

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ СУХОГО ЭКСТРАКТА PADUS GRAYANAE MAXIM

Исмаилов И. З.¹, Сабирова Т. С.²

¹Исмаилов Исабек Зайладинович / Ismailov Isabek Zailadinovich – кандидат фармацевтических наук, доцент;

²Сабирова Тамара Семеновна / Sabirova Tamara Semenovna – кандидат медицинских наук, доцент,
кафедра базисной и клинической фармакологии,

Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева, г. Бишкек, Кыргызская Республика

Аннотация: на этапе доклинического исследования экстрактов растительного происхождения одним из необходимых тестов является изучение их антиоксидантной активности. В результате серии проведенных экспериментов в условиях *in vitro* с использованием метода DPPH изучены антиоксидантные свойства *Padus Grayanae Maxim* и Эхинацеи пурпурной. Установлено, что средние значения IC_{50}^{DPPH} фитопрепарата Эхинацеи пурпурной (Иммунал) и сухого экстракта *Padus Grayanae Maxim* сопоставимы и существенных отличий не имеют. Оба изучаемых фитоэкстракта обладают умеренно выраженными антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление, антиоксиданты, метод DPPH, *Padus Grayanae Maxim*, *Echinacea purpurea Moench*.

Введение. Как известно, процессы свободно-радикального окисления (СРО) липидов носят общебиологический характер и при их резкой активации, по мнению многих авторов, являются универсальным механизмом альтерации клеток на уровне мембран. В настоящее время можно утверждать, что в конечном итоге практически все реакции клеточных мембран на повреждение обусловлены свободно – радикальной агрессией и процессами перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков – важнейших компонентов клеточной стенки. Процессы ПОЛ, активируются при любых воспалительных заболеваниях, иммунологическом повреждении клеточных мембран, воздействии на организм различных стрессирующих факторов и лекарственных препаратов, канцерогенезе, недостатке витаминов и некоторых микроэлементов, лучевой болезни, старении [1, с. 297-299; 2, 3, 4]. Причем, степень повреждения тканей зависит от соотношения между накоплением свободных радикалов и количеством защитных антиоксидантов [5].

В нормальных условиях неферментативное СРО липидов ограничивается физиологической антиоксидантной системой. В клетках она представлена двумя основными механизмами: антирадикальным, обеспечивающим восстановление свободных радикалов (токоферол, аскорбат, полифенолы, глутатион), в том числе кислорода (супероксиддисмутаза) и антиперекисным, элиминирующим перекиси водорода и липиды (каталаза, пероксидаза и др.).

Учитывая накопленные знания, в настоящее время исследуются различные варианты фармакологических вмешательств с целью уменьшения образования активных форм кислорода и обезвреживания уже имеющихся свободных радикалов с помощью антиоксидантов.

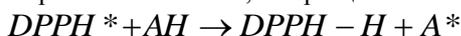
Особый интерес в этом плане представляют флавоноиды, содержащиеся в растительных экстрактах, которые обладают способностью участвовать в защите от окислительного стресса благодаря выраженной антиоксидантной активности, которая особенно присуща метаболитам кверцетина [6, с. 120-122; 7, с. 397-441]. Поэтому на этапе доклинического исследования экстрактов растительного происхождения одним из необходимых тестов является изучение их антиоксидантной активности [8, с. 16-23; 9, 50-58].

Цель данного исследования – оценка степени выраженности антиоксидантных свойств сухого экстракта *Padus Grayanae Maxim*.

Материал и методы исследования. Объектом исследования служил сухой экстракт, полученный методом лиофильной сушки водно-спиртового извлечения из надземных частей *Padus Grayanae Maxim*. [10, с. 100-102].

Методы исследования. В серии экспериментов *in vitro* антиоксидантная активность тестируемого сухого экстракта *Padus Grayanae Maxim* изучалась методом DPPH на спектрофотометре Beckman coulter DU-520 UV-Visible (Scanning Spectrophotometer, США).

В качестве метода оценки антиоксидантной активности использовалась колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (C₁₈H₁₂N₅O₆, M = 394,33), растворенного в этаноле, с образцом антиоксиданта (АН), протекающая по схеме:



В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в этаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности обычными методами спектрофотометрии [11, с.1198-1200; 12, с. 235-254; 13, с. 689-695].

В качестве препарата сравнения использовался иммуномодулятор растительного происхождения Иммунал (Сандоз д.д. Любляна, Словения).

Экспериментальная часть. Антиоксидантную активность *Padus Grayanae Maxim* и *Echinacea purpurea* определяли по значению величины IC50 (концентрация экстракта, при которой PI=50%, при данной начальной концентрации радикала DPPH и фиксированном соотношении объемов разведенных растворов).

Навеска испытуемого образца сухого экстракта *Padus Grayanae Maxim* 0,5 грамм + 50 мл (70⁰ этанола) помещалась в водяную баню на 30 минут. После фильтрации экстракта этанолом доводили объем до 50 мл.

В качестве препарата сравнения использовали разрешенный к медицинскому применению препарат Иммунал, 1 мл которого содержал 0,8 мл сока, полученного из свежее собранной травы эхинацеи пурпурной. К 0,5 мл фитопрепарата *Echinaseae purpurea* добавили 4,5 мл 70% этанола для получения исходного раствора.

Далее тестируемые образцы разбавляли в соотношении 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100 для определения значения величины IC50. После смешивания экстрактов с DPPH образцы переносили в темноту на 30 минут и снимали показания на спектрофотометре при длине волны 517 нм. Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Excel в версии 2013г. по формуле:

$$\text{Антиоксидантная активность} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \%$$

Где:

A₀ – величина антиоксидантного поглощение DPPH раствора (контроль);

A₁ – антиоксидантная активность исследуемого раствора с DPPH реактивом.

Антирадикальные свойства растительного экстракта рассчитывались по значению IC50 DPPH (мкг/мл) - концентрации антиоксидантов, которые ингибируют свободные радикалы DPPH на 50%. Исследования антиоксидантной активности растительного экстракта *Padus Grajana Maxim* проводились в трехкратной повторности.

Таблица 1. Результаты оценки антиоксидантной активности растительного экстракта *Padus Grayanae Maxim*

Разбавление	Антиоксидантная активность в растительном экстракте, %	IC50 ^{DPPH} мкг/мл
<i>I повторность</i>		
Исходный	27.64	45,4
1:10	13.57	
1:20	12.41	
1:40	19.53	
1:60	67.54	
1:80	99.83	
1:100	101.98	
<i>II повторность</i>		
Исходный	24.11	51,7
1:10	11.39	
1:20	12.42	
1:40	14.34	
1:60	51.92	
1:80	91.27	
1:100	97.04	
<i>III повторность</i>		
Исходный	21.04	56,7
1:10	13.94	
1:20	10.7	
1:40	11.58	
1:60	52.42	
1:80	77.08	
1:100	91.4	
Среднее		51,2

Процент падения радикалов DPPH в зависимости от концентрации изучаемого фитоэкстракта показан на рисунке 1.

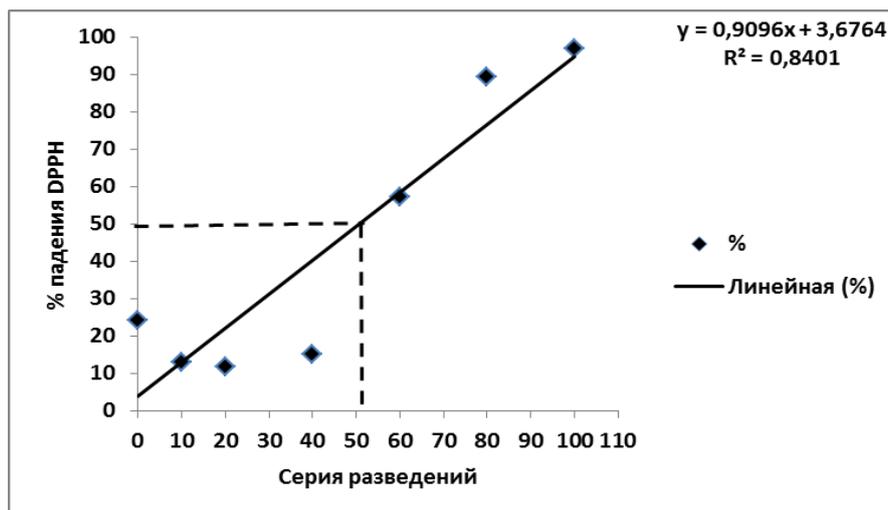


Рис. 1. Среднее значение IC_{50}^{DPPH} в экстракте *Padus Grayne Maxim*

Полученные данные позволили установить, что средняя антиоксидантная активность растительного экстракта *Padus Grayne Maxim* равна $IC_{50}^{DPPH} = 51,2$ мкг/мл.

Таблица 2. Результаты оценки антиоксидантной активности фитопрепарата Иммунал

Разбавление	Антиоксидантная активность в растительном экстракте, %	IC_{50}^{DPPH} мкг/мл
I повторность		
1:10	30.45	$IC_{50} = 55$
1:20	21.50	
1:40	18.84	
1:60	46.65	
1:80	78.09	
1:100	87.22	
II повторность		
1:10	33.11	$IC_{50} = 55$
1:20	21.71	
1:40	19.29	
1:60	41.88	
1:80	81.80	
1:100	91.23	
III повторность		
1:10	32.09	$IC_{50} = 47$
1:20	22.20	
1:40	16.70	
1:60	50.34	
1:80	94.28	
1:100	118.53	
Среднее		$IC_{50} = 52,33$

Процент падения радикалов DPPH в зависимости от концентрации изучаемого препарата Иммунал представлен на рисунке 2.

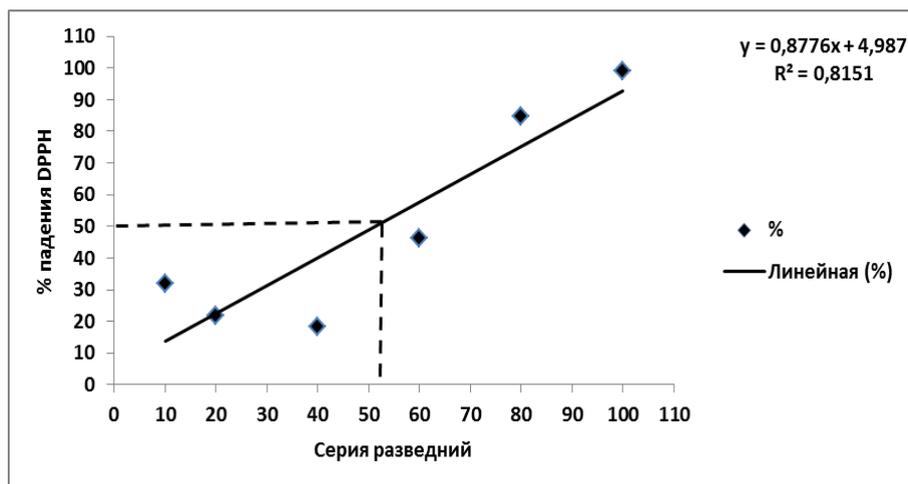


Рис. 2. Среднее значение IC_{50}^{DPPH} в фитопрепарате Иммунал

Как видно из представленных данных, средняя антиоксидантная активность растительного препарата Иммунал равна $IC_{50}^{DPPH} = 52,33$ мкг/мл.

Заключение. Результаты экспериментов в условиях *in vitro* с использованием метода DPPH показали, что средние значения IC_{50}^{DPPH} фитопрепарата Эхинацеи пурпурной (Иммунал) и сухого экстракта *Radus Grayanae Maxim* сопоставимы и существенных отличий не имеют. Оба изучаемых фитоэкстракта обладают умеренно выраженными антиоксидантными свойствами.

Литература

1. Абдрашитова Н. Ф., Фархутдинов Р. Р., Загидулин Ш. З., Камилев Ф. Сравнительный анализ влияния антибиотиков на свободно-радикальное окисление *in vitro* и *in vivo* // Бюлл. эксперим. биологии и медицины, 1998. Т.1 25, № 3. С. 297-299.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
3. Барабой В. А., Орел В. Э., Карнаух И. М. Перекисное окисление и радиация. К.: Наукова Думка, 1991. 256 с.
4. Журавлев А. И., Зубкова С. М. Антиоксиданты. Свободно-радикальная патология. Москва: Изд-во ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К. И. Скрябина, 2008. 272с.
5. Hensley K., Floyd R. A. Methods in pharmacology and toxicology: methods in biological oxidative stress. Totowa: Humana Press, 2003. 215 p.
6. Габитова Д. М., Рыжикова В. О., Рыжикова М. А. Влияние антиоксидантных веществ на процессы свободно-радикального окисления // Башкирский химический журнал, 2006. Т. 13. № 4. С. 120-122.
7. Andesen O. M., Markham K. R. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, 2006. № 8. P. 397-441.
8. Владимиров Ю. А. Активированная хемилюминесценция и билюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях // Соросовский образовательный журнал, 2001. Т. 7. № 1. С. 16-23.
9. Нанаева М. Т., Зурдинов А. З., Сабирова Т. С. и др. Использование метода активированной хемилюминесценции при изучении фармакологических свойств лекарственных препаратов // Вопросы медицинской химии, 1995. Т. 41, вып. 5. С. 50-58.
10. Исмаилов И. З. Разработка технологии получения сухого экстракта *Radus Grayanae Maxim* // Наука, техника и образование (Москва), 2016. № 10 (28). С. 100-102.
11. Blois M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical // Nature, 1958. V. 26. P. 1198-1200.
12. Roginsky V. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food // Food Chem., 2005. Vol. 92. № 2. P. 235-254.
13. Hager T. J. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products // J. Agric. and Food Chem., 2008. Vol. 56. № 3. P. 689-695.