

И. В. Шилова¹, С. И. Писарева², Е. А. Краснов¹, М. А. Бружес¹, А. И. Пяк³**АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ ЛИСТЬЕВ БАДАНА ТОЛСТОЛИСТНОГО**¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск;² Институт химии нефти СО РАН, Томск;³ Томский государственный университет

В результате исследований выявлена антиоксидантная активность экстрактов зеленых листьев бадана толстолистного. Установлено, что наибольшей активностью обладает экстракт на 70 % этаноле, который является типичным акцептором пероксирадикалов. При фракционировании активного экстракта получены хлороформная и этилацетатная фракции, обладающие выраженным антиоксидантным действием. Исследованы антиоксидантные свойства индивидуальных соединений активных фракций. Установлено, что фенольные компоненты (гидрохинон, кверцетин, дигидрокверцетин, рутин, галловая кислота, эскулетин) обладают выраженной антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью ионола.

При развитии патологических процессов в организме нарушается равновесие между образованием свободных радикалов и биоантиоксидантной системой организма. В процессе эволюции организмом человека выработались механизмы защиты и детоксикации от свободных радикалов, но процессы репарации не всегда полностью восстанавливают повреждение биологических макромолекул [1, 2]. Поэтому эффективным является минимизация источников свободных радикалов и укрепление естественных антиоксидантных механизмов с помощью дополнительного введения веществ, обладающих антиоксидантными свойствами. В настоящее время доказана необходимость применения антиоксидантов (АО) в качестве средств неспецифической терапии многих заболеваний [3, 4].

Перспективным растением для изучения антиоксидантных свойств является бадан толстолистный (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch.). В официальной медицине растение используют в качестве вяжущего, противовоспалительного, бактерицидного и кровоостанавливающего средства. В народной медицине бадан толстолистный находит широкое применение как ранозаживляющее, дезинфицирующее, тонизирующее и общеукрепляющее средство [5, 6]. Проведенные ранее исследования растения [5, 7, 8] показали наличие комплекса биологически активных веществ (БАВ) фенольной природы: простых фенолов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, кумаринов, дубильных веществ.

Целью настоящей работы явилось исследование антиоксидантных свойств экстрактов листьев бадана толстолистного.

Материалы и методы

В работе использовали зеленые и черные листья бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch.), собранные в 1999 году в фазе цветения — начала плодоношения в окрестностях п. Верхний Уймон Усть-Коксинского района Республики Горный Алтай.

Для получения экстрактов использовали воду и этанол различной концентрации. Фракционирование осуществляли следующими растворителями: хлороформ, этилацетат, бутанол-1. Качественный состав полученных фракций исследовали с помощью качественных реакций и хроматографии в тонком слое и на бумаге с достоверными образцами.

Антиоксидантные свойства экстрактов изучали кинетическим методом анализа на основе модельной цепной реакции инициированного окисления изопропилбензола [9 – 11]. В качестве инициатора использовали азо-бис-изобутиронитрил. Кинетические параметры АО определяли модифицированным методом с добавкой диметилсульфоксида. Измерение антиоксидантной активности (АОА) производили по скорости поглощения кислорода на универсальной газометрической установке. В качестве препарата сравнения использовали ионол.

Содержание АО и их реакционную способность в экстрактах исследовали при температуре 60 °С. Скорость инициирования ($6,8 \cdot 10^{-8}$ моль/л·с) задавалась введением навески инициатора (10,1 мг). Зависимость количества поглощенного кислорода от времени реакции обрабатывали с помощью ЭВМ и выводили на экран дисплея в виде интегральной кривой. Используя программное обеспечение, проводили параллельную обработку информации и определяли значения следующих параметров: период индукции, конечная скорость окисления, константы скорости ингибирования.

Для расчета содержания ингибиторов окисления (C , моль/кг) исследуемых экстрактов использовали соотношение:

$$C = W_i \frac{\tau}{P}, \quad (1)$$

где W_i — скорость инициирования, $6,8 \cdot 10^{-8}$ моль/л·с; τ — период индукции, с; P — навеска анализируемой пробы, кг/л (с учетом объема реакционной смеси 10 мл).

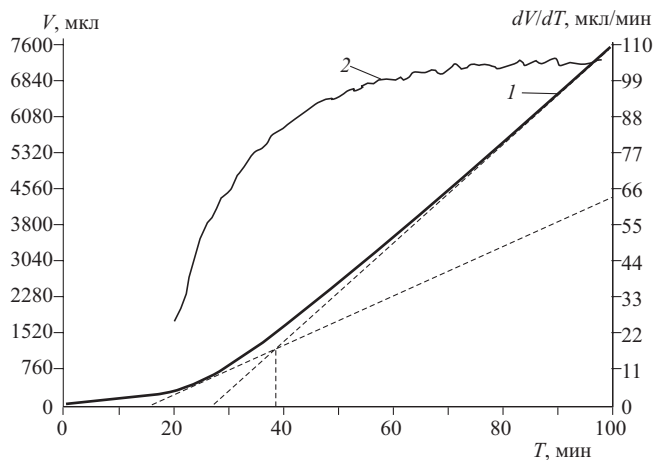


Рис. 1. Кинетическая кривая поглощения кислорода изопропилбензолом (1) и ее производная (2) в присутствии экстракта из зеленых листьев бадана толстолистного на 70 % этаноле

Определения реакционной способности АО проводили по формуле:

$$\frac{[O_2]}{[RH]_0} = \frac{k_3}{k_7} \ln\left(1 - \frac{t}{\tau}\right), \quad (2)$$

где $[O_2]$ — концентрация поглощенного кислорода, моль/л; $[RH]_0$ — концентрация изопропилбензола, 7,14 моль/л; k_3 — константа скорости продолжения цепи, k_7 — константа скорости ингибирования, 1,75 л/моль · с; t — время, с.

Полулогарифмическую анаморфозу кинетической кривой поглощения кислорода изопропилбензолом в присутствии анализируемого экстракта строили в координатах:

$$X = -\lg\left(1 - \frac{t}{\tau}\right); Y = \frac{[O_2]}{[RH]_0}.$$

Для расчета стехиометрического коэффициента индивидуальных соединений использовали следующее соотношение:

$$f = \frac{W_i \tau}{C}, \quad (3)$$

где W_i — скорость иницирования $6,8 \cdot 10^{-8}$ моль/л · с; τ — период индукции, с; C — концентра-

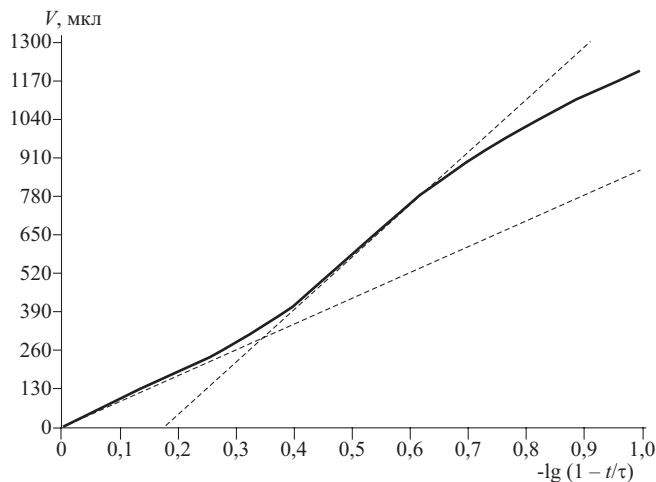


Рис. 2. Полулогарифмическая анаморфоза кинетической кривой поглощения кислорода изопропилбензолом в присутствии экстракта из зеленых листьев бадана толстолистного на 70 % этаноле

ция исследуемого вещества, моль/л (с учетом объема реакционной смеси 10 мл).

Результаты и их обсуждение

Для скрининговых исследований получали ряд экстрактов из зеленых и черных листьев бадана толстолистного с использованием следующих растворителей: вода, 40 %, 70 % и 95 % этанол. Измельченные листья экстрагировали трижды соответствующим растворителем при нагревании на водяной бане с обратным холодильником. Извлечения объединяли и упаривали под вакуумом. Результаты исследования АОА экстрактов из листьев бадана толстолистного представлены в табл. 1.

Водный экстракт бадана имел период индукции 13,74 мин. Содержание АО составило 0,14 моль/кг, в пересчете на ионол — 1,54 %. В экстракте обнаружен один тип АО, реакционная активность которых составляла $5,64 \cdot 10^3$ л/моль · с.

Экстракт бадана на 40 % этаноле имел период индукции 10,78 мин, содержание АО составляло 0,11 моль/кг или, в пересчете на ионол, — 1,21 %. Данный экстракт содержал один тип АО, реакционная способность которых составляла $7,01 \cdot 10^3$ л/моль · с.

Антиоксидантная активность экстрактов листьев бадана толстолистного

Таблица 1

Экстракт	Период индукции, мин	Содержание антиоксидантов, моль/кг	Реакционная активность, л/моль · с		Содержание антиоксидантов в пересчете на ионол, %
			$^1k_7 \cdot 10^3$	$^2k_7 \cdot 10^3$	
Водный экстракт зеленых листьев	13,74	0,140 ± 0,01	5,64	—	1,54
Экстракт зеленых листьев на 40 % этаноле	10,78	0,110 ± 0,01	7,01	—	1,21
Экстракт зеленых листьев на 70 % этаноле	38,84	0,396 ± 0,02	8,21	3,95	4,36
Экстракт зеленых листьев на 95 % этаноле	35,88	0,146 ± 0,02	8,05	5,49	1,61
Экстракт черных листьев на 70 % этаноле	0,630	0,006 ± 0,01	—	—	0,07

Примечание: навеска экстракта равна 4 мг.

Антиоксидантная активность индивидуальных соединений зеленых листьев бадана толстолистного

Соединение	Молекулярная масса	Концентрация · 10 ⁻⁴ , моль/л	Период индукции, мин	Содержание антиоксидантов, моль/кг	Фактор ингибирования	Реакционная активность, л/моль · с		Содержание антиоксидантов в пересчете на ионол, %
						¹ k ₇ · 10 ³	² k ₇ · 10 ³	
Гидрохинон	110,11	0,5	24,5	19,92 ± 0,02	2	101,4	—	220,1
Арбутин	272,25	1,10	—	—	—	—	—	—
Кверцетин	302,95	0,99	60,56	8,24 ± 0,02	2,49	41,0	2,56	90,7
Дигидрокверцетин	304,96	0,98	61,48	8,36 ± 0,01	2,55	7,86	8,57	92,1
Рутин	610,0	0,66	35,3	3,60 ± 0,01	2,0	63,0	2,2	39,6
Галловая кислота	170,12	1,76	60,0	8,16 ± 0,01	1,39	13,1	2,4	89,8
Гентизиновая кислота	154,12	1,94	4,03	0,54 ± 0,01	0,08	—	—	6,0
Эскулетин	178,14	1,68	66,75	9,08 ± 0,02	1,62	4,42	—	100,0
Ионол	220,0	1,36	66,8	9,08 ± 0,01	2	22,0	—	100,0

Примечание: навеска вещества равна 0,3 мг.

Экстракт бадана на 70 % этаноле проявлял свойство АО и являлся типичным акцептором пероксирадикалов: тормозил скорость окисления изопропилбензола в начальный период, имел ярко выраженный период индукции — 38,84 мин и после расходования АО выходил на неингибированный режим (рис. 1, 2). Содержание АО — 0,396 моль/кг или 4,36 % в пересчете на ионол. Полулогарифмическая анаморфоза образца показала (рис. 2), что данный экстракт содержал два типа АО, отличающихся по реакционной активности. Константы скорости ингибирования равны $^1k_7 = 8,21 \cdot 10^3$ л/моль · с и $^2k_7 = 3,95 \cdot 10^3$ л/моль · с.

Экстракт растения на 95 % этаноле также проявлял свойства АО — акцепторов пероксидных радикалов. Его период индукции составлял 35,88 мин, содержание АО — 0,146 моль/кг или, в пересчете на ионол, — 1,61 %. Данный экстракт, как и в предыдущем случае, содержал два типа АО, реакционная активность которых $8,05 \cdot 10^3$ л/моль · с и $5,49 \cdot 10^3$ л/моль · с, соответственно.

Было установлено, что наиболее выраженные антиоксидантные свойства проявил экстракт из зеленых листьев бадана толстолистного на 70 % этаноле. Аналогичный экстракт из черных листьев не имел выраженного периода индукции, содержал ничтожно малое количество АО и не проявлял реакционной способности. Учитывая вышеизложенное, экстракт из зеленых листьев бадана толстолистного на 70 % этаноле подвергали более детальному исследованию. Активный экстракт фракционировали рядом растворителей с увеличивающейся полярностью (хлороформ, этилацетат, бутанол-1). Процесс экстракции осуществляли до полного извлечения экстрагируемых веществ, постепенно уменьшая объем добавляемого растворителя. Извлечения объединяли и упаривали под вакуумом.

Исследования антиоксидантных свойств полученных фракций обнаружили, что хлороформная и этилацетатная фракции проявляли свойства АО — акцепторов пероксирадикалов, имели ярко выраженный период индукции — 52,68 и 48,54 мин; содержали два типа АО, отличающихся по реакционной способности: кон-

станты скорости ингибирования равны $^1k_7 = 2,13 \cdot 10^3$ л/моль · с, $^2k_7 = 1,83 \cdot 10^3$ л/моль · с и $^1k_7 = 5,17 \cdot 10^3$ л/моль · с, $^2k_7 = 3,33 \cdot 10^3$ л/моль · с соответственно. Содержание ингибиторов окисления составляло $0,537 \pm 0,02$ моль/кг или, в пересчете на ионол, — 5,92 % для хлороформной, $0,495 \pm 0,02$ моль/кг и, соответственно, — 5,45 % для этилацетатной фракции. Бутанольная фракция имела период индукции 4,07 мин, содержание АО составляло $0,041 \pm 0,01$ моль/кг или 0,46 % в пересчете на ионол и не обладала реакционной активностью. Водный остаток АОА не проявил.

Исследование химического состава активных фракций показало наличие следующих групп БАВ: в хлороформной фракции — флавоноидов (кемпферол, дигидрокверцетин), кумаринов (эскулетин); в этилацетатной фракции — простых фенолов (гидрохинон, арбутин), флавоноидов (кверцетин, дигидрокверцетин, кемпферол, дигидрокемпферол, изокверцитрин, рутин), фенолкарбоновых кислот (галловая, гентизиновая), гидролизуемых дубильных веществ.

Для установления природы веществ, ответственных за антиоксидантные свойства зеленых листьев бадана толстолистного, исследовали АОА индивидуальных веществ исследуемого растения (табл. 2). Установлено, что фенольные компоненты (гидрохинон, кверцетин, дигидрокверцетин, рутин, галловая кислота, эскулетин) обладают выраженной антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью ионола.

Таким образом, проведенные исследования свойств экстрактов из зеленых листьев бадана толстолистного являются основой для разработки эффективного фитопрепарата с антиоксидантными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Владимиров, *Вестн. РАМН*, № 7, 43 – 50 (1998).
2. В. И. Бобырев, В. Ф. Почерняева, С. Г. Стародубцев и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **57**(1), 47 – 54 (1994).
3. Р. Д. Сейфулла, И. Г. Борисова, *Фармакол. и токсикол.*, **53**(6), 3 – 10 (1990).

4. M. P. Kahkonen, A. I. Horia, H. J. Vuorela, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **47**(10), 3954 – 3962 (1999).
5. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование*, Наука, Ленинград (1987).
6. С. Я. Соколов, *Фитотерапия и фитофармакология*, Медицинское информационное агентство, Москва (2000).
7. П. Б. Лубсандоржиева, *Автореферат дис. канд. фарм. наук*, Улан-Удэ (1997).
8. Л. М. Федосеева, *Автореферат дис. докт. фарм. наук*, Пермь (2001).
9. В. И. Пынченков, С. И. Писарева, *Тез. докл. VI Межд. конф. Биоантиоксидант*, Москва (2002), сс. 485 – 486.
10. В. Ф. Цепалов, А. А. Харитонова, Г. П. Гладышев и др., *Кинетика и катализ*, XXIII (6), 1395 – 1403 (1977).
11. М. Е. Гусейнов, Э. Б. Зейналов, Б. Ю. Грифель и др., *Журн. физ. химии*, № 10, 51 – 54 (1984).

Поступила 30.06.05

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *Bergenia crassifolia* EXTRACT

I. V. Shilova¹, S. I. Pisareva², E. A. Krasnov¹, M. A. Bruzhes¹, and A. I. Pyak³

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

² Institute of Petroleum Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;

³ Tomsk State University, Tomsk, Russia

Ethanol extracts from *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. green leaves exhibit antioxidant properties. The most significant activity has been observed for 70% ethanol extract, which is a typical acceptor of peroxy radicals. Fractionation of the active extract yielded chloroform and ethyl acetate fractions, which also showed a pronounced antioxidant action. Phenolic compounds (hydroquinone, quercetin, dihydroquercetin, rutin, gallic acid, esculetin) also exhibited significant antioxidant activity comparable with that of ionol.