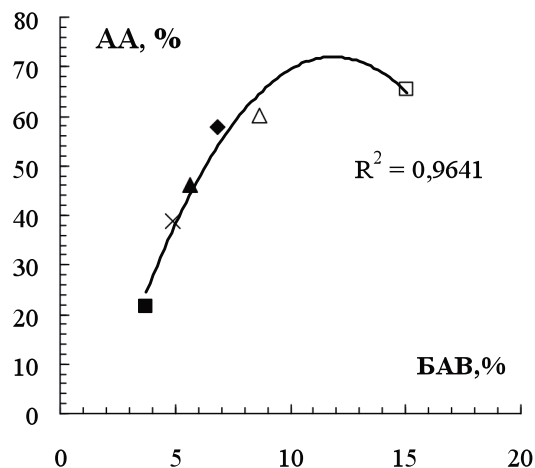


Рис. 2. Зависимость антиоксидантной активности АА от массового содержания биологически активных веществ в растительных экстрактах: ■ - *Mentha piperita* L.; □ - *Hypericum perforatum* L.; ▲ - *Satureja hortensis* L.; ◆ - *Melissa officinalis* L.; x - *Achillea millefolium* L.; Δ - *Salvia officinalis* L.

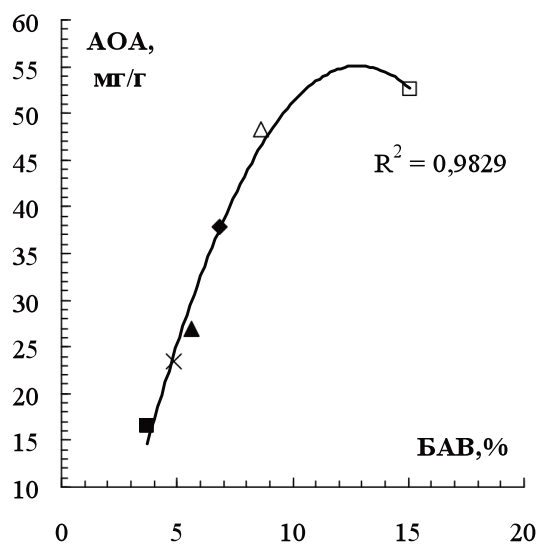


Рис. 3. Зависимость антиоксидантной активности АОА от массового содержания биологически активных веществ в растительных экстрактах: ■ - *Mentha piperita* L.; □ - *Hypericum perforatum* L.; ▲ - *Satureja hortensis* L.; ◆ - *Melissa officinalis* L.; x - *Achillea millefolium* L.; Δ - *Salvia officinalis* L.

становится практически удовлетворительной (рис. 4). Таким образом, период индукции можно считать величиной, определяющей АОА экстрактов.

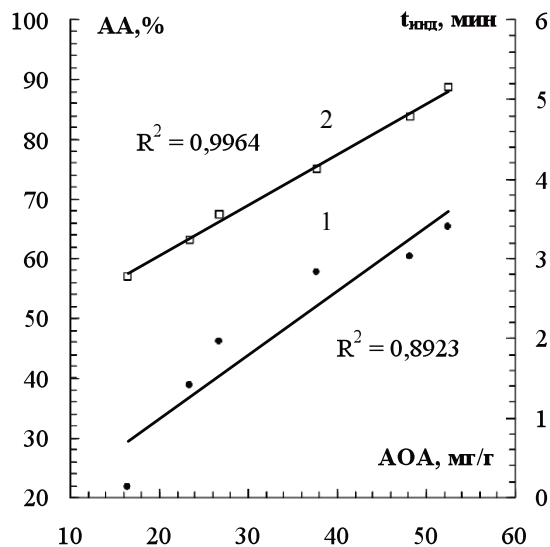


Рис. 4. Сопоставление антиоксидантной активности растительных экстрактов, определенной амперометрическим и спектрофотометрическим, с разным критерием оценки: 1 – по времени экспозиции; 2 – по индукционному периоду) методами

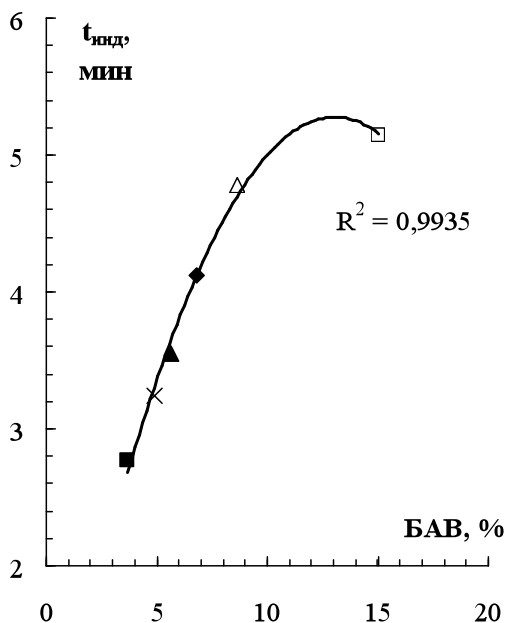


Рис. 5. Зависимость антиоксидантной активности АА, рассчитанной по оптической плотности растворов на момент времени, равный периоду индукции реакции адреналина экстрактами, от массового содержания в них биологически активных веществ: ■ - *Mentha piperita* L.; □ - *Hypericum perforatum* L.; ▲ - *Satureja hortensis* L.; ◆ - *Melissa officinalis* L.; x - *Achillea millefolium* L.; Δ - *Salvia officinalis* L.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что результаты обоих методов (амперометрического и спектрофотометрического), с использованием в качестве критерия оценки антиоксидантной активности периода индукции, дают равноценные результаты и могут быть использованы для определения антиоксидантной активности веществ. Однако в технике исполнения и экспрессности спектрофотометрический метод уступает амперометрическому.

Выводы

Исследован состав водных извлечений шести распространенных лекарственных трав. Рассмотрены различные широко используемые методики количественного определения биологически активных веществ в растительном сырье. Показано, что наиболее чувствительными и специфическими к таниносодержащим компонентам растительных экстрактов являются спектрофотометрический и потенциометрический методы.

Определена антиоксидантная активность растительных экстрактов двумя альтернативными методами: по реакции аутоокисления адреналина и амперометрическим. В целом обе методики дают объективные результаты, согласно которым все исследуемые лекарственные растения в той или иной степени обладают достаточно высокой антиоксидантной активностью.

Выявлена корреляционная связь между суммарным содержанием биологически активных веществ в растительном сырье и антиоксидантной активностью. При достижении определенной массовой концентрации (~7-8 %) биологически активных веществ их антиоксидантное действие сменяется прооксидантным.

Предложен новый критерий в оценки антиоксидантной активности растительных экстрактов в анализе ингибирования реакции аутоокисления адреналина. Доказано, что период индукции можно считать величиной, определяющей антиоксидантную активность экстрактов.

ЛИТЕРАТУРА

- Gutteridge V., Westermarck T., Halliwell B. Oxygen damage in biological systems // Free radical, aging and degenerative disease / [Ed. by Y. Yohson]. New York, 1986. 211 p.
- Онищенко Г.Г. Рекомендуемые уровни потребления пищевых продуктов и биологически активных веществ // Методические рекомендации, Москва, 2004. [Электронный ресурс]: <http://www.estetik-s.com/info-polezno/?sid=312> (дата обращения: 11.12.2010).

3. Ханов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63-75.
4. Государственная фармакопея СССР XI издания. Вып. 2. М., Медицина, 1990. 397 с.
5. Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М.: Мир, 1977. 239 с.
6. Федосеева Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистого (*bergenia crassifolia* (L.) fitsch.), произрастающего на Алтае // Химия растительного сырья. 2005. № 3. С. 45-50.
7. Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И., Рябинин С.В. Сравнительное исследование мелиссы лекарственной и шалфея лекарственно-го на содержание полифенолов // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2009. № 2. С. 32-36.
8. Малахова А.И., Федоровский Н.Н. Исследование состава травы мелиссы лекарственной и ее водного извлечения // Науки о человеке: материалы VIII конгресса молодых ученых и специалистов: тез. докл. Томск: СибГМУ, 2007. С. 230-231.
9. Пат. 2144674 Рос. Федерация. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / Т.В. Сирота: № 9910319214; опубл. 20.01.2000.
10. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека / Я.И. Яшин [и др.]. М.: Транслит., 2009. 212 с.

THE COMPARISON CHEMICAL ANALYTICAL METHODS OF DETERMINATION OF TANIDES AND ANTIOXIDATION ACTIVITY OF PLANT RAW MATERIALS

E.I. Ryabinina, E.E. Zotova, E.N. Vetrova, N.I. Ponomareva

*N.N. Burdenko Voronezh State Medical Academy
Studencheskaya str., 10, Voronezh, 394036 Russia
ryabinina68@mail.ru*

The composition of water extracts of herbs has been investigated. The concentration of tanides was determined with the help of various methods. It is proved, that spectrophotometric and potentiometric methods are the most specific towards phenols of plant extracts. The autooxidation activity of plant extracts was found using two alternative methods: measuring the inhibition of superoxide radical in autooxidation reaction of adrenaline, and using amperometric method. Both techniques give the objective results. The correlation between the total content of biological active compounds in plant raw materials and antioxidation activity was found.

Key words: plant raw materials, tanides, antioxidation activity, autooxidation adrenaline, amperometric method.