

АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ГОЛУБИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Буренкова Ю.П., Хрусталёв В.В.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра общей химии*

Ключевые слова: голубика обыкновенная, флавоноиды, антиоксидантная активность.

Резюме. В работе приведены результаты качественного микрохимического анализа спиртового экстракта листьев голубики обыкновенной. Содержатся результаты анализа антиоксидантной активности этого извлечения, рассчитан суммарный показатель антиоксидантной активности.

Resume. The results of the qualitative chemical analysis of the alcoholic extract of leaves of northern bilberry are reflected in the article. The result of the analysis of the extract antioxidant activity is reflected, the total antioxidant activity for them is calculated.

Актуальность. Поиск новых лекарственных средств (ЛС) и новых источников биологически активных веществ (БАВ) для лечения заболеваний – одна из основных задач современной науки. Лекарственное растительное сырьё (ЛРС) как источник БАВ для производства ЛС обладает рядом преимуществ: низким риском развития побочных эффектов, возможностью длительного использования при хронических заболеваниях, широкой доступностью и низкой стоимостью ЛРС.

Одна из самых фармакологически активных и активно изучаемых групп среди БАВ ЛРС – флавоноиды. Широко известны такие свойства флавоноидов (в частности, содержащихся в листьях голубики обыкновенной), как антиоксидантная активность (АОА), гипогликемическая, антиатеросклеротическая активность, иммуностимулирующее, капилляропротекторное действие, онкопротекторный и радиопротекторный эффекты [5]. ЛРС, обладающее данной совокупностью эффектов, с давних времен широко используется народной медициной в терапии сахарного диабета (СД) [6, 7]. Количество состоящих на диспансерном учете пациентов с СД в РБ превышает 254 593 человек, отмечается рост заболеваемости. Одним из растений, действующим как антиоксидант и оказывающим протекторное действие на организм при СД является голубика обыкновенная.

Голубика обыкновенная (лат. *Vaccinium uliginosum*) мало изучена и не используется официальной медициной. Она не включена в Государственную фармакопею Республики Беларусь (ГФ РБ), поэтому ЛРС голубики не стандартизуется, а ЛС не производятся. Исследования противодиабетического действия голубики обыкновенной немногочисленны [5]. Основной противодиабетический эффект оказывают фенольные соединения – флавоноиды и дубильные вещества.

Цель: изучить состав фенольных соединений листьев голубики, определить антиоксидантную активность флавоноидов данного ЛРС.

Задачи:

1. Изучить химический состав биологически активных веществ голубики обыкновенной, механизм их гипогликемического действия.
2. Провести экстракцию фенольных соединений из ЛРС.
3. Доказать качественными реакциями наличие в извлечении флавоноидов.
4. Провести изучение АОА полученного экстракта в сравнении с веществами с достоверно высокой АОА с помощью спектрофотометрии.
5. Вычислить показатель суммарной АОА экстракта голубики листьев.

Материал и методы. Для исследования брали листья голубики обыкновенной, заготовленные в фазу плодоношения летом 2014 г. в Речицком районе Гомельской области. Заготовка проводилась в сухую погоду, вручную. Сушка проводилась естественным способом, в тени, в хорошо проветриваемом помещении. Листья до анализа хранились в матерчатых мешках. Оборудование, химическая посуда и реактивы были предоставлены кафедрой общей химии БГМУ.

Для изучения биологически активных веществ листьев голубики нами проведена экстракция спиртом 70%. Разведение спирта проводилось с использованием алкоголетрических таблиц ГФ РБ [2]. В колбу на 50 мл помещали 2,0 измельченного до 1 мм сырья голубики обыкновенной листьев. Заливали 20,0 мл 70% этилового спирта. Настаивали 24 часа. Затем процеживали в коническую колбу. Полученное спиртовое извлечение затем переносили в две пробирки, выпаривали до водного остатка и разделяли флавоноиды на фракции растворителем с возрастающей полярностью (этиловым эфиром – преимущественно агликоны флавоноидов, затем н-бутанолом – преимущественно гликозиды).

Кроме флавоноидов, дополнительное влияние на АОА могли оказать также содержащиеся в листьях голубики обыкновенной другие фенольные соединения – дубильные вещества, простые фенолы, фенольные кислоты, оксикоричные кислоты и спирты, кумарины, фенолокарбоновые кислоты. Однако по данным литературы, в листьях голубики доминирующей группой БАВ являются флавоноиды, поэтому АОА оценивалась по методике для флавоноидов [3, 5, 8].

Для подтверждения наличия в изучаемом ЛРС флавоноидов были проведены качественные реакции с использованием спиртового извлечения. Цианидиновая проба (восстановление флавонолов, флавонов, флаванонов до антоцианидинов): к 2 мл извлечения добавили 7 капель конц. HCl и 15 мг металлического цинка, подогрели в течение 2 мин на кипящей водяной бане, через 2 мин наблюдали изменение окрашивания. Реакция с хлоридом алюминия: к 1 мл извлечения прибавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 96% спирте и 7 мл 96% спирта. Реакция с 10 %-ным раствором NaOH: к 1 мл извлечения добавляли 3 капли 10 % спиртового раствора NaOH.

Для оценки АОА использовали методику, основанную на ингибировании автоокисления адреналина в щелочной среде (реакция образования адренохрома – Рисунок 1).

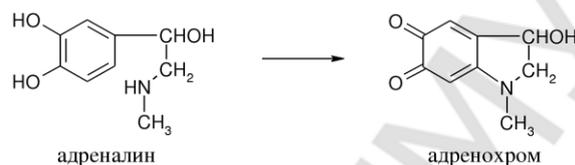


Рис. 1 – Реакция образования адренохрома

Для проведения измерений был приготовлен 0,2 М бикарбонатный буфер, рН 10,6. В качестве раствора сравнения использовали раствор того же состава без адреналина. В качестве стандартного вещества, обладающего выраженной АОА, использовали аскорбиновую кислоту.

Для измерения оптической плотности изготавливались пять проб. Первая – контроль – 3,0 мл буферного раствора и 0,6 мл 0,1% водного раствора адреналина гидрохлорида. Остальные пробы – первая с добавлением антиоксиданта.

Вторая – добавляли 3,0 мл 50 мг/мл аскорбиновой кислоты. Третья – 3,0 мл исходного спиртового извлечения листьев голубики обыкновенной. Четвертая – 3,0 мл фракции этилового эфира. Пятая – 3,0 мл фракции н-бутанола. Пробы перед измерением оптической плотности инкубировались при 37 °С 10 минут.

К 2 мл 0,2 М бикарбонатного буфера (рН 10,6) прибавляли 0,4 мл 0,18% водного раствора адреналина г/х и 0,2 мл исследуемого препарата. Пробы инкубировали при 40°С 10 мин. Значение оптической плотности регистрировали на спектрофотометре «Solar PV 1251С» при длинах волн от 400 до 500 нм с помощью программы «Биохим». При обработке результатов учитывали, если показатель АОА больше 10%, то извлечение обладает высокой АОА, если меньше 10% - низкой. Расчёты проводились для длины волны 480 нм, характерной для поглощения адренохрома. Расчёт АОА проводили по формуле 1:

$$A = (OD_1 - OD_2) / OD_1 \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где OD_1 – изменение оптической плотности пробы в отсутствие исследуемого вещества, OD_2 – изменение оптической плотности пробы в присутствии исследуемого вещества.

Результаты и их обсуждение. Изученные данные литературы, а также результаты исследований химического состава листьев голубики, проведенные ДВГМУ [5, 3], позволяют утверждать, что листья голубики обыкновенной в составе БАВ содержат такие флавоноиды, как гиперин, кемпферол, кверцетин, дигидрокверцетин, грайанотоксин, мирицетин, лютеолин.

Флавоноиды показали себя как хорошие ингибиторы фермента альдозоредуктазы, за счёт взаимодействия с его активным центром [1]. Кроме того, благодаря своей АОА, флавоноиды являются блокаторами перекисного окисления липидов. Наиболее активно в окислительно-восстановительные реакции вступают флавоноиды, имеющие в своем составе –ОН группы в кольце В и С, а также двойную С2-С3 связь.

Были изучены данные литературы, согласно которым АОА не ограничивается влиянием на процессы перекисного окисления [6, 7]. Они способны активировать

природные механизмы клеточной защиты от окислительного стресса [4]. Напротив, в раковых клетках некоторые флавоноиды снижают их активность, приводя к развитию окислительного стресса и апоптозу [4].

Проведена экстракция фенольных соединений из листьев голубики, содержащих широкий их спектр: флавоноиды, дубильные вещества, антоцианы, и др. В результате проведённых экспериментов было доказано наличие флавоноидов в экстракте (таблица 1).

Таблица 1. Результаты качественного анализа экстракта листьев голубики на флавоноиды

Реактив	Результат реакции
Конц. HCl и металлический цинк	красное окрашивание
2 % спиртовой раствор AlCl ₃	желтое окрашивание в УФ-свете желтое свечение
10% раствор натрия гидроксида	зеленое окрашивание

Поскольку в результате качественного определения было установлено наличие в ЛРС флавоноидов, а данная группа веществ зарекомендовала себя в качестве наиболее эффективных природных антиоксидантов, целесообразным представлялось проведение исследования АОА извлечения листьев голубики обыкновенной. Примеры полученных графиков оптической плотности при длинах волн 400-500 нм представлены на рисунке 2 (а – проба с витамином С, б – проба с эфирной фракцией).

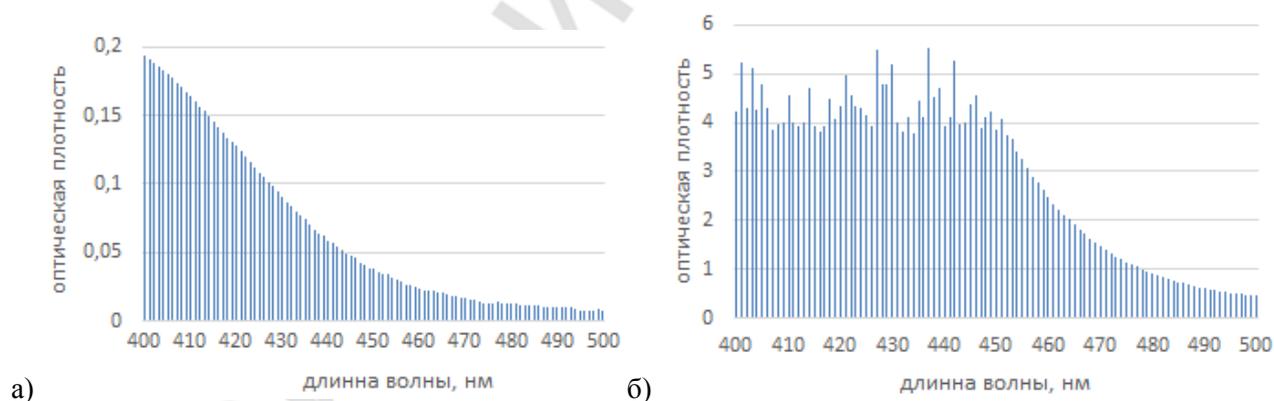


Рис. 2 – График значений оптической плотности

Выявлено наличие АОА спиртового извлечения листьев голубики. Результаты с указанием доверительных интервалов отражены в диаграмме (рисунок 3).

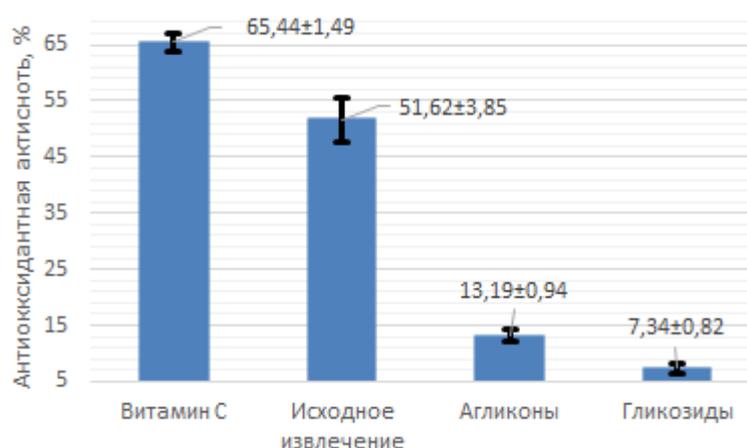


Рис. 3 – Показатели суммарной АОА исследованных проб

АОА пробы с витамином С составила 65,44±1,49%. Экстракт листьев голубики обыкновенной обладает АОА, равной 51,62±3,85%. Это значение

сопоставимо (меньше всего в 1,27 раз) со значением АОА витамина С, который является известным антиоксидантом. Меньше АОА у раствора, содержащего преимущественно агликоны – $13,19 \pm 0,94\%$. Однако, это значение превышает 10% - следовательно обладает хорошей АОА. Фракция же н-буматанола, содержащая преимущественно гликозиды, обладает низкой АОА, равной $7,34 \pm 0,82\%$. Это согласуется с данными литературы.

Выводы:

1. Проведённый химический анализ голубики листьев, заготовленных на территории РБ, доказал наличие флавоноидов в них.

2. Рассчитан показатель суммарной АОА спиртового извлечения листьев голубики обыкновенной. По сравнению с витамином С – веществом с доказанной высокой АОА – экстракт листьев голубики также показал высокую АОА, обусловленную в основном в большей степени агликонами флавоноидов, чем гликозидами. Также можно утверждать, что на АОА листьев голубики обыкновенной сильное влияние оказывают и другие фенольные соединения, а также сопутствующие вещества.

3. Обоснована перспективность дальнейшего исследования голубики листьев с целью внедрения фитопрепаратов из них в фармацевтическую практику как противодиабетических и антиоксидантных средств.

Литература

1. Буренкова, Ю.П. Возможности связывания флавоноидов голубики обыкновенной с ферментными системами человека / Ю. П. Буренкова // Материалы 68-й научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием. – 2014. – статья 1.10.2.

2. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II). В 2 т. Т. 1. Общие методы контроля лекарственных средств / под общ. ред. А. А. Шерякова; УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». – Молодечно: Типография «Победа», 2012. – 1220 с.

3. Охрименко, Л.П. Исследование фенольных соединений листьев голубики, брусники, толокнянки, черники и зимолобки, произрастающих в республике Саха / Л.П. Охрименко, Г.И. Калинкина, Е.А. Лукша, и др. // Химия растительного сырья. — 2009. — №3. — С. 109–115.

4. Тараховский, Ю. С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов и др. — Пушино: Synchronbook, 2013. — 310 с.

5. Цимбалист, Н. А. Фармакогностическое изучение и стандартизация сбора противодиабетического: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Н. А. Цимбалист. – Пермь, 2008. – 22 с.

6. Abd El-Baky, A. E. Quercetin protective action on oxidative stress, sorbitol, insulin resistance and β -cells function in experimental diabetic rats / A. E. Abd El-Baky // International Journal of Pharmaceutical Studies and Research Vol. II. — 2011, April-June. — Issue II. — P. 11–18.

7. Stefek, M. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract / M. Stefek // Interdisciplinary Toxicology. — 2011. — Vol. 4(2). — P. 69-77.