

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ЛИСТЬЕВ *Isatis tinctoria* L.****Мустафакулов Мухаммаджон Абдувалиевич**

канд. биол. наук,
ст. науч. сотр. лаборатории метаболомики
Института биофизики и биохимии,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: mmustafakulov@bk.ru

Набиев Абдусамат Хамидович

канд. тех. наук, ст. науч. сотр.
Института биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова
Академии наук Узбекистана,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Абдулладжанова Нодира Гуламжанова

д-р хим. наук, ведущий науч. сотр. экспериментально-технологической лаборатории
Института Биоорганической химии имени А.С. Садыкова АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Матчанов Алимжан Давлатбаевич

д-р хим. наук, проф., зав. экспериментально-технологической лаборатории
Института Биоорганической химии имени А. Садыкова АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Ситора Тухтаева Акмаловна

магистр,
Национальный университет Узбекистана,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: sitora.biochemistry@mail.ru

**STUDY OF ANTIOXIDANT AND ANTI-RADICAL ACTIVITY
OF LEAVES *Isatis tinctoria* L.****Mukhammadjon Mustafakulov**

PhD; Senior Researcher Laboratory of Metabolomics,
Institute of Biophysics and Biochemistry in Laboratory of Metabolomics,
Institute of Biophysics and Biochemistry,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Abdusamat Nabiev

PhD; Senior Researcher at the Experimental Technological Laboratory
of the Institute of Bioorganic Chemistry named after A. Sadykov
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Nodira Abdulladjanova

Dr. Chemistry. Sci., Leading Researcher at the Experimental Technological Laboratory
of the Institute of Bioorganic Chemistry named after A. Sadykov
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Alimjon Matchonov

Dr. of Chemical Sciences, head of the Experimental and Technological Laboratory
of the Institute of Bioorganic Chemistry named after A. Sadykov
of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Sitora Tukhtaeva

Master's degree
in National University of Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

Изучена антиоксидантная и антирадикальная активность растения вайды красильной - *Isatis tinctoria L.* семейство *Brassicaceae*. Анализ экспериментальных результатов, полученных при исследовании экстрактов, показал, что они имеют высокую антирадикальную активность по отношению ДФПГ. Наибольшая антирадикальная активность обнаружена у водного экстракта *Isatis tinctoria L.* Время t_{50} , необходимое для снижения концентрации ДФПГ до 50 % (IC_{50} 10,2±0,5 мкл) равно 73±3,2 сек. Антиоксидантная активность препаратов определялась ингибированием реакции аутоокисления адреналина *in vitro* и угнетением образования свободной формы кислорода. Активность полифенолов сравнивали со стандартными антиоксидантами кверцетином и гликлазидом. Эксперименты показали, что полученные препараты обладают антиоксидантными свойствами.

ABSTRACT

The antioxidant and antiradical activity of the woad plant, *Isatis tinctoria L.* fam. *Brassicaceae*. An analysis of the experimental results obtained in the study of extracts showed that they have a high antiradical activity against DPPH. The highest antiradical activity was found in the aqueous extract of *Isatis tinctoria L.* The time t_{50} required to reduce the concentration of DPPH to 50% (IC_{50} 10.2±0.5 μ l) is 73±3.2 sec. The antioxidant activity of the preparations was determined by the inhibition of the adrenaline autoxidation reaction *in vitro* and the inhibition of the formation of the free form of oxygen. The activity of polyphenols was compared with the standard antioxidants quercetin and gliclazide. Experiments have shown that the preparations obtained have antioxidant properties.

Ключевые слова: вайда красильная, антиоксидантная активность, антирадикальная активность, полифенолы, флавоноиды.

Keywords: dyeing woad, antioxidant activity, antiradical activity, polyphenols, flavonoids.

Введение

Вайда красильная *Isatis tinctoria L.* в Узбекистане культивируется в основном местным населением для получения краски для бровей и ресниц. В старину вайда культивировалась для получения синей краски – индиго [1]. В народной и традиционной медицине использовали при заболеваниях селезенки, инфекционных болезнях, как слабительное и рвотное при отравлениях и др [2].

Целью работы является изучение антиоксидантной и антирадикальной активности экстракта из листьев *Isatis tinctoria L.*

Для исследования антиоксидантной активности вайды красильной из растения выделили полифенолы по традиционной методике [4,5], путем экстракции в хлороформе высушенного и измельченного растения. После полного удаления липофильных веществ (хлорофилл, красящие вещества и др.), сырьё высушивали и заново экстрагировали 70% ном ацетоне несколько раз. Затем водно-ацетоновый экстракт сгущали под вакуумом и получали водный остаток. Водную часть обрабатывали этилацетатом несколько раз и извлекали этилацетатную фракцию. Этилацетатный экстракт концентрировали на роторном испарителе и получали этилацетатный концентрат. В этилацетатный концентрат добавили чистый гексан.

При этом выпадает осадок- сумма полифенолов, который отфильтровывают и высушивают под вакуумом.

Антиоксидантную активность полученной суммы полифенолов вайды красильной оценивали несколькими методами [1]. Антиоксидантную активность препарата определяли ингибированием реакции аутоокисления адреналина *in vitro* и препятствующего образованию свободной формы кислорода. Метод основан на ингибировании реакции аутоокисления адреналина, выраженном в процентах (%), за счет образования и аутоокисления адреналина во времени в условиях *in vitro* лекарственных препаратов.

Для этого добавляют 2,0 мл 0,2 М карбонатно-натриевого (Na_2CO_3 - $NaHCO_3$) буфера с pH=10,65, 56 мкл 0,18% раствора адреналина (эпинефрина) гидрохлорида, 30 мкл антиоксиданта и перемешивают в течение 30 секунд. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies в 10-мм кювете при длине волны 347 нм в течение 10 мин. Исследуемое количество (концентрация экстракта в 1 мг/мл) принимают за эталон. 0,2 М 2,0 мл буфера, 0,18% 56 мкл (5,46 мМ) адреналина используют в качестве контрольного образца.

Антиоксидантную активность выражают в процентах от ингибирования аутоокисления адреналина и рассчитывают по следующей формуле:

$$AA\% = \frac{D_1 - D_2 \times 100}{D_1}$$

где D_1 - оптическая плотность раствора адреналина гидрохлорида, добавленного к буферу;

D_2 - оптическая плотность исследуемого экстракта и адреналина гидрохлорида, добавленного к буферу [3].

Для исследования полифенолы вайды растворяют в 30% этаноле и для *in vitro*, исследований берут в следующих концентрациях: 100/250/500/750/1000 мкг/мл. Антиоксидантную активность оценивают с помощью фитохимических исследований исследуемых препаратов (табл. 1).

Таблица 1.

Антиоксидантная активность полифенолов растения *Isatis tinctoria L.*

№	Исследуемые концентрации полифенолов, мкг/мл	Контроль	Опыт	Ингибирование реакции аутоокисления адреналина, %
1	100 (10%)	0.2214	0.1768	6.02
2	250 (25%)	0.2452	0.1890	11.15
3	500 (50%)	0.2026	0.1577	14.68
4	750 (75%)	0.2123	0.1758	16.95
5	1000 (100%)	0.2804	0.2111	18.24
	Гликлазид			10,0%
	Кверцетин			37,4%

Антиоксидантная активность препаратов определяли ингибированием реакции аутоокисления адреналина *in vitro* и угнетением образования свободной формы кислорода. Полифенолы вайды сравнивали со стандартными антиоксидантами кверцетином и гликлазидными антиоксидантами. Полученный препарат обладает антиоксидантными свойствами.

Определение антирадикальной активности

В качестве природных антиоксидантов используются специи, различные масла, чаи, семена, зерна, какаоелла, фрукты и овощи. Антиоксиданты природных соединений, содержащие высоко индивидуальные соединения, такие как аскорбиновая кислота, токоферолы, каротиноиды, а также флавоноиды (кверцетин, кемпферол, миритинин), катехины (карнозол, розманол, розамиридифенол) или различные индивидуальные антиоксиданты, такие как полифенолы и фенольные кислоты. В частности, препараты, выделенные из растения молочай, тмина, базилика и перца в подсолнечном масле, оказались сильнее синтетического антиоксиданта - бутилокси-толуола и почти в два раза эффективнее растения японского шафрана. Следовательно, в этом исследовании 1 растительный экстракт (30% этанол) обладал антирадикальной активностью (АРА) относительно стабильного свободного радикала ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил).

Метод ДФПГ. В этом исследовании мы использовали спектрофотометрический метод для измерения кинетики восстановления молекул стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразола (ДФПГ) антиоксидантами для оценки АРА. Метод основан на взаимодействии антиоксидантов со стабильным хромогенным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразином (ДФПГ). Стандартный раствор ДФПГ

(5×10^{-4} М) в этаноле, подкисленном уксусной кислотой, разбавляли этанолом в соотношении 1:10 до получения рабочего раствора. Полученный раствор должен иметь оптическую плотность не более 0,9 при 517 нм. К 5 мл рабочего раствора ДФПГ добавляли 50 мкл экстрактов изучаемых растений, перемешивали и регистрировали кинетику снижения оптической плотности раствора при длине волны 517 нм в течение 30 мин. В качестве контрольного образца использовали рабочий раствор ДФПГ.

Антирадикальную активность определяют по следующей формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{A_{\text{контр}} - A_x A_{\text{контр}}}{A_{\text{контр}}} \times 100\%$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора, $A_{\text{контр}}$ – оптическая плотность испытуемого образца.

Антиоксиданты могут иметь разные механизмы действия, их активность рекомендуется изучать разными методами. В этом исследовании экстракты АРА оценивали по отношению к свободно-радикальному ДФПГ. Когда соединения, полученные из тестируемых растений, добавляют к водному раствору ДФПГ, молекулы свободных радикалов превращаются в нерадикальную форму, при этом интенсивно-фиолетовый раствор ДФПГ обесцвечивается, что указывает на кинетику изменения оптической плотности раствора ДФПГ при добавлении исследуемых образцов.

Для сравнения АРА тестируемых образцов для каждого экстракта была выбрана концентрация 50 мкл предоставленного раствора. Поскольку образцы 1 и 2 показали очень высокий АРА, мы разбавили их 1:100 соответствующим растворителем (ДМСО).

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что при добавлении экстрактов из исследуемых растительных побегов 1 и 2 к водному раствору ДФПГ наблюдается резкое снижение оптической плотности раствора ДФПГ, о чем свидетельствует их высокая ОПЧ. Для образцов 1 и 2 ОПЧ оценивали после разбавления в 100 раз, что свидетельствовало о явной антирадикальной способности растительных экстрактов.

Кривая основана на нелинейной регрессии. Концентрация ДФПГ составляет 0,1 мМ. Измерения проводили при 20°C сразу после добавления испытуемых экстрактов. Концентрация исследуемых экстрактов составляет 50 мкл данного раствора. Образцы 1 и 2 разбавляли в 100 раз соответствующими растворителями (водой) (таблица 2).

Таблица 2.

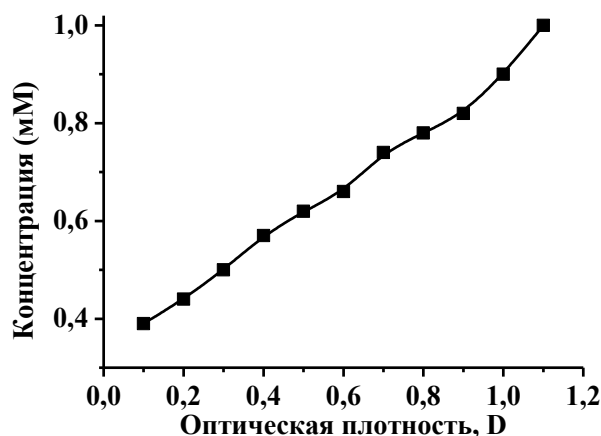
Оптическая плотность ДФПГ под действием растительного экстракта

Оптическая плотность ДФПГ, D	Время, мин	Концентрация экстракта
0.1	25	0.39
0.2		0.44
0.3	20	0.50
0.4		0.57
0.5	15	0.62
0.6		0.66
0.7	10	0.74
0.8		0.78
0.9	5	0.82
1.0		0.90
1.1	0	1

Из графика видно, что изменение оптической плотности водного раствора ДФПГ относительно контроля при добавлении растительных экстрактов тестируют во времени.

Экспериментальные данные показывают, что экстракты 1 и 2 обладают наибольшей способностью выводить из организма свободные радикалы. Для

количественной оценки антирадикальной активности использовали стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразин (ДФПГ), а также t_{50} , обладающий 50% ингибирующей активностью от времени, необходимого для снижения исходной концентрации радикала для препаратов в стадии изучения.

Рисунок 1. Изменение оптической плотности ДФПГ при добавлении водного экстракта *Isatis tinctoria L*

В реакции ДФПГ с экстрактами при 20°C для t_{50} пробы № 1 - $10,2 \pm 0,5$ с, пробы № 2 - $40,1 \pm 1,8$ с (разбавленной в 100 раз), (табл. 3).

Таблица 3.

Время и концентрация ингибирования ДФПГ под действием экстрактов

№ экстракта	IC ₅₀ , мкл	t ₅₀ , сек, 50 мкл вещество
№1	10,2±0,5	73±3,2
№2 (разбавленный)	40,1±1,8	55±2,1

Время, необходимое для снижения концентрации ДФПГ до 50 % (t_{50}) при взаимодействии с 50 % (IC_{50}) значениями ингибирующей концентрации и тестируемыми экстрактами.

Анализ экспериментальных результатов, полученных при исследовании экстрактов, показал, что образец №1 имел самую высокую антирадикальную активность по отношению ДФПГ.

Наибольшая антирадикальная активность обнаружена у водного экстракта Вайды красильной

(*Isatis tinctoria L.*). В литературе имеется достаточно сведений об антирадикальной активности экстрактов лекарственных растений, максимальное действие которых обнаруживается у экстрактов, содержащих наибольшее количество полифенолов и флавоноидов. Таким образом, изучение механизма антирадикального и антиоксидантного действия требует детального качественного и количественного изучения химической структуры биологически активных веществ экстракта- *Isatis tinctoria L.*

Список литературы:

1. Е.И. Рябинина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова, Н.И. Пономарева, Т.Н. Илюшина. / Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина. Химия растительного сырья. 2011. №3. с. 117–121.
2. Флора Узбекистана. Т. Уз. АН. 1956. Т.3.- с.107-108.
3. Губанов И.А. *Isatis tinctoria L.*- вайда красильная: - М.: Т-во науч. изд. КМК, ин-т технолог. иссл. 2003.- Т.2. с. 300.
4. Холматов Х., Ахмедов О. Фармакогнозия Абу Али ибн Сино, Тошкент. 1994. 107 б.
5. Холматов Х.Х., Ахмедов У.А., Фармакогнозия, Ташкент, Ибн Сино, Тошкент. 1995. 120 б.
6. Тринеева О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017, с. 180-197.
7. Мельничук В.А. Экспресс-метод определения антирадикальной активности лекарственных веществ. \\ Хим. фарм. журн. 1985. V.5. с.565-567.
8. Seyoum A, Asres K, El-Fiky F.K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 2006. V.67. p. 2058-2070.