

ФИЗИОЛОГИЯ

DOI: 10.32743/UniChem.2022.95.5.13495

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ, АНТИОКСИДАНТНАЯ И АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА СЕМЯН *Silybum marianum* L. Gaertn**Турахожаев Муратбек Турахожаевич***PhD, главный технолог,
Общество с ограниченной ответственностью «BIOTON»,
Республика Узбекистан, г. Ташкент***Маматова Зулайхо Аминжановна***доцент, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных,
Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Республика Узбекистан, г. Ташкент***Гайибов Улугбек Гаппарджанович***PhD, ст. науч. сотр., лаборатория растительных цитопротекторов,
Институт биоорганической химии АН РУз.,
Республика Узбекистан, г. Ташкент***Гайибова Сабина Наримановна***PhD, ст. науч. сотр., лаборатория растительных цитопротекторов,
Институт биоорганической химии АН РУз.,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: gayibova.sabina@gmail.com***Абдуллаева Муясархон Олимжоновна***BSc, магистрант, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных,
Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
Республика Узбекистан, г. Ташкент***Арипов Тахир Фатихович***академик, зав. лаб. растительных цитопротекторов,
Институт биоорганической химии АН РУз.,
Республика Узбекистан, г. Ташкент*PHYTOCHEMICAL SCREENING, TOTAL ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF WATER-ETHANOL EXTRACT OF *Silybum marianum* L. Gaertn SEEDS**Muratbek Turakhodjaev***PhD, chief technical officer, Ltd. «BIOTON»,
Uzbekistan, Tashkent***Zulayho Mamatova***Assistant professor, faculty of biology, human and animal physiology department,
National university of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent***Ulugbek Gayibov***PhD, senior researcher,
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent*

Sabina GayibovaPhD, senior researcher,
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent**Muyassarkhon Abdullayeva**BSc, MSc student, faculty of biology, human and animal physiology department,
National university of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent**Takhir Aripov**Academician,
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

В данной работе проведены фитохимические исследования экстракта семян *Silybum marianum* L. Gaertn., произрастающего на территории Узбекистана. Экстракт получен 24 часовым экстрагированием в 65%-этанол. Было показано наличие флавоноидов ($3,24 \pm 0,03$ мг/100 мг сухого веса в пересчёте на рутин), полифенолов ($1,8 \pm 0,04$ мг/100 мг сухого веса в пересчёте на галловую кислоту), таннинов ($0,05 \pm 0,001$ мг/100 мг сухого веса в пересчёте на эпигаллокатехин). Результаты исследования показали, что экстракт семян *Silybum marianum* L. Gaertn. обладает значительной антиоксидантной и антирадикальной активностью.

ABSTRACT

In this work, phytochemical studies of the seed extract of *Silybum marianum* L. Gaertn., growing on the territory of Uzbekistan, were carried out. The extract was obtained by 24 hour extraction in 65% ethanol. The presence of flavonoids (3.24 ± 0.03 mg/100 mg dry weight in terms of rutin), polyphenols (1.8 ± 0.04 mg/100 mg dry weight in terms of gallic acid), tannins (0.05 ± 0.001 mg/100 mg dry weight in terms of epigallocatechin). The results of the study showed that the seed extract of *Silybum marianum* L. Gaertn. has significant antioxidant and antiradical activity.

Ключевые слова: расторопша пятнистая, окислительный стресс, свободные радикалы, вторичные метаболиты.
Keywords: milk thistle, oxidative stress, free radicals, secondary metabolites.

Антиоксидантный статус организма является одним из универсальных показателей, характеризующих состояние здоровья человека. Практически все патологические процессы в организме, в частности ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, патология клапанов сердца и другие сердечно-сосудистые заболевания, сопровождаются развитием окислительного стресса и образованием свободных радикалов [1]. Использование лекарственных растений в качестве антиоксидантов имеет преимущества перед синтетическими препаратами, так как их биологически активные вещества легко включаются в различные процессы жизнедеятельности, обладают хорошей биодоступностью, минимальными побочными эффектами и могут применяться длительно, что немаловажно при лечении хронических заболеваний [2]. Особое место занимают растительные препараты, обладающие гепатопротекторной активностью. В народной медицине экстракт семян *Silybum marianum* L. - расторопши пятнистой применяют в комплексной терапии людей с заболеваниями печени по разным причинам, в том числе при алкогольной зависимости, ожирении, раке печени, а также гепатите [3].

Исследования показали значительное улучшение функции печени у людей, применяющих препараты расторопши [4]. При этом уменьшаются очаги воспаления, и снижается поражение этого важного органа. Известно, что повышение уровня перекисного

окисления липидов играет значимую роль в патогенезе нарушений функции печени. Повышение уровня перекисного окисления липидов, а также содержание высокоактивных форм кислорода приводит к окислительному стрессу, при котором происходит нарушение функций клеточных мембран и патологическое изменение состояния клеток, в том числе гепатоцитов [5]. Однако уровень продуктов перекисного окисления зависит не только от уровня свободных радикалов, но и от функции антиоксидантной системы организма. В настоящее время широко изучается возможность лечения поражений печени антиоксидантными средствами, при этом особое внимание ученых привлекают фенольные соединения, широко представленные в растительных экстрактах [6].

Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение антиоксидантной активности водно-этанольного экстракта семян *Silybum marianum* L. Gaertn.

Материалы и методы

Высушенное и измельченное растительное сырье семян расторопши было предоставлено ООО «БИО-ТОН» (Ташкент, Узбекистан). Растения собраны в сентябре 2021 г. в горной местности (Сурхандарьинская область, Узбекистан). Высушенные образцы измельчали, экстракцию проводили в течение 24 ч 65%-ным этанолом. Затем растворитель выпаривали

на ротормном испарителе при +40°C и концентрировали в вакууме до тех пор, пока процентное содержание влаги не составляло менее 13%.

Предварительный фитохимический скрининг

Полученный экстракт *Silybum marianum* L. Gaertn. были протестированы на наличие флавоноидов, углеводов, сапонинов, фенолов, белков, терпеноидов, алкалоидов, стероидов, дубильных веществ и сердечных гликозидов. Результаты выражали в виде (+) при наличии и (-) при отсутствии соответствующих фитохимических соединений.

Тест на флавоноиды

Экстракт обрабатывали разбавленным NaOH с последующим добавлением разбавленной HCl. Жёлтый цвет раствора с NaOH становился бесцветным с добавлением HCl при наличии флавоноидов [7].

Тест на редуцирующие сахара

Реакция Бенедикта: 25 мг экстракта растворяли в 2 мл дистиллированной воды, смешивали с несколькими каплями реактива Бенедикта (щелочной раствор, содержащий комплекс цитрата меди) и кипятили на водяной бане [8].

Тест на сапонины (вспенивание/пенообразование)

0,5 мл фильтрата смешивали с 5 мл дистиллированной воды и хорошо встряхивали; образование обильной и устойчивой пены свидетельствовало о наличии сапонинов [9].

Тест на фенолы

Раствор экстракта смешивали с несколькими каплями 1% FeCl₃.

Тест на протеины (Биурет)

50 мг экстракта растворяли в 2 мл дистиллированной воды, смешивали с 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и несколькими каплями 0,7% раствора сульфата меди [9].

Тест на терпеноиды (Salkowski test)

5 мл раствора экстракта смешивали с 2 мл хлороформа и 3 мл концентрированной серной кислоты H₂SO₄ [10].

Тест на алкалоиды (Mayer's test)

Несколько капель реактива Мауег добавляли к раствору экстракта [11].

Тест на танины (Braemer's test)

10%-ный спиртовой раствор хлорида железа добавляли к раствору экстракта [9].

Тест на антрахиноны (Borntrager's test)

1 мл разбавленного (10 %) аммиака добавляли к раствору экстракта [7].

Тест на сердечные гликозиды (Keller-Kiliani test)

К раствору экстракта добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл раствора FeCl₃, нагревали, затем охлаждали и переносили в пробирку, содержащую 2 мл конц. H₂SO₄ [12].

Количественное содержание флавоноидов (КСФ)

КСФ определяли спектрофотометрически [15] с небольшими модификациями (спектрофотометр

Beckman DU 530 UV/Vis, США). К 0,1 мл разбавленного образца экстракта добавляли дистиллированную воду, чтобы довести объем до 5 мл, и к нему добавляли 0,3 мл 5% NaNO₃. Через 5 минут добавляли 3 мл 10% AlCl₃. Через 6 минут добавляли 2 мл 1М NaOH и измеряли оптическую плотность при 510 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали рутин. Данные были представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для трех повторных измерений.

Количественное содержание полифенолов (КСП)

КСП оценивали, как описано в [19]: 100 мг экстракта образца точно взвешивали и растворяли в 100 мл дистиллированной воды. 1,5 мл этого раствора переносили в пробирку, затем добавляли 1 мл 2Н раствора реактива Folin-Ciocalteu и 2 мл 20%-ного раствора Na₂CO₃ и доводили объем до 8 мл дистиллированной водой с последующим энергичным встряхиванием и наконец, давали отстояться в течение 2 часов, после чего измеряли оптическую плотность при 765 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали галловую кислоту. Данные были представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для трех повторных измерений.

Количественное содержание танинов (КСТ)

500 мг экстракта взвешивали в пластиковую бутылку вместимостью 50 мл, добавляли 50 мл дистиллированной воды и встряхивали в течение 1 ч на механическом шейкере. Затем фильтровали в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки. Затем 5 мл отфильтрованного экстракта вносили в пробирку и смешали с 2 мл 0,1М раствора FeCl₃ в 0,1Н HCl и 0,008 М ферроцианида калия. Поглощение измеряли при 120 нм в течение 10 мин [20]. Эпигаллокатехин использовали в качестве стандарта для построения калибровочной кривой. Данные были представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для трех повторных измерений.

Антирадикальная активность (ДФПГ)

Антирадикальную активность проводили, как описано в методике [16] стандартным методом измерения кинетики оптической плотности спиртового раствора свободного радикала ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил). Концентрация свободных радикалов составляла 0,1 мМ. Соотношение ДФПГ/экстракт составляло 1:10.

Общая антиоксидантная активность

Антиоксидантную активность экстракта оценивали фосфомолибденовым методом по методике Prieto et al. [17]. 0,1 мл раствора экстракта смешивали с 1 мл раствора реагента (0,6 М серной кислоты, 28 мМ фосфата натрия и 4 мМ молибдата аммония). Смесь инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 90 мин. После инкубации образцы охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность смеси при 765 нм относительно реагента. Процентное ингибирование рассчитывали по следующей формуле:

% ингибирования = $(1 - \text{адсорбция образца} / \text{адсорбция контроля}) \times 100$,

IC₅₀ рассчитывали с помощью программного обеспечения Graph prism pad.

Оценка антиоксидантной активности по методу FRAP

Различные концентрации экстракта (от 10 до 100 мкг/мл) в деионизированной воде смешивали с 2,5 мл (рН 6,6) фосфатного буфера и 2,5 мл (1%) феррицианида калия. Смесь инкубировали при 50°C на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения к смеси добавляли 2,5 мл (10%) трихлоруксусной кислоты, затем центрифугировали при 3000 об/мин

в течение 10 мин. Надосадочную жидкость смешивали с 2,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл свежеприготовленного (0,1%) раствора хлорида железа. Поглощение измеряли при 700 нм. Контрольный раствор готовили без добавления экстракта. Процентное ингибирование рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = (1 - \text{адсорбция образца} / \text{адсорбция контроля}) \times 100,$$

IC₅₀ рассчитывали с помощью программного обеспечения Graph prism pad.

Далее в **Таблице 1** представлен фитохимический анализ экстракта семян расторопши.

Таблица 1.

Фитохимический скрининг экстракта семян *Silybum marianum* L. Gaertn.
 Условные обозначения: (++++) - много, (++) - мало, (+) - следы, (-) - не наблюдается

№	Соединения	Водно-этаноловый экстракт семян <i>Silybum marianum</i> L.
1	Флавоноид	+++
2	Редуцирующие сахара	-
3	Сапонины	-
4	Фенолы	++
5	Протеины	-
6	Терпеноиды	-
7	Алкалоиды	-
8	Танины	+
9	Антрахиноны	-
10	Сердечные гликозиды	-
11	Стероиды	-

Антиоксидантная активность экстракта семян *Silybum marianum* L. Gaertn. представлена в **Таблице 2**.

Таблица 2.

Общая антиоксидантная способность водно-этанольного экстракта семян *Silybum marianum* L. Gaertn.
 Показатель эффективности экстракта представлен IC₅₀

Экстракт	ДФПГ, IC ₅₀ (мг/мл)	Фосфомолибденовый метод, IC ₅₀ (мг/мл)	FRAP, IC ₅₀ (мг/мл)
<i>Silybum marianum</i> L. Gaertn	0.15±0,001	2.8±0,04	4.54±0,04

Общее содержание флавоноидов в экстракте семян *Silybum marianum* L. Gaertn. количественно определяли посредством калибровки по рутину. Уравнение регрессии стандартной кривой рутин составил $y = 1,0933x$ при $R^2 = 0,9905$.

Общее содержание полифенолов в экстракте семян *Silybum marianum* L. Gaertn. количественно определяли с помощью калибровки по галловой кислоте. Уравнение регрессии стандартной кривой галловой кислоты составило $y = 30,086x + 0,3728$ при $R^2 = 0,9955$.

Общее содержание танинов в экстракте семян *Silybum marianum* L. Gaertn. количественно определяли посредством калибровки с эпигаллокатехином. Уравнение регрессии стандартной кривой эпигаллокатехина составило $y = 0,3629x + 0,2201$ при $R^2 = 0,9818$.

Общее содержание флавоноидов, полифенолов и танинов в экстракте семян *Silybum marianum* L. Gaertn. представлено в **Таблице 3**.

Таблица 3.

**Общее содержание флавоноидов, полифенолов и танинов в водно-этанольном экстракте
семян *Silybum marianum* L. Gaertn.**

Показатель эффективности экстракта представлен эквивалентом соответствующим соединением

Экстракт	КСФ (мг рутина экв/100 мг СМ)	КСП (мг галловой кислоты экв/100 мг СМ)	КСТ (мг эпигаллокатехина экв/100 мг СМ)
<i>Silybum marianum</i> L. Gaertn	3.24±0,03	1.8±0,04	0.005±0,01

Выводы: В настоящем исследовании экстракт семян *Silybum marianum* L. Gaertn. был экстрагирован с использованием 65%-ного раствора этанола, а затем протестированы в отношении общего содержания флавоноидов, полифенолов и танинов, антиоксидантной способности и фитохимических веществ. Предварительный качественный фитохимический анализ выявил наличие флавоноидов, фенолов и дубильных веществ. Сообщается, что эти вторичные метаболиты обладают многими биологическими и терапевтическими свойствами, поэтому ожидается, что эти соединения найдут широкое

применение в медицине. На основании результатов антиоксидантной и антирадикальной активности можно сделать вывод, что водно-этанольный экстракт семян *Silybum marianum* L. Gaertn. обладает потенциальной антиоксидантной активностью. Это может быть связано с наличием соответствующих вторичных метаболитов, таких как флавоноиды, танины, полифенолы и др. Таким образом, водно-этанольный экстракт семян *Silybum marianum* L. Gaertn. можно представлять интерес с точки зрения его терапевтических антиоксидантных свойств.

Список литературы:

1. Kurutas E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state // Nutrition journal. – 2016. – V.15(1). –P. 71. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>
2. Sofowora A., Ogunbodede E., Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention // African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM. – 2013. –V. 10(5). – P. 210–229. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>
3. Dhiman R.K., Chawla Y.K. Herbal medicines for liver diseases // Digestive Diseases and Sciences. –2005. – V. 50(10). –P. 1807–12. <https://doi: 10.1007/s10620-005-2942-9>
4. Gillesen A., Schmidt H.H. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review // Advances in therapy. – 2020. – V. 37(4). –P. 1279–1301. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01251-y>
5. Cichoż-Lach H., & Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases // World journal of gastroenterology. – 2014. – V. 20(25). –P. 8082–8091. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>
6. Lourenço S.C., Moldão-Martins M., & Alves V.D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications // Molecules (Basel, Switzerland). – 2019. – V. 24(22). –P. 4132. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
7. Onwukaeme D.N., Ikuegbvweha T.B., Asonye C.C. Evaluation of phytochemical constituents, antibacterial activities and effect of exudates of *Pycnanthus angolensis* Wedl Warb (Myristicaceae) on corneal ulcers in rabbits // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2007. – V.6. –P. 725–730.
8. Saingam W., Sakunpak A. Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography method for the determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in oromucosal spray from cannabis extract // Revista Brasileira de Farmacognosia. – 2018. – V. 28. – P. 28-37. 10.1016/j.bjp.2018.08.001.
9. Parekh J., Chanda S. In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants // Turkish Journal of Biology. – 2007.– V. 31. – P. 53-58.
10. Edeoga H., Okwu D.E., Oyedemi B. Phytochemical constituents of some Nigerian Medicinal Plants // African Journal of Biotechnology. – 2005. – V. 4. – P. 54-58. 10.5897/AJB2005.000-3127.
11. Alfalluos K., Alnade H., Kollab W., Alafid F., Edrah S. Qualitative and Quantitative phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of “Retama” Extract Grown in Zliten Libya // International Journal Of Medical Science And Clinical Invention. – 2017. – V.4. 10.18535/ijmsci/v4i4.11.
12. Munazir M., Qureshi R., Munir M. Preliminary phytochemical screening of roots and aerial parts of *Leptadenia pyrotechnica* // Pakistan Journal of Botany. – 2015. – V. 47. – P. 659-664.
13. Ukoah P., Cemaluk A., Egbuonu C., Nnamdi O., Ejikeme P. Tannins and other phytochemical of the *Samanea saman* pods and their antimicrobial activities // African Journal of Pure and Applied Chemistry. – 2011. – V. 5. – P. 237-244.

14. Shruti S., Archana M., Vivek K. Phytochemical Screening and Anthelmintic and Antifungal Activities of Leaf Extracts of *Stevia rebaudiana* // *Journal of Biologically Active Products from Nature*. – 2013. – V. 3(1). – P. 56-63. DOI: 10.1080/22311866.2013.782695
15. Tabasum S., Khare S., Jain K. Spectrophotometric quantification of total phenolic, flavonoid, and alkaloid contents of *abrus precatorius* L. Seeds // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2016. – V. 9. – P. 371-374.
16. Gayibova S., Ivanišová E., Árvay J., Hřstková M., Slávik M., Petrová J., Hleba L., Tóth T., Kacaniova M., Aripov T. In Vitro Screening of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Medicinal Plants Growing in Slovakia // *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. – 2019. – V. 8. – P. 1281-1289. 10.15414/jmbfs.2019.8.6.1281-1289.
17. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – V. 269(2). – P.337-41.
18. Bhalodia N.R., Nariya P.B., Acharya R.N., & Shukla V.J. In vitro antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of *Cassia fistula* Linn // *Ayu*. – 2013. – V. 34(2). – P. 209–214. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.119684>.
19. Hagerman A., Harvey-Muller I., Makkar H. Quantification of tannins in tree foliage. A laboratory manual // *FAO/IAEA*. – 2000. – P. 537.
20. Van-Burden T.P., Robinson W.C. Formation of complexes between protein and Tannic acid // *Journal of Agricultural Food Chemistry*. – 1981. – V. 1. – P. 77.