

В. А. Волков, Н. А. Дорофеева, П. М. Пахомов

**КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ**

Тверской государственной университет, Тверь, Россия

В исследовании предложена методика кинетического анализа активности экстрактивных веществ лекарственных растений в отношении стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ). Предложен и теоретически обоснован кинетический параметр для сравнения антирадикальной активности (АРА) экстрактов — начальная скорость расходования ДФПГ при выбранных стандартных условиях. Достигнуто снижение скорости реакции ДФПГ с антиоксидантами (АО) экстрактов растений в среде этанола в 10 – 150 раз путем введения кислот в реакционную среду. С увеличением силы кислоты в оптимальном ее диапазоне скорость реакции снижается. Введение более сильных кислот извне позволило исключить влияние органических кислот, экстрагируемых из растительного материала, на результаты исследований. С помощью программных средств Microcal Origin 7.0 и SYSTAT TableCurve 2D 5.01 найдено общее уравнение кинетической кривой, позволяющее сгладить шумы, уменьшая тем самым погрешности измерений. Доля прореагировавшего за первые 30 мин реакции радикала (PI) в пределах от 0 до 60 % линейно зависит от начальной концентрации антиоксидантов.

**Ключевые слова:** антирадикальная активность, антиоксиданты, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ).

Прямые методы оценки антиоксидантной активности (АОА) как индивидуальных химических соединений, так и композиций сложного состава основаны на изучении влияния антиоксидантов на кинетику модельных реакций окисления углеводов, жирных кислот или биологических материалов [1]. На практике однако очень часто пользуются непрямими методами, в которых изучаются параметры, коррелирующие с антиокислительной активностью антирадикальных антиоксидантов. К их числу относится метод, основанный на взаимодействии АО со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ).

В ряде работ [2 – 5] показано наличие корреляции между результатами, получаемыми этим методом, и результатами, получаемыми прямыми методами. К его достоинствам относятся высокая воспроизводимость, простота выполняемых операций, общедоступность необходимого оборудования, высокая чувствительность, высокая селективность по отношению к антирадикальным АО.

В видимой области спектра ДФПГ в органических растворителях имеет максимум поглощения при длине волны 517 нм (рис. 1), который исчезает при взаимодействии радикала с веществами — донорами атомов водорода или свободными радикалами иного строения [6 – 9].

Реакция ДФПГ с антирадикальными антиоксидантами происходит по последовательно-параллельному механизму. На первом этапе (лимитирующая стадия реакции [4, 9]) молекула антиоксиданта отдает радикалу самый подвижный атом водорода:



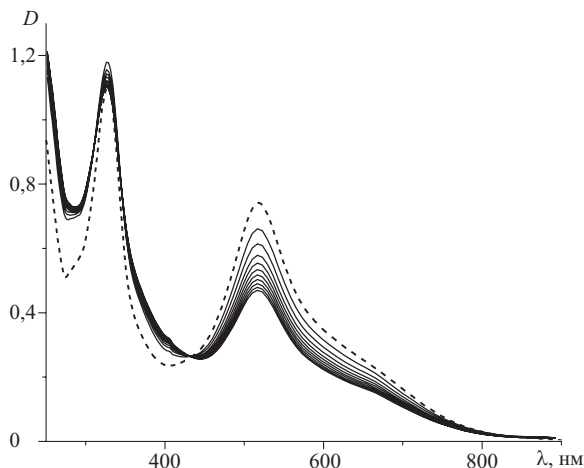
На втором этапе образовавшийся в реакции (1) радикал антиоксиданта атакует новую молекулу ДФПГ в пара-положении фенильного заместителя:



В результате этого также образуется неокрашенный продукт реакции. Согласно [10], реакция (1) может протекать по 2 независимым механизмам (рис. 2): НАТ (hydrogen atom transfer) и SPLET (sequential proton loss — electron transfer). Первый, основанный на непосредственном отрыве атома водорода от молекулы АО, протекает с наибольшей скоростью в неполярных растворителях. Второй, основанный на передаче электрона молекулой ионизированного фенольного АО молекуле ДФПГ, преобладает в растворителях, имеющих высокое сродство к протону.

По данным исследователей [3, 11, 12], в экстрактах растений количественное содержание веществ, активных в отношении ДФПГ, хорошо коррелирует с концентрацией фенольных соединений, что указывает на доминирующую роль последних в суммарной антирадикальной активности растительных экстрактов.

Почти во всех органических растворителях реакция протекает с большой скоростью, что затрудняет кинетические исследования, вынуждая многих авторов ограничиваться лишь нахождением количества АО в растительном экстракте. Кроме того, в чаще всего используемых органических растворителях (метанол, этанол) наибольшую скорость имеет механизм реакции SPLET, в то время как в липидной фазе при ингибировании перекисного окисления липидов антиоксиданты взаимодействуют с радикалами по механизму НАТ, что ставит под сомнение адекватность любых со-



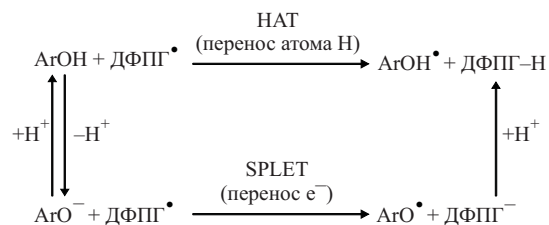
**Рис. 1.** УФ-спектр радикала ДФПГ в этаноле (пунктирная линия) и динамика его изменения после добавления экстракта зверобоя (сплошные линии; проведены через 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27; 30 мин после начала реакции). ДФПГ взят в избытке по отношению к антирадикальным компонентам экстракта. Наряду с плавным падением интенсивности полосы поглощения радикала, имеющей максимум при  $\lambda = 517$  нм, наблюдается скачкообразное возрастание оптической плотности в диапазонах 350 – 420 и  $< 315$  нм в момент введения экстракта в реакционную среду. Последнее обусловлено наличием в экстракте фенольных соединений, которые поглощают в указанных диапазонах длин волн.

поставлений антиоксидантной активности вытяжек из растений с их антирадикальной активностью в отношении ДФПГ [13].

Остается также открытым вопрос о выборе оптимального кинетического параметра для сравнения антирадикальных свойств различных экстрактов. В данном исследовании авторы поставили задачу найти пути решения указанных проблем. Необходимо было также уточнить диапазон линейности зависимости относительного падения оптической плотности ДФПГ (PI) при  $\lambda = 517$  нм за первые 30 мин реакции от начальной суммарной концентрации антиоксидантов в реакционной системе  $[AO]_0$ . В литературе данные по этому вопросу отсутствуют, однако указанная зависимость широко используется для определения значения величины  $IC_{50}$  (концентрация экстракта, при которой  $PI = 50\%$  при данной начальной концентрации радикала  $[ДФПГ]_0$  и фиксированном соотношении объемов смешиваемых растворов; служит условной единицей концентрации АО [14]).

### Материалы и методы

Надземные части 5 видов лекарственных растений (пижма обыкновенная, тысячелистник обыкновенный, полынь обыкновенная, зверобой продырявленный, клевер луговой) были собраны в период цветения 2005 – 2006 гг. на территории Вышневолоцкого и Максатихинского районов Тверской области и высушены согласно [15]. Экстракция измельченного в шаровой мельнице материала производилась 95 % этанолом в течение 30 мин при непрерывном встряхивании с частотой  $120 \text{ мин}^{-1}$ . Соотношение навески и растворите-



**Рис. 2.** Конкурирующие механизмы HAT и SPLET первой (лимитирующей) стадии реакции ДФПГ с фенольными АО [10].

ля 1:120 (масса/объем). Кинетические кривые взаимодействия радикала ДФПГ с экстрактами растений записывались на спектрофотометре “Specord M40” (Carl Zeiss Jena, ГДР), оснащенный компьютером с ПО Soft Spectra 5.0, термостатом и термостатируемыми кюветодержателями. Реакцию проводили в кварцевых кюветах с толщиной слоя образца 10 мм при температуре  $293 \pm 1$  К путем приливания 2,4 мл  $8,7 \cdot 10^{-5}$  М раствора ДФПГ в этаноле к 0,8 мл исследуемого экстракта, концентрация которого равнялась  $IC_{50}$ . Обработка кривых осуществлялась на ПЭВМ с использованием программных средств Microcal Origin 7.0 и SYSTAT TableCurve 2D 5.1.

### Результаты и их обсуждение

#### Исследование зависимости PI от $[AO]_0$

На рис. 3 размещены в одной координатной плоскости экспериментальные точки, полученные из опытов по определению PI для серий последовательных разбавлений 5 экстрактов разных лекарственных растений. Из графика следует, что все точки хорошо укладываются на 1 кривую; диапазон линейности зависимости PI от  $[AO]_0$  составляет 0 – 60 %. Это позволяет производить линейную интерполяцию и экстерполяцию данных в указанном интервале PI для установления концентрации экстракта, соответствующей  $IC_{50}$ .

#### Кинетические исследования

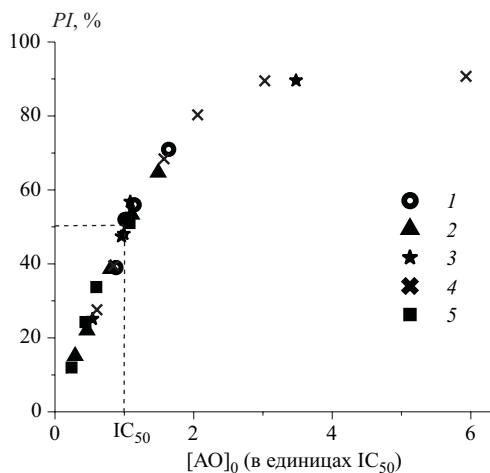
Мы предлагаем использовать начальную скорость реакции при определенных, фиксированных значениях начальной концентрации ДФПГ и суммы антиоксидантов, в качестве кинетического параметра для сравнения АРА экстрактов различных растений.

В соответствии с законами формальной кинетики

$$V_0 = (k_{эфф})_0 [ДФПГ]_0^m [АО]_0^n, \quad (3)$$

где  $V_0$  — начальная скорость реакции,  $(k_{эфф})_0$  — эффективная (кажущаяся) константа скорости реакции в начальный момент времени,  $m$  и  $n$  — эффективные (кажущиеся) частные порядки реакции по ДФПГ и АО соответственно. Согласно [9], для фенольных АО  $n = m = 1$ . Таким образом,  $V_0$  линейно связана с  $(k_{эфф})_0$ .

По своему физическому смыслу  $(k_{эфф})_0$  есть сумма констант скоростей взаимодействия индивидуальных антиоксидантов с ДФПГ на первой стадии, умноженных на их мольную долю в сумме АО данного экстракта:



**Рис. 3.** Зависимость глубины превращения ДФПГ за первые 30 мин реакции (PI) от относительной концентрации АО в экстрактах полыни обыкновенной (1), клевера лугового (2), пижмы обыкновенной (3), звербоя продырявленного (4), тысячелистника обыкновенного (5).

$$(k_{\text{эфф}})_0 = k_1 \frac{(C_1)_0}{[\text{AO}]_0} + k_2 \frac{(C_2)_0}{[\text{AO}]_0} + \dots + k_n \frac{(C_n)_0}{[\text{AO}]_0}, \quad (4)$$

где  $(C_1)_0, (C_2)_0, \dots, (C_n)_0$ ;  $k_1, k_2, \dots, k_n$  — начальные концентрации индивидуальных АО и соответствующие им константы скорости реакции с ДФПГ на первой стадии.  $k_{\text{эфф}}$  является переменной, монотонно убывающей величиной, поскольку в ходе реакции меняется состав АО в сторону уменьшения доли наиболее активных соединений, быстро расходующихся в начале процесса.

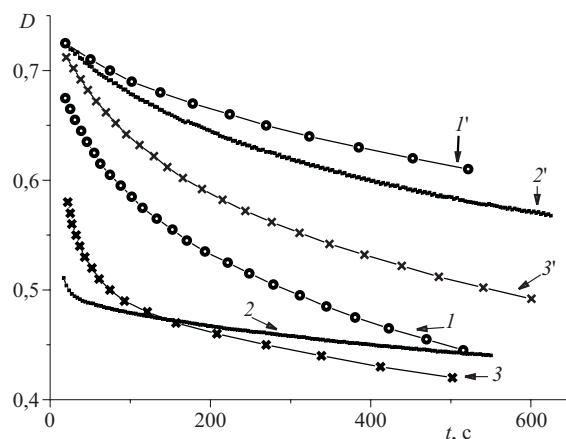
Значение величины  $V_0$ , как и  $(k_{\text{эфф}})_0$ , определяется главным образом величинами констант скорости и мольной долей в сумме АО наиболее активных компонентов, которые и вносят наибольший вклад в антиоксидантные свойства экстракта.

То, что вычисление  $V_0$  позволяет “увидеть” самые активные АО, дает преимущества этой величине по сравнению с временем полупревращения ДФПГ ( $t_{1/2}$ ), предложенным в качестве кинетического параметра в [16]. В последнем случае из-за изменения состава АО в ходе реакции время полупревращения будет обратно пропорционально не  $(k_{\text{эфф}})_0$ , а некоему среднему значению  $k_{\text{эфф}} < (k_{\text{эфф}})_0$  за период от смешивания реагентов до  $t_{1/2}$ . Это значение  $k_{\text{эфф}}$  будет соответствовать тому моменту, когда самые активные антиоксиданты уже израсходовались.

С помощью ПС Microcal Origin 7.0 и (независимо) SYSTAT TableCurve 2D 5.1 получено уравнение, описывающее все кинетические кривые взаимодействия ДФПГ с АО экстрактов растений с высокой точностью ( $r^2 > 99,9\%$ ):

$$D_{\text{ДФПГ}} = D_{\infty} + A_1 \exp(-t/a_1) + A_2 \exp(-t/a_2), \quad (5)$$

где  $D_{\text{ДФПГ}}$  — оптическая плотность раствора при  $\lambda = 517$  нм,  $t$  — время от начала реакции,  $D_{\infty}, A_1, A_2, a_1, a_2$  — параметры, подбираемые программой. В про-



**Рис. 4.** Кинетические кривые падения оптической плотности ДФПГ при  $\lambda = 517$  нм в ходе взаимодействия с АО экстрактов звербоя продырявленного (1), пижмы обыкновенной (2), тысячелистника обыкновенного (3). 1', 2', 3' — те же эксперименты в присутствии 50 мМ уксусной кислоты.  $[\text{ДФПГ}]_0 = 6,5 \cdot 10^{-5}$  М,  $[\text{АО}]_0 = \text{IC}_{50}$ .

граммном меню Origin этому уравнению дано название “Exponential Decay 2”; буквенные обозначения параметров нами изменены с учетом их физического смысла.

Таким образом, зная время от смешивания реагентов до начала регистрации кинетической кривой прибором и начальную оптическую плотность ДФПГ, можно аппроксимировать кривую на начальный момент и вычислить начальную скорость:

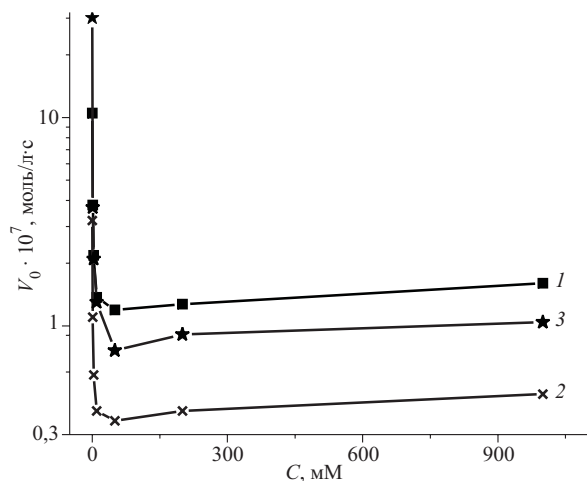
$$V_0 = (A_1/a_1 + A_2/a_2) \varepsilon_{\text{ДФПГ}}^{-1}, \quad (6)$$

где  $\varepsilon_{\text{ДФПГ}}$  — молярный коэффициент экстинкции ДФПГ в этаноле, равный  $(1,15 \pm 0,02) \cdot 10^4$  моль $^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [17]. Это значение определено для  $\lambda = 516$  нм, однако из-за большой ширины пика экстинкция ДФПГ при  $\lambda = 517$  нм, по нашим данным, отличается от таковой при 516 нм менее чем на 0,1%, что намного меньше погрешности определения  $\varepsilon_{\text{ДФПГ}}$ .

Применение уравнения (6) позволяет сгладить шумы на кинетических кривых и, таким образом, снизить погрешности при их дифференцировании, а также аппроксимировать кривые на момент  $t = 0$ , поскольку на использованном нами оборудовании период от смешивания реагентов до начала регистрации кинетической кривой составлял около 20 с.

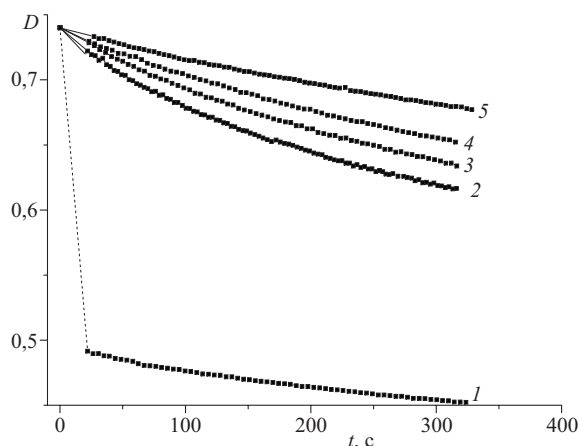
Как уже сказано выше, антиоксиданты растений реагируют с ДФПГ в этаноле с большой скоростью (рис. 4, кривые 1–3), что затрудняет нахождение  $V_0$ , которая получается при этом заниженной по сравнению с истинным значением, особенно в случае наиболее активных экстрактов, поскольку запись кинетической кривой начинается при существенной глубине превращения исходных компонентов.

Дальнейшие эксперименты показали, что высокая скорость взаимодействия ДФПГ с АО экстрактов растений обусловлена резким преобладанием механизма SPLET над механизмом НАГ реакции (1).

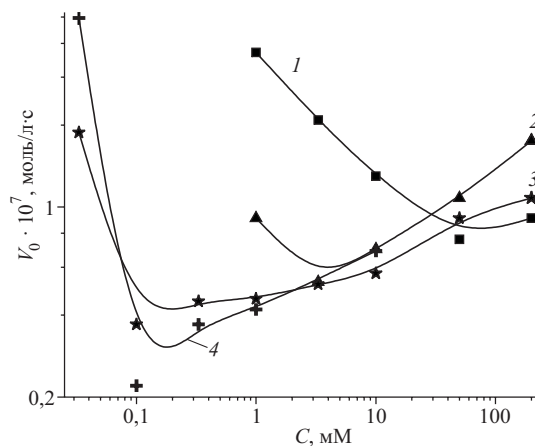


**Рис. 5.** Изменения начальной скорости взаимодействия ДФПГ с антиоксидантами экстрактов тысячелистника обыкновенного (1), зверобоя продырявленного (2), пижмы обыкновенной (3) в среде этанола в присутствии уксусной кислоты в концентрациях: 0; 1; 3,3; 10; 50; 200; 1000 мМ (в полулогарифмическом масштабе).

Введение уксусной кислоты в реакционную смесь вызывает резкое падение скорости реакции (рис. 4, кривые 1' – 3'), причем для всех исследованных экстрактов оптимальная концентрация уксусной кислоты составила около 50 мМ (рис. 5); при этом начальная скорость реакции была в 10 – 40 раз ниже по сравнению с опытами без добавления кислоты. При увеличении силы вводимой кислоты (монохлоруксусная, трихлоруксусная, соляная) оптимальная концентрация кислоты сдвигалась в сторону меньших значений (3,3 мМ для монохлоруксусной, 0,1 мМ для трихлоруксусной и соляной, рис. 6). Скорость реакции в оптимумах также уменьшалась по мере возрастания силы кислоты. В экспериментах с экстрактом пижмы обыкновенной  $V_0$  уменьшилась в 1,4 раза в присутствии монохлоруксус-



**Рис. 7.** Кинетические кривые падения оптической плотности ДФПГ при  $\lambda = 517$  нм в ходе взаимодействия с АО спиртового экстракта пижмы обыкновенной: без подкисления среды (1); в присутствии 50 мМ уксусной кислоты (2); 3,3 мМ монохлоруксусной кислоты (3); 0,1 мМ трихлоруксусной кислоты (4); 0,1 мМ соляной кислоты (5).  $[ДФПГ]_0 = 6,5 \cdot 10^{-5}$  М,  $[АО]_0 = IC_{50}$ . Пунктиром на кривой 1 обозначено резкое падение оптической плотности в самом начале процесса.



**Рис. 6.** Изменения начальной скорости реакции ДФПГ с АО экстракта пижмы обыкновенной (в логарифмическом масштабе) при введении в реакционную систему кислот в различной концентрации: уксусной (1), монохлоруксусной (2), трихлоруксусной (3), соляной (4).

ной, в 2,1 раза — трихлоруксусной и 3,4 раза — соляной кислоты по сравнению со скоростью в присутствии уксусной кислоты (концентрации кислот соответствовали оптимальным). На рис. 7 показаны кинетические кривые падения оптической плотности ДФПГ при взаимодействии с АО экстракта пижмы обыкновенной без добавления кислоты (1) и при оптимальных концентрациях кислот в реакционной среде (2 – 5).

В этаноле, подкисленном 0,1 мМ HCl, наблюдается наиболее плавное протекание процесса; это обеспечивает максимальную точность расчетов.

Согласно полученным нами данным, кислоты в указанных выше оптимальных концентрациях не оказывают существенного влияния ни на коэффициент экстинкции ДФПГ в этаноле, ни на устойчивость радикала и антирадикальных компонентов экстрактов. Наиболее сильные кислоты при концентрациях, значительно превосходящих оптимальные (200 мМ трихлоруксусная, 100 мМ соляная), вызывали ускоренную деградацию ДФПГ.

Относительная погрешность измерения  $V_0$  не превышает 15 %, что приблизительно равно погрешности вычисления кинетических параметров для реакций ДФПГ с индивидуальными веществами, где возможен расчет константы скорости с использованием кинетических уравнений [17]. Поскольку в соответствии с теорией Ingold, et al. [10] снижение скорости реакции при введении кислоты в систему происходит вследствие подавления механизма SPLET, можно сделать предположение о том, что получаемые таким способом данные должны лучше коррелировать с экспериментами по ингибированию цепного свободнорадикального окисления, что требует экспериментальной проверки в дальнейшем. Кроме того, спиртовые извлечения из растений всегда содержат органические кислоты, различные по силе и в разных концентрациях, что может существенно влиять на результаты, получаемые

без добавления кислот извне. Путем подавления механизма SPLET это влияние исключается.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что изучение АРА-извлечений из лекарственных растений кинетическим методом по взаимодействию с радикалом ДФПГ в среде этанола наиболее целесообразно проводить при подкислении растворителя 0,1 мМ HCl.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Рогинский, *Сб. докл. научно-практического семинара "Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения"*, 14–15 сентября 2004 г., РУДН, Москва (2005), сс. 89–91.
2. В. А. Silva, F. Ferreres, J. O. Malva, and A. C. P. Dias, *Food Chem.*, **90**(1–2), 157–167 (2005).
3. С. Imark, M. Kneubühl, and S. Bodmer, *Innovat. Food Sci. & Emerg. Technol.*, **1**(4), 239–243 (2000).
4. W. Bondet, W. Brand-Williams, and C. Berset, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **30**, 609–615 (1997).
5. K. Schwarz, G. Bertelsen, L. R. Nissen, et al., *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 319–328 (2001).
6. А. Л. Бучаченко, А. М. Вассерман, *Стабильные радикалы. Электронное строение, реакционная способность и применение*, Химия, Москва (1973).
7. Э. Г. Розанцев, *Свободные иминоксильные радикалы*, Химия, Москва (1970).
8. Д. Х. Китаева, Т. М. Туреханов, Л. Б. Ирискина и др., *Некоторые модельные реакции тестирования антиоксидантов*, Черногловка (1987).
9. N. Nishimura and T. Moriya, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **50**(8), 1969–1974 (1977).
10. G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, **69**, 5888–5896 (2004).
11. L. M. Cheung, P. C. K. Cheung, and V. E. C. Ooi, *Food Chem.*, **81**(2), 249–255 (2003).
12. G. Mliauskas, P. R. Venskutonis, and T. A. van Beek, *Food Chem.*, **85**(2), 231–237 (2004).
13. G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, **68**, 3433–3438 (2003).
14. О. I. Aruoma, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523–524, 9–20 (2003).
15. *Государственная фармакопея СССР*, 11-е изд., Вып. 2, Медицина, Москва (1990).
16. Т. А. Филиппенко, Н. И. Белая, Ф. Н. Николаевский, *Хим.-фарм. журн.*, **38**(8), 34–36 (2004).
17. М. С. Foti, C. Daquino, and C. Geraci, *J. Org. Chem.*, **69**(7), 2309–2314 (2004).

Поступила 11.07.07

## KINETIC METHOD FOR STUDYING THE ANTIRADICAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS

V. A. Volkov, N. A. Dorofeeva, and P. M. Pakhomov

Tver State University, Tver, Russia

A kinetic method of investigation of the activity of medicinal plant extracts with respect to stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical is developed. The initial rate of DPPH decay under standard conditions is suggested and theoretically justified as a kinetic parameter to compare the antiradical activity of extracts. A 10- to 150-fold decrease of the DPPH reaction rate with antioxidants of plant extracts in aqueous ethanol solutions is achieved by adding acids into the reaction medium. The reaction rate at the optimum acid concentration decreases with increasing acid strength. Using this approach, the influence of organic acids extracted from the plant material on the results can be excluded by adding stronger acids. A decrease in the noise level on the kinetic curves and, hence, in the error of measurements is achieved by smoothing data in terms of a general equation of the kinetic curve obtained using the Microcal Origin 7.0 and SYSTAT TableCurve 2D 5.1 software. It is found that, in an interval from 0 to 60%, the DPPH conversion degree after the first 30 min of reaction linearly depends on the initial antioxidant concentration.

**Key words:** antiradical activity, antioxidants, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)