УДК 582.736: 581.198

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДО- И ЖИРОРАСТВОРИМЫХ СОЕДИНЕНИЙ СЕМЯН *TRIGONELLA FOENUMGRAECUM* L.

Е.Д. Агабалаева

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь
e-mail: plechischik@rambler.ru

Введение

В настоящее время является актуальной проблема получения на основе лекарственных растений Беларуси фитопрепаратов, обладающих ярко выраженным антиоксидантным действием. Это связано с общемировой тенденцией отказа от искусственно синтезированных соединений и поиска их аналогов в природе, в частности в растительном мире. Растительные ресурсы Республики Беларусь являются хорошим источником биологически активных соединений. Как свидетельствуют результаты многочисленных исследований отечественных и зарубежных ученых, многочисленныелекарственные растения, ранее применявшиеся в народной медицине, обладают определенными лечебными свойствами и входят в арсенал медикаментозных средств, используемых в современной врачебной практике [1].Они обладают существенным преимуществом перед синтетическими препаратами, характеризуясь мягким и более широким спектром терапевтического действия. С целью расширения сырьевой базы фитопрепаратов в Центральном ботаническом саду проводятся работы по изучению лекарственных растений для дальнейшей их интродукции в условиях Беларуси.

В настоящее время установлено, что возникновение и развитие широкого спектрамногих заболеваний, в том числе, нарушений иммунитета, сердечно-сосудистых заболеваний, гепатита, цирроза печени и онкологий [2, 3], обусловлено патофизиологическим действием радикалов на клетки и ткани. Свободно-радикальное окисление обусловлено активными формами кислорода, образующимися в результате ферментативной деятельности оксидоредуктазы. При этом образуются ионы кислорода и перекись водорода. Активные формы кислорода инициируют перекисное окисление жирных кислот и их дериватов, что приводит к образованию карбонильных соединений, связывающихся с нуклеиновыми кислотами и белками. Таким образом, антиоксидантная защита может стать важным фактором на пути мутагенных изменений, ведущих к образованию неопластических клеток и опухолевой прогрессии. Поэтому, в последнее время представляется весьма актуальным изучение лекарственных растений, обладающих высокой антиоксидантной активностью (АОА).

Основными критериями отбора растительного сырья в качестве источника антиоксидантов (АО) является высокое содержание действующих веществ, не токсичность для человека, доступность сырья в природе или несложная технология его культивирования. К таким растениям можно отнести пажитник греческий (*Trigonella foenumgraecum* L.) – однолетнее лекарственное растение семейства Fabaceae*,* экстракты семян которого обладают антидиабетическим, антисклеротическим, противовоспалительным, антимикробным действием [4].

Целью данной работы явилось изучение антиоксидантной активности (АОА) сортов пажитника греческого (*T. Foenumgraecum* L.*)* различного географического происхождения и исследование корреляционной связи между величиной АОА и содержанием биологически активных соединений (БАС) данных сортов. В работах зарубежных и отечественных исследователей [5, 6] показано, что для определения общей АОА целесообразно применять несколько методов, характеризующиеся разными механизмами действия и позволяющие оценить антиоксидантное действие как водо- так и жирорастворимых соединений.

Методы исследования

В качестве объектов исследования служили семена пажитника греческого различного географического происхождения: Obanos, Blidet, Chiadoncha (Испания), 19X, H-26, D19 (Сирия), Gers (Франция), Metha (Индия), Ghahkamon (Ливия), OvaryGold, Ovary 4, линия PSZ.G.SZ (Венгрия).

Определение влажности растительного сырья проводили в соответствии с методом, определенным Государственной Фармакопеей РБ, том 3, высушиванием до постоянной массы при 100–105ºС. Для оценки общей АОА сортов пажитника греческого различного географического происхождения мы применяли два метода определения АОА, которые в настоящее время наиболее часто используются в биохимических исследованиях: спектрофотометрический метод в системе с катион-радикалами АБТС$^{+\bullet}$ (катион 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновой кислоты) по методу [7] и фотохеми-люминесцентный метод. Данные методы позволяют определить суммарную антиоксидантную характеристику многочисленных химических соединений, которые могут быть совершенно различными по своей природе и находится в экстрактах как в макро- так и в микроконцентрациях. Такая интегральная характеристика представляет большую практическую ценность, поскольку суммарные антиоксидантные свойства АО не являются аддитивной величиной и многие сочетания природных АО обладают синергетическими свойствами.

Для изучения АОА методом *ABTS* экстракцию проводили расчетным количеством водно-спиртовой смеси (конечная концентрация 70% по этанолу) на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов. Затем 70–200 мкл водно-этанольного экстракта семян пажитника греческого добавляли к 2,0 мл раствора АБТС+• в стеклянной кювете и при температуре 25°С измеряли поглощение смеси при 734 нм в течение 6 минут (спектрофотометр Agilent 8453) при постоянном перемешивании. Для характеристики антиоксидантной активности использовали значение оптической плотности спустя 1 и 6 минут после смешивания. Активность экстрактов реакции с АБТС+• определялась относительно тролокса как стандарта. Сравнительная оценка антиоксидантной активности велась по величине антиоксидантного параметра, который рассчитывался как тангенс угла наклона прямых зависимостей D_0–D от количества сухого вещества в граммах, используемого для реакции, и тролокса в мкмоль, а также по параметру антиоксидантной активности (АОА), представляющей собой величину, показывающую количество мкмоль эквивалента тролокса /г сухой массы семян. Результаты рассчитывали в эквивалентах тролокса. Данные по оценке АОА пажитника греческого, полученные в системе с катион-радикалами АБТС$^{+\bullet}$, публиковались ранее в наших статьях [8]. В данной работе одной из задач явилось сравнение двух независимых методов определения АОА.

Для исследования АОА водорастворимых веществ (ACW) растений фотохемилюминесцентным методом готовили водные экстракты растений. 1 г измельченного растительного сырья помещали в колбу, заливали 100 мл дистиллированной воды комнатной температуры и настаивали на кипящей водяной бане при периодическом помешивании в течение 15 мин. Для исследования АОА жирорастворимых веществ (ACL) растений фотохемилюминесцентным методом готовили этанольные экстракты растений в соотношении 1 г измельченного растительного сырья:100 мл этилового спирта. Полученные экстракты хорошо взбалтывали и помещали в темное место для настаивания в течение 24 часов. По истечении 24 часов настои процеживали. Приготовленные экстракты хранили в темном месте при t=4^{o}C.

Измерение АОА осуществляли на анализаторе антиоксидантов и свободных радикалов *Photochem* (Германия). Метод основан на измерении фотосенсибилизирующей хемилюминесценции и предназначен для количественного определения антиоксидантной активности. Принцип метода заключается в следующем. В результате добавления фотосенсибилизатора, входящего в состав одного из реагентов, в исследуемый образец при

оптическом возбуждении происходит образование супероксид анион радикалов. Часть данных радикалов в ходе реакции гасится присутствующими в образце антиоксидантами, а оставшаяся часть вызывает свечение люминола в измерительной ячейке, благодаря чему и определяется антиоксидантная активность пробы. Для данного метода характерна высокая чувствительность, короткое время измерений, а также высокая воспроизводимость результатов. Калибровку и измерения проводили в соответствии со стандартными протоколами, установленными производителем. Результаты АОА, измеренной фотохемилюминисцентным методом, рассчитывали в эквивалентах аскорбиновой кислоты и тролокса для водорастворимых и жирорастворимых веществ соответственно и выражали в мкмоль/г сухого растения.

Результаты и обсуждение

Полученные данные об АОА спектрофотометрическим и фотохемилюминисцентным методами представлены в таблице 1. Из таблицы видно, что АОА семян пажитника греческого, измеренная при помощи АБТС$^{+\bullet}$, варьировала в пределах от 13,15 до 17,84 мкмоль тролокса/г сухих семян (после 1 мин проведения эксперимента) и от 16,50 до 21,61 мкмоль тролокса/г сухих семян (после 6 мин проведения эксперимента). Из сравнения характера кинетических кривых (рисунок 1) и показателей АОАв течение 1 и 6 мин реакции можно сделать вывод, что антиоксиданты реагировали с катион-радикалами в течение первой минуты, обеспечивая 80–91% вклада АОА, а затем протекала более медленная стадия, на протяжении которой, возможно, проходила реакция с катион-радикалами продуктов окисления антиоксидантов, образовавшихся на начальной стадии процесса.

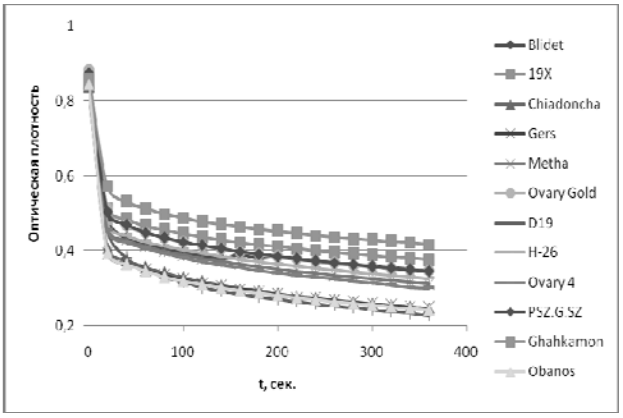

Рисунок 1 – Кинетические кривые реакции взаимодействия АО с катион-радикалом АБТС$^{+\bullet}$ во времени (t)

ACW семян пажитника греческого, измеренная фотохемилюминесцентным методом, варьировала в пределах от 11,73 (сорт 19X) до 32,84 мкмоль/г (сорт Obanos), в то время как ACL – от 2,36(сорт Obanos) до 14,45 мкмоль/г (сорт 19X). При этом минимальной ACW в семенах пажитника греческого обладали линия PSZ.G.SZ и сорт OvaryGold, а максимальной – сорта Gers, Obanos, Ghahkamon. Иная картина наблюдается при исследовании ACL. Так все исследуемые сорта по величине ACL в семенах пажитника греческого разделились на 2 группы: сорта, обладающие высокой ACL (8,31–14,45мкмоль/г), и низкой ACL (2,36–3,54 мкмоль/г). В первую группу вошли такие сорта, как 19X, H-26, Metha, OvaryGold, Ovary 4 и линия PSZ.G.SZ, а в другую – Obanos, Blidet, Chiadoncha, D19, Ghahkamon, Gers.

Таблица 1 – Антиоксидантная активность семян *Trigonella foenumgraecum* L.

Сорт	АОА, измеренная в системе с АБТС$^{+\bullet}$, мкмоль тролокса / г сухих семян		АОА, измеренная при помощи Photochem, мкмоль/г	
	АОА после 1 мин эксперимента	АОА после 6 мин эксперимента	водорастворимых компонентов (АОАв)	жирорастворимых компонентов (АОАж)
Ovary 4	15,2±0,16	17,87±0,46	22,48±0,19	10,63±0,45
Ovary Gold	13,47±0,65	16,76±0,81	14,66±0,24	9,22±0,41
PSZ.G.SZ	13,15±0,64	16,50±0,84	16,72±0,35	8,31±0,36
Obanos	17,77±0,30	21,16±0,18	32,84±0,92	2,36±0,10
Blidet	15,09±0,23	16,53±0,30	22,26±0,51	2,77±0,13
Chiadoncha	15,17±0,69	18,78±0,84	23,07±0,36	2,37±0,11
H-26	15,48±0,70	18,87±0,83	21,92±0,38	13,31±0,06
19X	14,14±0,59	17,1±0,61	11,73±0,02	14,45±0,06
D19	15,05±0,75	18,8±0,84	24,52±0,63	3,54±0,08
Ghahkamon	17,49±0,37	21,12±0,62	25,04±0,04	2,71±0,07
Gers	17,84±0,57	21,61±0,76	32,57±1,02	2,56±0,09
Metha	14,42±0,66	17,37±0,77	19,99±0,11	13,29±0,51

Нами была проведена корреляция между исследуемыми методами измерения АОА. Коэффициент корреляции (r) между величинами АОА, измеренной в системе с АБТС$^{+\bullet}$ после 1 и 6 минут проведения реакции, и ACW составил 0,89 и 0,85 соответственно. Соответственно, можно предположить, что в 70% водно-этанольных экстрактах семян пажитника греческого в основном присутствуют водорастворимые АО, что и обуславливает высокую положительную корреляцию между методами ABTS и ACW.

Кроме того, была выявлена отрицательная корреляционная связь между ACW и ACL (r=-0,70), ABTS 1 min и ACL (r=-0,59), ABTS 6 min и ACL (r=-0,55). Данный факт свидетельствует о том, что чем больше в семенах пажитника греческого водорастворимых АО, тем меньше содержание в нем жирорастворимых.

В более раннихработах [7, 9] нами были изучены основные группы БАС семян пажитника греческого и проведен корреляционный анализ между показателями АОА, измеренной в системе с катион-радикаломАБТС$^{+\bullet}$, и основными группами БАС, такими как флавоноиды, стероидные сапонины и каротиноиды.

Следует отметить, что коэффициент корреляции был выше между АОА, измеренной методом ABTS, и содержанием флавоноидов и составлял 0,82 и 0,78 (соответственно после 1 и 6 минут проведения испытаний). Меньшее значение коэффициента корреляции наблюдалось между показателем АОА и содержанием стероидных сапонинов и составляло 0,624 и 0,718 (после 1 и 6 минуты проведения эксперимента). Не было обнаружено корреляционной связи между показателями ABTS 1 min, ABTS 6 min и содержанием каротиноидов в семенах пажитника греческого.

В данной работе мы провели расчёт коэффициентов корреляции между содержанием БАС и АОА, измеренной фотохемилюминесцентным методом. Статистический анализ показал положительную корреляционную связь между показателями ACW и БАС, характеризующуюся как значительная для флавоноидов (r=0,85), фенольных соединений (r=0,70) и умеренная для стероидных сапонинов (r=0,35).

Следует отметить отсутствие корреляции между ACL и содержанием каротиноидов в семенах пажитника греческого. Это может быть обусловлено тем, что существенный вклад в интегральную ACL семян *T. foenumgraecum* L. помимо каротиноидов, вносят другие жирорастворимые антиоксиданты. На рисунке 2 представлена корреляционная связь между величиной ACW и содержанием флавоноидов (в пересчете на рутин).

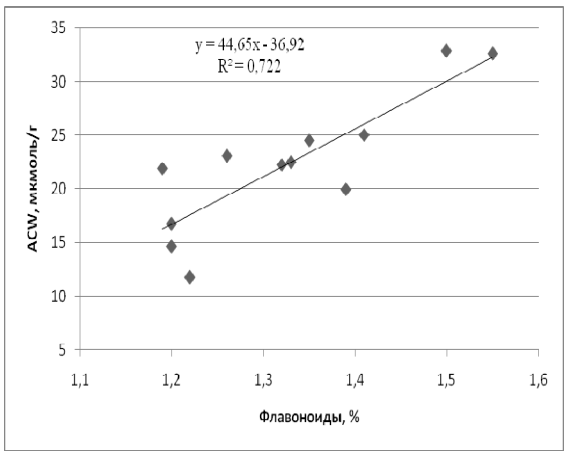

Рисунок 2 – Корреляционная связь между ACW, мкмоль/г и содержанием флавоноидов,%

Выводы

В результате исследований была определена антиоксидантная активность семян *Trigonella foenumgraecum* L. различного географического происхождения спектрофотометрическим и фотохемилюминесцентным методом, а также проведена корреляционная связь между показателями АОА и основными группами БАС (сумма фенольных соединений, флавоноиды, стероидные сапонины, каротиноиды).

В целом, следует отметить, что максимальные значения АОА водорастворимых соединений в семенах пажитника греческого характерны для сорта Gers, Obanos, Ghahkamon, а минимальные – для линии PSZ.G.SZ и сорта 19X и OvaryGold. Противоположная картина наблюдается при исследовании АОА жирорастворимых соединений. Так максимальная ACL характерна для сортов 19X, H-26, Metha, а минимальная – для сортов Obanos, Chiadoncha, Gers, Ghahkamon. Показана положительная корреляционная связь между показателями ACW и БАС, характеризующаяся как значительная для флавоноидов (r=0,85), фенольных соединений (r=0,70) и умеренная для стероидных сапонинов (r=0,35). Таким образом, показана перспективность использования пажитника греческого как растительного сырья, обладающего антиоксидантной активностью.

Список литературы

1.Абдулин, И.Ф. Органические антиоксиданты как объекты анализа / И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2001. – Т.167, № 6. – С. 3–13.

2.Барабой, В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. – М., Наука, 1984. – 160 с.

3.Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В.Н. Бобырев [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 1994. — Т. 57, №1. – С. 47–54.

4. Srinivasan, K. Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*): A review of health beneficial physiological effect / K. Srinivasan // Food reviews international. – 2006. – Vol. 22, №2. – P. 203–224.

5.Prior, R.L. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements / R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53, № 10. − P. 4290–4302.

6.Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, ГЛ. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растительного сырья. − 2004. − №3. − С. 63–75.

7.Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay / R. Re [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26, № 9/10. – P. 1231–1237.

8.Изучение антиоксидантной активности экстрактов семян *Trigonella foenumgraecum* L. / Е.Д.Агабалаева [и др.] // Химия и технология растительных экстрактов: материалы междунар. научно-практ. конф., Кутаиси, 10 сент. 2011 г. / Гос. ун-т им. А. Церетели; редкол. В.Г. Хведелидзе [и др.]. – Кутаиси, 2011. – С. 58–61.

9.Содержание биологически активных соединений в экстрактах семян пажитника греческого (*Trigonella foenumgraecum* L.) / Е.Д. Агабалаева [и др.] // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2011 – Вып. 71: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 557–565.