

Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) экстрактов цветов тысячелистника благородного (1), таволгового (2), и каратавского (3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Vitalini, S. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity/S. Vitalini [et al]//Acta Biochim, 2011. – V. 58. – P.203-209.
2. Serdar, G. Extraction of antioxidative principles of *Achillea biserrata* M. Bieb. And chromatographic analyses/G. Serdar [et al]// J. of Secondary Metabolite, 2015. – V.2. – P.3-15.
3. Benetis, R. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* wild populations in Lithuania/R. Benetis, J. Radusiene, V. Janulis//Medicina (Kaunas), 2008. – V. 44 (10). – P.775-781.
4. Taskin, D. Analysis of natural dyestuffs in *Achillea grandifolia* Friv. Using HPLC-DAD and Q-TOF LC/MS/D. Taskin, D.B. Alkaya, E. Dolen//Indian J. of Traditional Knowledge. – 2017. – V. 16 (1). – P. 83-88.
5. Тарун, Е.И. Антиоксидантная активность гексагидрохинолонов / Е.И. Тарун, А.В. Данькова, А.Н. Пырко// Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2019. – № 2. – С.77-83.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛИСТЬЕВ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА (*ACHILLEA*) ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MILFOIL LEAVES EXTRACTS (*ACHILLEA*)

Е. И. Тарун¹, А. А. Небокаткина¹, В. П. Курченко²
E. Tarun¹, A. Nebokatkina¹, V. Kurchenko²

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д.Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь
ktarun@tut.by

¹Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Проведено сравнительное изучение антиоксидантной активности экстрактов 10 видов листьев тысячелистника. Получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации экстрактов листьев тысячелистника, из которых графически определены показатели IC_{50} . Экстракты листьев тысячелистника восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 71-85 % при концентрации образцов 0,1-1 %. Показатели IC_{50} находились в пределах $0,53-2,63 \cdot 10^{-2}$ %.

The comparative study of the antioxidant activity of extracts of 10 species of milfoil leaves was carried out. The dependences of the fluorescence intensity of fluorescein on the logarithm of the concentration of milfoil leaves extracts are obtained, from which IC_{50} values are graphically determined. Milfoil leaves extracts restored fluorescence of fluorescein to 71-85% at a sample concentration of 0,1-1%. IC_{50} values were in the range of $0,53 - 2,63 \cdot 10^{-2}$ %.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, экстракты листьев тысячелистника, флуоресцеин.

Keywords: antioxidant activity, extracts of milfoil leaves, fluorescein.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-177-180>

Тысячелистник давно используется как в народной, как и в современной официальной медицине странах постсоветского пространства и за рубежом. Это многолетнее травянистое растение с широким ареалом произрастания включено в фармакопеи десятка стран. В медицинских целях чаще всего используют листья и соцветия, экстракты, настои. Они характеризуются аллергическим, ранозаживляющим, противовоспалительным действием. В сочетании с другими травами тысячелистник применяют для лечения язвы желудка, гастрита, стоматита, язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, остановки кровотечения и заживления ран. Ранее проведенными исследованиями доказано, что различные виды тысячелистников обладают антиоксидантной и антипролиферативной активностью [1-4]. Фитохимические исследования показали, что многие виды рода *Achillea* содержат фенолпропаноиды, флавоноиды, флавонолы, флавоны и их производные, такие как хлорогеновая [1-3], протокатеховая [2], галловая [2], кофейная [1, 2, 4], ферулиновая [2, 4] кислоты, рутин [1-4], кверцетин [2, 4], лютеолин и лютеолин глюкозид [1, 3, 4], апигенин и апигенин глюкозид [1, 4]. Хроматографический анализ тысячелистника Биберштейна и благородного показал высокое содержание кверцетин глюкозида [4]. Сравнительный хроматографический анализ цветов и листьев *Achillea grandifolia* показал различное содержание в них фенолпропаноидов и флавоноидов [4]. Так, цветы содержат большее количество рутина, лютеолина и лютеолин глюкозида и не содержат кверцетина, кофейной и хлорогеновой кислот, которые обнаружены в листьях данного вида тысячелистника. Ведутся работы по расширению объектов фитохимического анализа тысячелистников для изучения состава различных вторичных метаболитов - сесквитерпеновых лактонов, флавоноидов, эфирных масел. Необходимо отметить, что в зависимости от региона произрастания, климатических условий состав вторичных метаболитов будет иметь внутривидовые различия.

Проведено сравнительное исследование антиоксидантной активности (далее – АОА) экстрактов 10 видов листьев тысячелистника. Метод определения АОА по отношению к активированным формам кислорода (далее – АФК) основан на измерении интенсивности флуоресценции окисляемого соединения и ее уменьшении под воздействием АФК. В настоящей работе для детектирования свободных радикалов использован флуоресцеин, обладающий высоким коэффициентом экстинкции и близким к 1 квантовым выходом флуоресценции. Генерирование свободных радикалов осуществляли, используя систему Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа (Fe^{2+}) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) и пероксида водорода [5]. При взаимодействии флуоресцеина со свободными радикалами происходит тушение его флуоресценции, восстановить которую можно при добавлении в систему веществ, проявляющих антиоксидантные свойства.

Приготовление водного экстракта из листьев различных видов тысячелистника:

Экстракты листьев готовили следующим образом: навески листьев тысячелистника измельчали в электрической кофемолке. Из измельченного стандартизированного по размерам частиц сырья (0,1 г) экстрагировали водой в течение одного часа на водяной бане, затем экстрагировали 48 ч при комнатной температуре. Соотношение сырье (г): экстрагент (мл) составило – 1:10. После экстракции сырье пропускали через бумажный фильтр.

Приготовление раствора экстракта из листьев различных видов тысячелистника:

Концентрацию исходного раствора экстракта принимали за 100 %. Делали ряд разведений исходного раствора экстракта, концентрации которых составляли 50 - 10⁻³ %. Концентрации растворов экстракта в пробе уменьшались в 10 раз и составляли 5 - 10⁻⁴ %.

Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм. Длина волны возбуждения – 490 нм.

Для всех образцов получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации экстрактов листьев тысячелистника. На рисунке 1 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации экстрактов листьев тысячелистника мелкоцветного (1), каратавского (2), азиатского (Казахстан) (3) и обыкновенного (4). Исследования проведены в широком диапазоне концентраций 10⁻⁴ - 5 %. Образцы экстрактов листьев тысячелистника начинали проявлять АОА при концентрации 10⁻⁴ %. При последующем увеличении концентрации экстрактов наблюдается увеличение подавления действия свободных радикалов и возрастание флуоресценции флуоресцеина до 71-82 % при концентрации образцов 0,1 %, что соответствует разведению исходного экстракта в 1000 раз (табл.). Дальнейшее повышение концентрации экстракта вызывает тушение флуоресценции флуоресцеина. При высоких концентрациях флавоноидов, фенолпропаноидов и других соединений, обладающих антиоксидантной активностью и содержащихся в экстракте, радикальные продукты их окисления могут взаимодействовать с флуоресцеином и снижать его флуоресценцию.

Одинаковая структура полученных зависимостей может свидетельствовать об аналогичном составе веществ, отвечающих за антиоксидантные свойства, отличающихся по количественному составу.

Тысячелистник таволговый восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина на максимальную величину – до 85%. Близкий к нему показатель A_{max} (82 %) имел тысячелистник мелкоцветный. Однако, максимальная активность образца тысячелистника таволгового достигается при концентрации в 10 раз выше (1 %), чем для образцов тысячелистника мелкоцветного (0,1 %). Показатель IC_{50} тысячелистника таволгового (0,83·10⁻² %) в 1,6 раз выше аналогичного показателя тысячелистника мелкоцветного и благородного. Таким образом, АОА тысячелистника таволгового ниже образца тысячелистника мелкоцветного.

Показатель IC_{50} образцов тысячелистника азиатского (Казахстан), Биберштейна, азиатского (Хакасия) и обыкновенного (1 – 1,2·10⁻² %) в 1,9 – 2,3 раза выше аналогичного показателя тысячелистника мелкоцветного и благородного, а их показатели A_{max} (71-74 %) на 11-14 % ниже аналогичного показателя тысячелистника таволгового, что свидетельствует о более низких антиоксидантных свойствах.

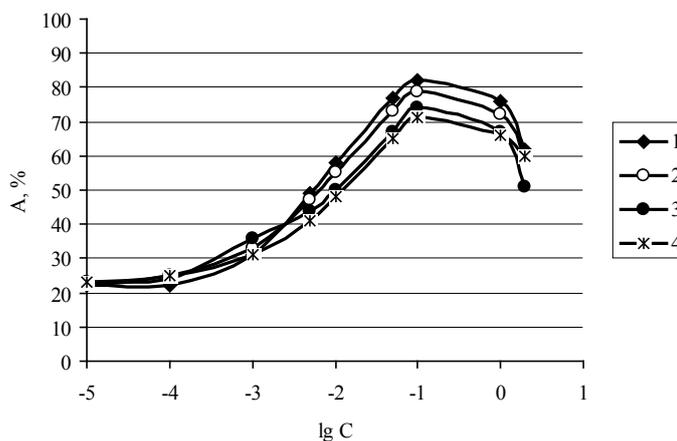


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) экстрактов листьев тысячелистника мелкоцветного (1), каратавского (2), азиатского (Казахстан) (3) и обыкновенного (4)

Графически определены показатели IC_{50} – концентрация экстрактов листьев тысячелистника, при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов (табл.). Образцы тысячелистника мелкоцветного и благородного имели минимальные значения показателя IC_{50} ($0,53 \cdot 10^{-2}$ %), что свидетельствует об их максимальной антиоксидантной активности. Близкие к ним показатели IC_{50} ($0,59 \cdot 10^{-2}$ %) получены для образцов тысячелистника каратавского и щетинистого. Для всех этих четырех образцов получены высокие показатели A_{max} (76-82 %).

Таблица – Показатели антиоксидантной активности соков экстракта листьев тысячелистника

№	Название образца	A_{max} , %	C_{max} , %	$IC_{50} \cdot 10^{-2}$, %
1	Т. мелкоцветный	82	0,1	0,53
2	Т. благородный	78	0,1	0,53
3	Т. каратавский	79	0,1	0,59
4	Т. щетинистый	76	0,1	0,59
5	Т. таволговый	85	1	0,83
6	Т. азиатский (Казахстан)	74	0,1	1
7	Т. Биберштейна	72	1	1
8	Т. азиатский (Хакасия)	71	1	1
9	Т. обыкновенный	71	0,1	1,2
10	Т. азиатский (Кемерово)	73	1	2,63

Максимальный показатель IC_{50} ($2,63 \cdot 10^{-2}$ %), полученный для образца тысячелистника азиатского (Кемерово), в 5 раз выше аналогичных показателей тысячелистника мелкоцветного и благородного и в 2,2 раза выше IC_{50} тысячелистника обыкновенного. Его показатель A_{max} (73 %) находится на уровне аналогичных показателей тысячелистника азиатского (Казахстан), Биберштейна, азиатского (Хакасия) и обыкновенного. Кроме того, максимальная активность образца тысячелистника азиатского (Кемерово) достигается при концентрации в 10 раз выше (1 %), чем для образцов тысячелистника мелкоцветного, благородного, каратавского, щетинистого и обыкновенного (0,1 %). Все это свидетельствует о самой низкой антиоксидантной активности данного образца.

Представляет интерес сравнение 3-х экстрактов листьев тысячелистника одного вида – азиатского, произрастающего в разных регионах: Казахстан, Хакасия и Кемерово. Показатели A_{max} тысячелистника азиатского (Казахстан) и азиатского (Кемерово) близки (74 и 73 % соответственно). Несколько ниже (71 %) значение этого показателя тысячелистника азиатского (Хакасия). Однако, максимальная активность образца тысячелистника азиатского (Казахстан) достигается при концентрации в 10 раз ниже (0,1 %), чем для образцов тысячелистника азиатского (Хакасия) и (Кемерово). Показатели IC_{50} образцов тысячелистника азиатского (Казахстан) и (Хакасия) совпадают ($1 \cdot 10^{-2}$ %), тогда как для тысячелистника азиатского (Кемерово) этот показатель в 2,63 раза выше. Таким образом, антиоксидантная активность экстрактов из листьев тысячелистника убывает в ряду: азиатский (Казахстан) > азиатский (Хакасия) > азиатский (Кемерово).

На рисунке 2 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации экстрактов листьев тысячелистника благородного (1) и щетинистого (2). Зависимости практически аналогичны, что может свидетельствовать об одинаковом качественном и количественном составе веществ, отвечающих за антиоксидантные свойства. Кроме того, характер этих зависимостей существенно отличается от представленных на рисунке 1, что свидетельствует о различном качественном составе антиоксидантных веществ данных двух образцов и образцов тысячелистника мелкоцветного, каратавского, азиатского (Казахстан) и обыкновенного.

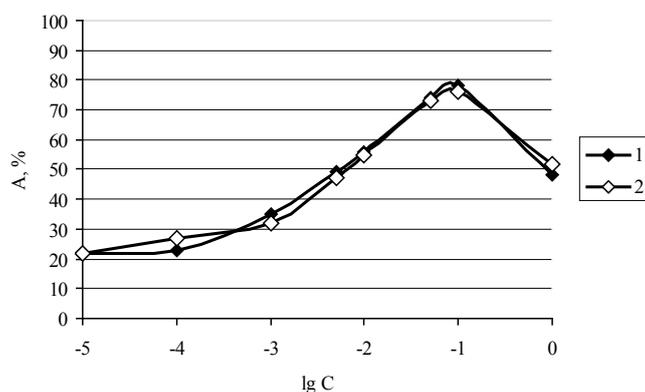


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) экстрактов листьев тысячелистника благородного (1) и щетинистого (2)

На рисунке 3 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации экстрактов листьев тысячелистника таволгового (1), азиатского (Кемерово) (2), Биберштейна (3) и азиатского (Хакасия) (4). Все образцы достигают максимальной активности при одинаковой концентрации 1 %, и их зависимости имеют одинаковую тенденцию. В большей степени это видно при сравнении образцов тысячелистника таволгового (1) и азиатского (Хакасия) (4).

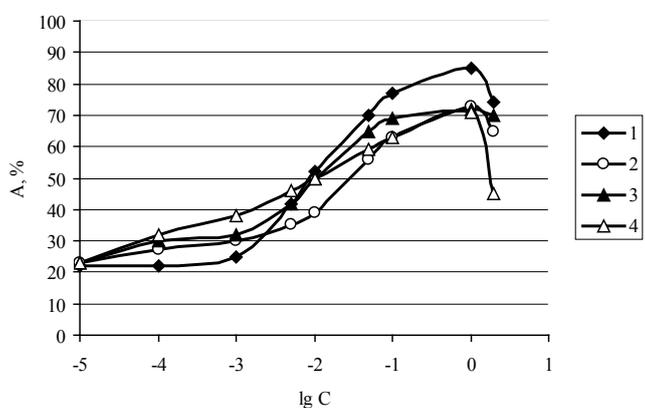


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) экстрактов листьев тысячелистника таволгового (1), азиатского (Кемерово) (2), Биберштейна (3) и азиатского (Хакасия) (4)

Полученные данные показывают, что каждый вид тысячелистника содержит в своем составе индивидуальный набор веществ, отвечающих за антиоксидантную активность. Место произрастания тысячелистника также влияет на качественный и количественный состав антиоксидантных веществ. Образцы листьев тысячелистника, имеющие предположительно близкий состав веществ, отвечающих за антиоксидантные свойства, можно объединить в три группы:

1. тысячелистник мелкоцветный, каратавский, азиатский (Казахстан) и обыкновенный;
2. тысячелистник благородный и щетинистый;
3. тысячелистник таволговый, азиатский (Хакасия), азиатский (Кемерово) и Биберштейна.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vitalini, S. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity/S. Vitalini [et al]//Acta Biochim, 2011. – V. 58. – P.203-209.
2. Serdar, G. Extraction of antioxidative principles of *Achillea biserrata* M. Bieb. And chromatographic analyses/G. Serdar [et al]// J. of Secondary Metabolite, 2015. – V.2.– P. 3-15.
3. Benetis, R. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* wild populations in Lithuania, R. Benetis, J. Radusiene, V. Janulis//Medicina (Kaunas), 2008. – V.44 (10). – P.775-781.
4. Taskin, D. Analysis of natural dyestuffs in *Achillea grandifolia* Friv. Using HPLC-DAD and Q-TOF LC/MS/D. Taskin, D.B. Alkaya, E. Dolen//Indian J. of Traditional Knowledge, 2017. – V. 16 (1). – P. 83-88.
5. Тарун, Е.И. Антиоксидантная активность гексагидрохинолонов / Е.И. Тарун, А.В.Данькова, А.Н. Пырко// Журнал Белорусского государственного университета. Экология, 2019. – № 2. – С. 77-83.