

Статья поступила в редакцию 22.03.2017 г.

Мальцева Е.М., Егорова Н.О., Егорова И.Н., Мухамадияров Р.А.
 Кемеровский государственный медицинский университет,
 Экспертно-криминалистический центр ГУ МВД России по Кемеровской области,
 Институт экологии человека ФИЦ УХ СО РАН,
 НИИ «Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
 г. Кемерово

АНТИОКСИДАНТНАЯ И АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ IN VITRO ЭКСТРАКТОВ ТРАВЫ SANGUISORBA OFFICINALIS L., СОБРАННОЙ В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ РАЗВИТИЯ

Предмет исследования. 70 % водно-этанольные экстракты травы *Sanguisorba officinalis* L.

Цель исследования – сравнительное исследование антиоксидантной и антирадикальной активности 70 % водно-этанольных экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития – начало вегетации, бутонизация, цветение и плодоношение в экспериментах *in vitro*.

Методы исследования. Антиоксидантную активность оценивали по ингибированию реакции перекисного окисления липидов и аутоокисления адреналина, антирадикальную активность определяли по способности экстрактов ингибировать DPPH- и ABTS-радикалы, а также по связыванию молекул оксида азота, ингибированию супероксида, гидроксильного радикала и железохелатирующей активности.

Основные результаты. Установлено, что экстракты из сырья, собранного в фазу бутонизации и цветения, характеризуются максимальной антиоксидантной и антирадикальной активностью, что может быть связано с повышенным содержанием полифенольных соединений и, в частности, флавоноидов, в эти периоды.

Область их применения. Полученные результаты могут быть использованы для создания новых лекарственных средств из лекарственного растительного сырья, обладающих антиоксидантным действием.

Выводы. Результаты данных исследований позволяют рассматривать траву кровохлебки лекарственной, собранной в фазы бутонизации и цветения, в качестве перспективного антиоксидантного лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: *Sanguisorba officinalis* L.; экстракт; антиоксидантная активность; антирадикальная активность; полифенольные соединения; флавоноиды.

Malceva E.M., Egorova N.O., Egorova I.N., Mukhamadiyarov R.A.

Kemerovo State Medical University,

Kemerovo State Expert forensic center, MIA,

Institute of Human Ecology Federal State Budget Scientific Institution «The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences»,

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases SB RAMS, Kemerovo

ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL ACTIVITY IN VITRO OF HERB EXTRACTS OF SANGUISORBA OFFICINALIS L., GATHERED IN VARIOUS DEVELOPMENT STAGES

The subject of the investigation. 70 % water-ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. herb.

The purpose of the investigation – a comparative research of antioxidant and antiradical activity of 70 % water-ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. herb, gathered during various development stages – beginning of growing, budding, blooming and fruit-bearing, was performed using *in vitro* methods.

Methods of investigation. Antioxidant activity was evaluated by inhibiting lipid peroxidation reaction and adrenalin autoxidation. Antiradical activity of the extracts was determined by the ability to inactivate DPPH-, ABTS-radicals and by their ability to bind nitrogen oxide molecules, inhibiting of superoxide, hydroxyl radical and ions Fe^{+2} chelate activity.

Main results. It was determined that herb extracts, gathered during budding and blooming stages, had higher antioxidant and antiradical activity which is explained by high content of polyphenolic compounds, in particular flavonoids in these periods.

Scope. The results can be used for creation of new medicinal products from medicinal plants possess antioxidant action.

Conclusions. The results of these tests allow to consider *Sanguisorba officinalis* L. herb, gathered during budding and blooming stages, as perspective antioxidant medicinal herb.

Key words: *Sanguisorba officinalis* L.; extract; antioxidant activity; antiradical activity; polyphenolic compounds; flavonoids.

Антиоксидантный статус организма – один 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 оксидативного стресса и образованием свободных радикалов [1]. Активные формы кислорода (АФК) индуцируют в клетках разнообразные свободнорадикальные окислительные реакции, мишенью которых являются липиды клеточных мембран, нуклеиновые кислоты, протеины, ферменты, молекулы ДНК, вследствие чего может развиваться широкий спектр патогенети-

Корреспонденцию адресовать:

МАЛЬЦЕВА Елена Михайловна,
 650001, г. Кемерово, ул. Севастопольская, д. 4, кв. 47.
 Тел.: 8 (3842) 35-89-15; +7-904-570-49-90.
 E-mail: elen-malceva@yandex.ru

ческих эффектов. Наибольшее биологическое значение имеют следующие АФК: синглетный кислород, супероксид анион-радикал (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (ОН), пероксильный радикал ($R-OO^\bullet$), оксид азота (NO), пероксинитрит ($ONOO^\bullet$) [2].

В норме свободнорадикальное окисление в организме контролируется активностью собственных антиоксидантных систем, представленных ферментами (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатионредуктаза) и низкомолекулярными липофильными и водорастворимыми соединениями (витамины E, A и C, убихинон, таурин и др.). Однако несбалансированность между прооксидантными и антиоксидантными системами, вызванная факторами окружающей среды и патологическими процессами, приводит к оксидативному стрессу, являющемуся причиной и важной составляющей различных заболеваний, в частности онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, а также к развитию сахарного диабета и болезни Альцгеймера. Поэтому фармакологическая поддержка собственных антиоксидантных систем организма при этих заболеваниях способна оказывать заметное терапевтическое воздействие.

В этом отношении большие перспективы представляют препараты на основе лекарственного растительного сырья, содержащие комплекс веществ, обладающих антиоксидантным эффектом. Согласно литературным данным [3], среди природных антиоксидантов, сочетающих низкую токсичность со способностью эффективно ингибировать процессы свободнорадикального окисления в живых организмах, ведущую роль играют фенольные соединения.

В этой связи наше внимание привлекла кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis* L.), антиоксидантная активность извлечений из подземных органов которой хорошо известна (Грек, 1986; Хозяинова 1989). Однако полученные из них препараты обладают высокой гепатотоксичностью, связанной со значительным (до 40 %) содержанием дубильных веществ, что ограничивает их применение в антиоксидантной терапии. Известно, что трава кровохлебки содержит широкий спектр биологически активных веществ, способных проявлять антиоксидантную активность. К ним относятся дубильные вещества гидролизуемого и конденсированного типа (до 7 %), флавоноиды группы флавонолов, катехины, антоцианы, органические кислоты, аскорбиновая кислота, фенолкарбоновые кислоты [4, 5].

Так как свободно радикальное окисление представляет собой цепь разветвленных реакций, иници-

рованных различными видами АФК, в процессе которых образуются различные продукты деградации молекул, обладающих собственной активностью, не существует универсального метода оценки антиоксидантной активности (АОА) биологически активных веществ. Результаты же, полученные с помощью только одного теста, с большой осторожностью можно интерпретировать по отношению к биологическим объектам. Поэтому в настоящее время оценку АОА in vitro выполняют с использованием нескольких тест-систем.

В связи с тем, что в ходе вегетации у растения изменяется количественное содержание БАВ фенольного характера [4, 5], представляет интерес проведение комплексной оценки антиоксидантной и антирадикальной активности водно-спиртовых экстрактов кровохлебки лекарственной в разные фазы развития, и сопоставление полученных результатов с общим содержанием полифенольного комплекса и концентрацией отдельных его компонентов в изучаемых экстрактах.

Цель работы — провести сравнительную оценку содержания фенольных соединений, а также антиоксидантной и антирадикальной активности 70 % водно-спиртового экстракта травы кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L.), собранной в разные фазы развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали собранную в весенне-осенний период 2014-2015 гг. на территории Топкинского района, в окрестностях села Старые Топки Кемеровской области надземную часть *Sanguisorba officinalis* L. Сырье собирали в разные фазы развития — начало вегетации, бутонизации, цветения и плодоношения. Собранное сырье высушивали и измельчали до размера частиц 2 мм, экстрагировали 70 % этиловым спиртом в соотношении сырье — экстрагент 1 : 10 методом мацерации в течение 10 дней при комнатной температуре. Полученный экстракт фильтровали в мерную колбу на 100 мл и доводили объем раствора до метки 70 % этанолом.

Все реактивы, используемые в настоящем исследовании, имели квалификацию «хч» и «чда».

Спектрофотометрическое определение полифенольных соединений. Для определения суммарного содержания фенольных соединений использован спектрофотометрический метод с реактивом Folin-Ciocalteu. Метод основан на восстановлении смеси фосфорновольфрамовой и фосфомолибденовой

Сведения об авторах:

МАЛЫЦЕВА Елена Михайловна, доцент, канд. фарм. наук, кафедра фармацевтической химии, ФГБОУ ВО КеМГМУ Минздрава России, г. Кемерово, Россия. E-mail: elen-malceva@yandex.ru

ЕГОРОВА Наталья Олеговна, старший эксперт отдела экспертиз материалов, веществ и изделий, ЭКЦ ГУ МВД России по Кемеровской области, г. Кемерово, Россия. E-mail: lermoni@mail.ru

ЕГОРОВА Ирина Николаевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория экологического биомониторинга, Институт экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, г. Кемерово, Россия. E-mail: irinaegorovakem@mail.ru

МУХАМАДИЯРОВ Ринат Авхадиевич, доцент, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория новых биоматериалов, ФГБНУ НИИ КПССЗ СО РАМН, г. Кемерово, Россия. E-mail: rem57@rambler.ru

кислот в щелочной среде и является основным методом для определения общего фенольного индекса в лекарственном растительном сырье и пищевых продуктах [6]. Количественное определение суммы полифенольных соединений проведено в пересчете на галловую кислоту.

В мерную колбу на 50 мл помещали 0,5 мл полученных экстрактов и доводили объем раствора до метки экстрагентом. В мерную колбу на 25 мл помещали 2 мл полученного раствора, добавляли 1 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива, 10 мл воды и доводили объем раствора до метки 10,6 % раствором натрия карбоната. Через 30 минут измеряли оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 760 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора галловой кислоты. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 0,05 г галловой кислоты («Sigma»), растворяли в воде и доводили объем раствора до метки. В мерную колбу на 100 мл помещали 5 мл полученного раствора и доводили объем до метки (стандартный раствор).

Содержание суммы полифенольных соединений (X, мг/мл) в экстрактах определяли по формуле:

$$X_{\text{мг/мл}} = \frac{A_x \times m_{\text{ст}} \times 2500}{A_{\text{ст}} \times V_x},$$

где A_x — оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартного раствора галловой кислоты; $m_{\text{ст}}$ — масса навески галловой кислоты (г), V_x — объем исследуемого экстракта (мл).

Флавоноиды [5]. В мерную колбу на 100 мл помещали 2 мл изучаемых экстрактов и доводили объем раствора до метки 70 % этанолом. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2 мл полученного раствора, добавляли 2 мл 1 % раствора алюминия хлорида в 95 % спирте этиловом, 0,5 мл 33 % раствора уксусной кислоты и доводили объем раствора 95 % спиртом этиловым до метки. Для приготовления раствора сравнения в другую колбу вместимостью 25 мл помещали 2 мл исследуемого раствора, 0,5 мл 33 % раствора уксусной кислоты и доводили до метки 95 % спиртом этиловым. Измерение оптической плотности проводили через 20 минут при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора рутина. Для этого 2 мл 0,02 % стандартного раствора помещали в мерную колбу 25 мл, прибавляли 2 мл 1 % раствора алюминия хлорида,

0,5 мл 33 % раствора уксусной кислоты и доводили до метки 95 % спиртом этиловым. Раствор сравнения — 95 % спирт этиловый.

Суммарное содержание флавоноидов (X, мг/мл) в исследуемых экстрактах в пересчете на рутин вычисляли по формуле:

$$X_{\text{мг/мл}} = \frac{A_x \times C_{\text{ст}} \times 5000}{A_{\text{ст}} \times V_x},$$

где A_x — оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартного раствора рутина; $C_{\text{ст}}$ — концентрация стандартного раствора рутина (%), V_x — объем исследуемого экстракта (мл).

Проантоцианидины (ПАЦ) [4]. К 5 мл исходных экстрактов добавляли 15 мл концентрированной кислоты хлористоводородной и 10 мл воды, колбу соединяли с обратным холодильником и кипятили на водяной бане в течение 80 минут. Содержимое колбы охлаждали, фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем колбы до метки 70 % этиловым спиртом.

50 мл полученного гидролизата упаривали до объема около 5 мл и помещали в делительную воронку, добавляли 15 мл воды и экстрагировали н-бутанолом (3 раза × 15 мл). Бутанольные извлечения объединяли в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводили объем колбы до метки н-бутанолом. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 545 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание проантоцианидинов (X, мг/мл) в исследуемых экстрактах в пересчете на цианидин хлорид рассчитывали по формуле:

$$X_{\text{мг/мл}} = \frac{A \times 50000}{75 \times V_x},$$

где A — оптическая плотность исследуемого раствора; 75 — удельный показатель поглощения цианидина хлорида при длине волны 545 нм; V_x — объем исследуемого раствора (мл).

Определение антиоксидантной активности in vitro в экстрактах было проведено различными методами.

Спектрофотометрический метод определения суммарной антиоксидантной активности на модели Fe^{+2} -индуцированного перекисного окисления арахидоновой кислоты [7]. В 1 мл 96 % этанола растворяли 10 мкл арахидоновой кислоты, и 400 мкл этого раствора по каплям приливали к 100 мл дистиллированной воды. В центрифужные пробирки помещали по 1,0 мл полученного раствора и добавля-

Information about authors:

MALCEVA Elena Michailovna, candidate of pharmaceutical sciences, docent, department of pharmaceutical chemistry, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia. E-mail: elen-malceva@yandex.ru

EGOROVA Natalya Olegovna, senior expert, Kemerovo State Expert forensic center, MIA, Kemerovo, Russia. E-mail: lermoni@mail.ru

EGOROVA Irina Nikolaevna, candidate of biological sciences, senior researcher, laboratory for ecological biomonitoring, Institute of Human Ecology Federal State Budget Scientific Institution «The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Kemerovo, Russia. E-mail: irinaegorovakem@mail.ru

MUKHAMADIYAROV Rinat Avchadievic, candidate of biological sciences, docent, senior researcher, laboratory for novel biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia. E-mail: rem57@rambler.ru

ли для активации перекисного окисления 50 мкл раствора железа сульфата (II), 50 мкл исследуемых экстрактов.

Параллельно готовили эталонную пробу. В 3 пробирки вместо опытной пробы добавляли 50 мкл физиологического раствора натрия хлорида.

Все пробы хорошо перемешивали и помещали в водяную баню с температурой 37°C на 20 минут, затем центрифугировали при 3000 оборотов/мин в течение 10 минут. После чего 1,0 мл центрифугата переносили в высокие термостойкие пробирки, добавляли по 0,5 мл 0,8 % раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК), хорошо перемешивали и помещали на кипящую водяную баню на 15 минут, затем охлаждали в струе холодной воды.

Измерение оптической плотности проб проводили при длине волны 532 нм. Раствор сравнения — изотонический натрия хлорида.

Расчет антиоксидантной активности экстрактов проводили по формуле:

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

Спектрофотометрическое определение ингибирования гидроксильных радикалов (ОН) [8]. Гидроксильные радикалы были получены с помощью реакции Фентона (Fe^{2+} — ЭДТА- H_2O_2 -системы). Антирадикальную способность по отношению к гидроксильным радикалам измеряли с помощью дезоксирибозного метода [8]. Реакционная смесь содержала 0,5 мл 2-дезоксирибозы (2,8 мМ), 0,5 мл фосфатного буфера (PBS, pH 7,4), 0,15 мл раствора железа сульфата в ЭДТУ (10 мМ FeSO_4 , 10 мМ ЭДТА) и 0,15 мл перекиси водорода (10 мМ), и 50 мкл исследуемых экстрактов, окончательный объем реакционной смеси 1 мл. Смесь инкубировали в течение 4 ч при 37°C. После инкубации реакцию останавливали 0,8 мл 2,8 % раствора трихлоруксусной кислоты, после чего добавляли 0,8 мл раствора тиобарбитуровой кислоты (1 % раствор в 50 мМ гидроксид натрия). Нагревали 10 минут на водяной бане, после охлаждения измеряли оптическую плотность при 520 нм. В качестве стандартного раствора использовали 0,05 % раствор галловой кислоты.

Антирадикальную активность рассчитывали по формуле:

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

Спектрофотометрическое определение ингибирования супероксид-радикала в щелочном растворе диметилсульфоксида (ДМСО) [9]. Супероксид-радикал генерируются в щелочном растворе ДМСО (1 мл ДМСО содержит 0,1 мл 5 мМ раствора натрия гидроксида). К 3 мл щелочного раствора ДМСО прибавляли 50 мкл исследуемых экстрактов и 0,2 мл 0,001 % раствора нитросинего тетразолия (NBT). После инкубации при комнатной температуре в течение 5 мин измеряли оптическую плотность при длине волны 560 нм. Антирадикальную активность рассчитывали по формуле:

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

Спектрофотометрический метод измерения NO-ингибирующей активности [9]. Метод основан на измерении концентрации оксида азота (NO), сгенерированного нитропруссидом натрия, по реакции с реактивом Грисса. Реакционную смесь, состоящую из 0,3 мл 5 мМ раствора нитропруссиды натрия в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4) и 0,5 мл исследуемого экстракта (разведение 1 : 10) инкубировали при температуре 25°C в течение 5 часов. Параллельно готовили контрольный образец, приготовленный аналогично, но без добавления экстракта. После инкубирования к реакционной смеси добавляли 0,5 мл раствора реактива Грисса (10 % раствор в 12 % растворе уксусной кислоты) и 3 мл воды. Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 540 нм. Антирадикальную активность рассчитывали по формуле:

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

Спектрофотометрический метод DPPH [10]. Метод основан на взаимодействии антиоксидантов со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH). Стандартный раствор DPPH (5×10^{-4} М) в этаноле, подкисленном уксусной кислотой, разводили этанолом в соотношении 1 : 10 для получения рабочего раствора. Полученный раствор должен иметь оптическую плотность не выше 0,9 при 517 нм. К 5 мл рабочего раствора DPPH добавляли 50 мкл исследуемых экстрактов, перемешивали и регистрировали кинетику убыли оптической плотности раствора в течение 30 минут при длине волны 517 нм. В качестве контрольного образца использовали рабочий раствор DPPH.

Антирадикальную активность определяли по формуле:

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

где A_x — оптическая плотность исследуемого раствора, $A_{\text{контр}}$ — оптическая плотность исследуемого образца.

Спектрофотометрический метод ABTS [11]. Катион-радикал ABTS^+ получают при инкубации смеси (1 : 1), содержащей 7 мМ диаммонийной соли 2,2'-азинобис-3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты («Sigma») и 2,45 мМ натрия персульфата при температуре 37°C в течение 12-16 часов. Реакционная смесь состояла из 1 мл ABTS^+ и 100 мкл исследуемых экстрактов, разведенных 1 : 20 фосфатным буфером (PBS, pH 7,4). Кинетику изменения оптической плотности измеряли при 734 нм в течение 20 минут. В качестве контроля использовали пробу без экстракта. Антирадикальную активность рассчитывали по формуле:

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

Определение Fe^{+2} -хелатирующей активности [12]. К 50 мкл исследуемых экстрактов (разведение 1 : 10) добавляли 0,2 мл реактива, состоящего из раствора 0,2 г о-фенантролина гидрохлорида и 0,16 г железозамониевых квасцов в 100 мл воды, 0,6 мл этанола и 4 мл воды. Реакционную смесь инкубировали при температуре 50°C в течение 30 минут и измеряли оптическую плотность при длине волны 510 нм. Контрольный образец содержит 50 мкл 0,05 % галловой кислоты. Хелатирующую активность рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{A_x}{A_{\text{стандарт}}} \times 100 \, \%.$$

Спектрофотометрический метод, основанный на изучении кинетики реакции ингибирования аутоокисления адреналина [13]. Исходные экстракты смешивали с экстрагентом в соотношении 1 : 100. 10 мкл полученного раствора добавляли к 4 мл карбонатного буфера (рН 10,65) и прибавляли 200 мкл 0,1 % раствора адреналина. Измеряли прирост оптической плотности раствора при 347 нм в течение 10 минут. В качестве контрольной пробы использовали образец экстракта в карбонатном буфере без адреналина. Антиоксидантную активность экстрактов рассчитывали по формуле:

$$AOA = \frac{A_{\text{контр}} - A_x}{A_{\text{контр}}} \times 100 \, \%.$$

Все эксперименты проводились в трехкратной повторности. Измерения проводили на спектрофотометре «КФК-03» в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с тем, что АОА экстрактов растений обусловлена химическим составом сырья и во многом определяется содержанием веществ фенольного характера, на первом этапе исследования была выполнена сравнительная оценка суммарного количества фенольных соединений и концентрации отдельных представителей соединений фенольного ряда — флавоноидов и ПАЦ в экстрактах травы кровохлебки в разные фазы развития (табл. 1).

Данные, приведенные в таблице 1, показали, что содержание фенольных соединений варьировало в широких пределах в зависимости от фазы развития растений. В частности, содержание суммы фенольных соединений в изученных экстрактах относительно экстракта из сырья, собранного в начале вегетации, повышалось в 1,46 раза в фазу бутонизации и в 1,19 раза в фазу цветения, и снижалось в 0,9 раз в фазу плодоношения.

Сходную с суммой фенольных соединений динамику изменения концентрации, но с большей амплитудой колебаний, показали флавоноиды. Их содержание, по отношению к экстракту сырья в начале вегетации, увеличивалось в 4,7 раза в фазу бутони-

зации и снижалось до 4,13 и 2,89 раз в фазы цветения и плодоношения, соответственно.

Для содержания ПАЦ в фазы бутонизации и цветения, по отношению к началу вегетации, наблюдали незначительное снижение — 0,98 и 0,92 раза соответственно, и возрастание в 1,66 раза в фазу плодоношения.

С учетом того, что растительные фенольные БАВ являются полифункциональными антиоксидантами, способными нейтрализовать АФК, связывать ионы металлов, участвующие в АФК-генерирующей реакции Фентона, нейтрализовать свободные радикалы, образовавшиеся в промежуточных стадиях свободно-радикального окисления, оценка антиоксидантного и антирадикального потенциала растительного сырья должна основываться на использовании комплекса методов, отражающих различные аспекты проявления их активности.

В данной работе использовали методы, позволяющие оценивать эффективность природных и синтетических антиоксидантов в отношении ингибирования модельных реакций свободно-радикального окисления биомолекул, в частности, жирных и нуклеиновых кислот, белков и др. (прямые методы), и реакциях снижения активности АФК и инактивации свободных радикалов (непрямые методы).

В качестве прямого метода определения АОА применяли модель Fe^{+2} -индуцированного перекисного окисления арахидоновой кислоты. Установлено, что все изученные экстракты проявляли близкие по значениям уровни ингибирования свободно-радикального окисления (около 70 %) без достоверных различий в различные фазы развития (табл. 2).

Эффективность экстрактов в части активности по отношению АФК оценивали для гидроксильного, супероксидного и азотоксидного радикалов. Полученные результаты показали наличие ингибирующего эффекта по отношению к этим формам АФК у всех изученных экстрактов. Антирадикальная активность из сырья, полученного в фазы начала вегетации, бутонизации и плодоношения, составляла около 65 %, в то время как в фазу цветения этот показатель был приблизительно на 10 % выше.

Таблица 1
Содержание фенольных соединений (мг/мл)
в 70 % водно-этанольном экстракте травы
Sanguisorba officinalis L. в различные фазы развития
Table 1
The content of phenolic compounds (mg / ml)
in 70 % aqueous-ethanolic extract of Sanguisorba
officinalis L. herbs in various phases of development

Фазы развития	Содержание фенольных соединений в 70 % водно-этанольном экстракте, мг/мл		
	Общее содержание полифенольных соединений	Флавоноиды	ПАЦ
Начало вегетации	184,21 ± 0,80	2,93 ± 0,25	72,04 ± 0,31
Бутонизация	267,53 ± 2,04	12,11 ± 0,45	71,25 ± 0,09
Цветение	217,18 ± 1,11	12,09 ± 0,97	66,46 ± 0,25
Плодоношение	166,30 ± 0,40	8,24 ± 1,03	120,31 ± 0,37

Таблица 2
 Антиоксидантная и антирадикальная активность экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L. (%)
 Table 2
 Antioxidant and antiradical activity of extracts of herbs *Sanguisorba officinalis* L. (%)

Методы определения АОА	АОА экстрактов травы кровохлебки в разные фазы развития, %			
	Начало вегетации	Бутонизация	Цветение	Плодоношение
Метод ингибирования ПОЛ	68,01 ± 0,56	70,11 ± 0,91	71,25 ± 0,35	70,20 ± 1,02
Метод ингибирования гидроксил-радикала	65,43 ± 0,89	64,56 ± 1,06	76,60 ± 0,97	64,92 ± 1,21
Метод ингибирования супероксид-радикала	24,93 ± 0,98	73,31 ± 1,34	100,01 ± 0,59	66,39 ± 1,13
Метод ингибирования NO-радикала	7,44 ± 2,88	37,78 ± 2,01	31,29 ± 2,48	25,87 ± 1,99
DPPH метод	85,98 ± 2,43	88,91 ± 2,13	89,41 ± 1,53	87,46 ± 1,28
ABTS метод	76,42 ± 2,64	90,85 ± 2,07	85,77 ± 2,12	64,63 ± 2,36
Fe+2-хелатирующая активность	37,49 ± 1,95	60,19 ± 1,95	54,76 ± 1,73	40,21 ± 2,04
Аутоокисление адреналина	23,75 ± 0,78	48,89 ± 1,13	31,57 ± 0,57	36,09 ± 1,89

Наибольший размах изменения ингибирующей активности экстрактов по отношению к АФК наблюдали в отношении инактивации супероксидного радикала. Этот показатель составлял 25 % в фазу вегетации и достигал 100 % в фазу цветения. По отношению к ингибированию NO-радикала активность экстрактов колебалась в пределах от 7,5 % в фазу вегетации до 37,8 % в фазу бутонизации. Такой характер поведения является, по всей видимости, следствием наличия высокого содержания флавоноидов (табл. 1). Причем АОА экстрактов, согласно литературным данным, значительно превышает активность рутина [14].

Оценку непосредственной антирадикальной активности выполняли двумя методами, отличающимися по инактивируемым радикалам.

Первый метод основан на взаимодействии антиоксидантов со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH). Метод предложен M.S. Blois (1958) [10] и показывает наличие корреляции с результатами, полученными прямыми методами [11]. Результаты исследований (табл. 2) подтвердили наличие выраженной антирадикальной активности у всех исследованных экстрактов, полученные значения были близкими по величине и находились в пределах от 86 % до 89 %.

В основе другого метода оценки антирадикальной активности изучаемых экстрактов лежит реакция взаимодействия антиоксидантов с катион-радикалом 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS⁺). Результаты, полученные с использованием данного метода, по сравнению с методом с DPPH, имеют высокую корреляцию с содержанием фенольных соединений и ингибирующей активностью по отношению к АФК [Floegel, 2011; Thaipong, 2006].

Приведенные в таблице 2 результаты продемонстрировали большие различия в проявлении антирадикальной активности для различных экстрактов: наибольшую активность наблюдали у экстрактов из сырья, собранного в фазу цветения (90,85 ± 2,07 %), а наименьшую — в фазу плодоношения (64,63 ± 2,36 %).

Еще одним методом определения АОА является метод оценки снижения железо-радикальной активности. Известно, что ионы металлов переменной валентности часто являются инициаторами процесса

ПОЛ (реакция Фентона). С учетом этого факта выполнили оценку Fe²⁺-хелатирующей активности и ингибирования гидроксил-радикала, сгенерированного в реакции Фентона. Установлено, что максимальной железо-хелатирующей активностью обладали экстракты травы кровохлебки, собранной в фазы бутонизации и цветения (табл. 2). Такая активность могла быть обусловлена присутствием в их составе флавоноидов и дубильных веществ, которые, согласно литературным данным, являются эффективными хелато-рами ионов тяжелых металлов [3]. Кроме того, столь высокая хелатирующая активность может быть связана и с высоким содержанием полисахаридов, также присутствующих в изучаемых экстрактах.

В качестве интегрального метода оценки эффективности растительного сырья можно рассматривать метод, основанный на оценке ингибирующей активности веществ по отношению к процессу аутоокисления адреналина в щелочной среде *in vitro* и, тем самым, предотвращать образование АФК [13]. Согласно результатам, полученным с использованием этого метода, наибольшую активность регистрировали у экстракта, из сырья, собранного в фазу бутонизации (48,89 ± 1,13 %), а наименьшую — в фазу начала вегетации (23,75 ± 0,78 %).

В целом, полученные результаты, с использованием различных методов оценки, подтвердили наличие выраженной антиоксидантной и антирадикальной активности полученных экстрактов из травы кровохлебки лекарственной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что экстракты надземной части кровохлебки лекарственной, собранной в различные фазы развития, проявляют выраженные антиоксидантные свойства и антирадикальную активность по отношению к поглощению АФК, «гашению» свободных радикалов, ингибированию процессов ПОЛ, и обладают выраженной железо-хелатирующей активностью. Максимальной антиоксидантной и антирадикальной активностью обладали экстракты травы кровохлебки, собранной в период бутонизации и цветения. Данный факт обусловлен особенностями состава и количественного содержа-

ния полифенольного комплекса травы кровохлебки, который участвует в процессах нейтрализации влияния свободных радикалов и оказывает влияние на различные этапы окислительных процессов с участием АФК.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что надземную часть *Sanguisorba officinalis* L. можно рассматривать в качестве перспективного сырья для создания фитопрепаратов, обладающих антиоксидантным и антирадикальным действием.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *Intern. J. of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015; 6(2): 546-566.
2. Pristom AM, Benhamed M. Oxidative stress and cardiovascular disease. Part 1. *Lechebnoe delo: nauchno-prakticheskij terapevticheskij zhurnal*. 2012; 1(23): 21-28. Russian (Пристом А.М., Бенхамед М. Оксидативный стресс и сердечно-сосудистые заболевания. Часть 1. // Лечебное дело: научно-практический терапевтический журнал. 2012. № 1(23). С. 21-28).
3. Men'shchikova EV, Lankin VZ, Kandalintseva NV. Phenolic antioxidants in biology and medicine. Structure, properties, mechanisms of action. LAP, 2012. 495 p. Russian (Меньщикова Е.В., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Структура, свойства, механизмы действия. LAP, 2012. 495 с).
4. Egorova NO. The polyphenol content in aerial parts of Burnet (*Sanguisorba officinalis* L.). Materials of all-Russian scientific conference of students and postgraduates with international participation «Young pharmacy – potential future», 20-21 April 2011, Saint Petersburg: «Publishing house SPCPA». 2011. P. 42-44. Russian (Егорова Н.О. Содержание полифенолов в надземной части кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L.) // Матер. Всерос. науч. конф. студ. и аспирантов с междунар. участием «Молодая фармация – потенциал будущего», 20-21 апреля 2011 г. СПб.: «Изд-во СПбХФА». 2011. С. 42-44).
5. Maltseva EM, Egorova NO, Egorova IN. Quantitative determination of total content of flavonoids in the grass of Burnet. *Bulletin of the Ural medical academic science*. 2011; 3(1): 68. Russian (Мальцева Е.М., Егорова Н.О., Егорова И.Н. Количественное определение суммарного содержания флавоноидов в траве кровохлебки лекарственной // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. № 3(1). С. 68).
6. FFS 1.5.3.0008.15 the Determination of tannins in herbal drugs and medicinal plant preparations. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#417/z (accessed 25.12.2016). Russian (ОФС 1.5.3.0008.15 Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Доступ: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#417/z (Дата обращения 25.12.2016).
7. Mukhamadiyarov RA, Radionov IA, Razumov AS, Bogdanov MV. Efficiency of liposomal forms of antioxidants for correcting oxidative stress in chronic pancreatitis in experiment. *Nanotechnol. Russia*. 2015; 10(1): 135-139.
8. Madhu CS, Manukumar HM, Puttalingaiah B. New-vista in finding antioxidant and anti-inflammatory property of crude protein extract from *Sauropus androgynus* leaf. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 2014; 13(4): 375-383.
9. Rahini D, Anuradha R. In-vitro antioxidant activity of *Artabotrys hexapetalus*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2014; 5(2): 396-405.
10. Adesanwo JK, Makinde OO, Obafemi CA. Phytochemical analysis and antioxidant activity of methanol extract and betulinic acid isolated from the roots of *Tetracera potatoria*. *J. of Pharmacy Research*. 2013; 6: 903-907.
11. Pham Thi Be Tu, Shinkichi Tawata. Anti-Oxidant, Anti-Aging and Anti-Melanogenic Properties of the Essential Oils from Two Varieties of *Alpinia zerumbet*. *Molecules*. 2015; 20: 16723-16740.
12. Patel DS, Shah PB, Managoli NB. Evaluation of in-vitro Anti-oxidant and Free Radical Scavenging activities of *Withania somnifera* and *Aloe vera*. *Asian J. Pharm. Tech*. 2012; 2(4): 143-147.
13. Ryabinina EI, Zotova EE, Vetrova EN, Ponomareva NI, Ilyushina TN. A new approach in the evaluation of antioxidant activity of plant materials in the study of the process of auto-oxidation of adrenaline. *Chemistry of vegetable raw materials*. 2011; 3: 117-121. Russian (Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Ветрова Е.Н., Пономарева Н.И., Илюшина Т.Н. Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина / Е. И. Рябинина [и др.] // Химия растительного сырья. 2011. №3. С. 117-121).
14. Toropova AA, Nikolaev SM, Verlan NV. Antioxidant activity of complex herbal remedy «Pancreatic» and its components in model systems. *Siberian medical journal (Irkutsk)*. 2014; 7: 119-121. Russian (Торопова А.А., Николаев С.М., Верлан Н.В. Антиоксидантная активность комплексного растительного средства «Панкреофит» и его компонентов в модельных системах // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2014. № 7. С. 119-121).

