

УДК 577.13:582.892

Д. П. Филиппова¹, Н. Ю. Колбас², В. Н. Решетников³¹магистр биол. наук, аспирант каф. химии

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

²канд. биол. наук, доц., зав. каф. химии

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

³д-р биол. наук, проф., академик Национальной академии наук Беларуси
зав. отделом биохимии и биотехнологии растений

Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси

e-mail: fdp@li.ru

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
И ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ПОЛИСЦИАС (*POLYSCIAS SPP.*)**

Представлены данные об антиоксидантной активности и общего количества фенольных соединений экстрактов листьев трех видов *Polyscias*. По методу АБТС значения параметра составили 0,355–0,401 ммоль ТЭ/л, по методу FRAP – 0,528–0,542 ммоль Fe²⁺/л. Исследования биологически активных, в частности фенольных, соединений представителей родов *Polyscias* играют перспективную роль в современной фармакологической и медицинской индустрии. С их помощью можно получать соединения с высокой антиоксидантной активностью, а также развивать биотехнологические методики, направленные на промышленное внедрение культур клеток и тканей *in vitro*.

FILIPPOVA D. P., KOLBAS N. Y., RESHETNIKOV V. N.**COMPARATIVE ANALYSIS ANTI-OXIDANT ACTIVITY****AND TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS OF THE GENUS POLYSCIAS (*POLYSCIAS SPP.*)**

Research of biologically active compounds, in particular phenolic ones, of the *Polyscias* genus plays a promising role in the modern pharmacological and medical industry. They can be used to obtain compounds with high antioxidant activity, as well as to develop biotechnological techniques aimed at the industrial introduction of cell and tissue cultures *in vitro*.

Введение

Растения являются неизменным источником биологически активных веществ (БАВ). Многие из соединений, используемых в фармацевтической, пищевой, парфюмерной и ветеринарной промышленности, выделяют из тканей дикорастущих, редких и исчезающих видов. Поэтому особый интерес представляет изучение проблемы рационального использования природных ресурсов и культивирование растений в современной селекции.

Полисциас (*Polyscias* J. R. Forst) – род растений семейства Аралиевые (*Araliaceae* Juss.). Произрастают в Юго-Восточной Азии и на островах Индийского и Тихого океанов. Согласно контрольному списку представителей семейства Аралиевых, к роду *Polyscias* причисляют более 100 видов [1].

Представители вышеназванного рода на данный момент являются объектами изучения как традиционной, так и нетрадиционной медицины и фармакологии ввиду высокой биологической активности веществ, накапливаемых в вегетативных органах данных растений. Некоторые соединения, обладающие широким спектром биологической активности и содержащиеся в листьях полисциаса, являются одними из перспективных направлений в современной биохимии и биотехнологии. Подобные соединения оказывают специфическое действие на сердечно-сосудистую и центральную нервную системы, повышают когнитивную деятельность, стимулируют иммунную систему,

вызывая индукцию интерферона, а также обладают иммуномодулирующим, противовоспалительным, антиоксидантным и противовирусным действиями [2].

Препараты полисциаса назначаются как эффективные средства, стимулирующие физическую работоспособность, процессы ранозаживления, лактации, устойчивость организма к инфекционным болезням, а также в комплексной терапии ревматических заболеваний и невралгии [3]. Вследствие этого выращивание отдельных представителей рода *Polyscias* с последующим накоплением опыта в плане создания культур клеток и тканей является одним из перспективных направлений развития тандема биотехнологии и фармакологии на территории Республики Беларусь. В наших широтах ни один из видов полисциаса не произрастает. Однако в Брестской области полисциас возможно выращивать в оранжерейных и тепличных условиях.

Литературные данные о компонентном составе фенольных соединений представителей рода *Polyscias* носят фрагментарный характер. В составе экстрактов вегетативной массы выявлено наличие спирто- и водорастворимых веществ, крахмала, свободных аминокислот, сахаров, тритерпеновых сапонинов, олеаноловых гликозидов и свободной олеаноловой кислоты. Существенным является установление факта высокого содержания в экстрактах полисциаса β -ситостерина, также известного широким спектром благоприятных эффектов [4; 5].

Перспективной является разработка методик подобных исследований для представителей рода *Polyscias*, что поспособствует накоплению знаний о спектре фенольных соединений в плодах, листьях и корнях и предоставит полезную информацию для отраслей, заинтересованных в производстве биологически активных добавок на основе этих растений. Также, благодаря разработкам ученых Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН и Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии из корня полисциаса кустарникового (*Polyscias fruticosa* L.) выделен штамм, который можно выращивать *in vitro* и получать требуемые количества биомассы культуры ткани этого растения [4].

С целью понять механизм действия биологически активных веществ растительного происхождения, которые способны бороться с различными заболеваниями и их последствиями вследствие антирадикального окисления, разработан целый ряд исследований по изучению антиоксидантной активности полисциаса [2]. Так как листья можно собирать каждый вегетационный период, то важным аспектом является оценка уровня и сезонных изменений антиоксидантной активности в листьях с различным возрастом растения для заготовок сырья в перспективе.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования нами были использованы листья *Polyscias* трех видов: полисциаса кустарникового (*P. fruticosa* L.), полисциаса курчавого (*P. crispatum* L.) и полисциаса шлемовидного (*P. scutellaria* L.). Образцы собирали с дочерних растений одной родительской особи и затем высушивали путем лиофилизации.

Для получения суммарного экстракта навеску воздушно-сухого порошка растительного сырья, предварительно растертого с небольшим количеством экстрагента, дважды экстрагировали 70 % этанолом (по объему) и настаивали в течение 7 дней. Далее полученный экстракт подвергали исследованию.

Определение антиоксидантной активности экстрактов полисциаса проводили с использованием модельных систем с катион-радикалами АБТС (2,2-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) и методом *FRAP* (от англ. *Ferric Reducing Antioxidant Power* – железо-восстанавливающая антиоксидантная мощность).

Метод АБТС является перспективным подходом, основанным на применении катион-радикала диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой

кислоты) (АВТС^{·+}). АВТС^{·+} обладает характерным спектром поглощения и высокой оптической плотностью при длинах волн 660–820 нм, что делает возможным его применение для характеристики сложных систем, содержащих окрашенные компоненты.

Раствор АВТС^{·+} готовили реакцией 5 мл $7 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора АВТС и 88 мкл $140 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора $K_2S_2O_8$ и выдерживали 16 часов без доступа света при температуре +4 °С. Непосредственно перед анализом исходный раствор катион-радикала диспергировали водой до значения абсорбции $0,70 \pm 0,005$ при $\lambda = 734$ нм. При проведении анализа к 3 мл рабочего раствора АВТС^{·+} добавляли 100 мкл экстракта. Изменение оптической плотности (A_E) смеси регистрировали в течение 10 минут с использованием спектрофотометра (Proscan MC 122) при $\lambda = 734$ нм и длине пути светового монохромного луча в 1 см. Контрольное измерение оптической плотности (A_B) проводили при тех же условиях, но в качестве образца использовали дистиллированную воду.

Степень ингибирования катион-радикала АВТС^{·+} вычисляли по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = [(A_B - A_E) / A_B] \times 100,$$

где A_B – оптическая плотность контроля; A_E – изменение оптической плотности смеси после инкубирования.

В качестве стандарта использовали Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) – гидрофильный аналог токоферола, также обладающий антиоксидантным действием. Для построения калибровочной кривой применяли эффективный диапазон концентраций тролокса от 10 до 600 мкмоль/л. Антиоксидантную активность исследуемых листьев выражали в миллимоль тролокс-эквивалента в пересчете на литр экстракта, учитывая линейную зависимость параметра стандарта от его концентрации.

В свою очередь, метод *FRAP* позволяет оценить антиоксидантную активность непосредственно в пробе за счет восстановления в кислой среде бесцветного Fe (III)-трипиридилтриамина синего цвета [2].

Рабочий реактив *FRAP* готовили непосредственно перед анализом из ацетатного буфера, 0,01М раствора 2,4,6-три(2-пиридил)-S-триамина и 0,02М раствора $FeCl_3$ в пропорции 10 : 1 : 1 по объему. Для проведения испытания брали 0,4 мл образца стандарта (раствор $FeSO_4$) или контроля (ацетатный буфер) и добавляли 3 мл рабочего реактива *FRAP*. Инкубировали 30 минут при температуре +37 °С. Измерение оптической плотности анализируемой смеси регистрировали при $\lambda = 593$ нм. Для построения калибровочной кривой использовали эффективный диапазон концентраций $FeSO_4$ от 0,234 до 1,875 ммоль/л. Антиоксидантную активность выражали миллимоль Fe^{+2} на литр экстракта (ммоль Fe^{+2} /л).

Общее содержание фенольных соединений в экстрактах определяли спектрофотометрически по реакции с реактивом Фолина. Для этого к 0,1 мл фильтрата приливали поэтапно 2,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл реактива Фолина и 0,8 мл 20 % раствора Na_2CO_3 . Спектрофотометрическое исследование проводили с использованием пластиковой кюветы при $\lambda = 765$ нм на аппарате Proscan MC 122. Общее количество фенольных соединений (ОКФС) рассчитывали в миллиграммах галловой кислоты (ГМ) на 100 г сырой навески растительного материала, учитывая линейную зависимость, при среднем $R^2 = 0,993$.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что показатель антиоксидантной активности (АОА) исследуемых экстрактов полисциаса кустарникового (*P. fruticosa* L.) составил $0,401 \pm 0,032$ ммоль ТЭ/л при степени ингибирования

катион-радикала АБТС⁺, равной $76,3 \pm 5,86$ %, полисциаса курчавого (*P. crispatum* L.) – $0,355 \pm 0,011$ ммоль ТЭ/л при степени ингибирования $68,68 \pm 1,78$ % и полисциаса шлемовидного (*P. scutellaria* L.) – $0,393 \pm 0,018$ ммоль ТЭ/л при степени ингибирования $74,92 \pm 1,78$ % соответственно (таблица 1).

Таблица 1. – Антиоксидантная активность экстрактов полисциаса при использовании модельной системы с катион-радикалом АБТС

Вид	Показатель АОА, ммоль ТЭ/л	Степень ингибирования АБТС ⁺ , %
<i>Polyscias fruticosa</i> L.	$0,401 \pm 0,032$	$76,3 \pm 5,86$
<i>Polyscias crispatum</i> L.	$0,355 \pm 0,011$	$68,68 \pm 1,78$
<i>Polyscias scutellaria</i> L.	$0,393 \pm 0,018$	$74,92 \pm 1,78$

Примечание – ТЭ – тролокс эквивалент.

В свою очередь, показатели антиоксидантной активности по методу FRAP составили $0,542 \pm 0,009$ ммоль Fe²⁺/л для полисциаса кустарникового (*P. fruticosa* L.) и $0,528 \pm 0,013$ и $0,531 \pm 0,011$ ммоль Fe²⁺/л для полисциаса курчавого (*P. crispatum* L.) и полисциаса шлемовидного (*P. scutellaria* L.) соответственно (таблица 2).

Таблица 2. – Антиоксидантная активность (по методу FRAP) экстрактов полисциаса

Вид	Показатель АОА, ммоль Fe ²⁺ /л
<i>Polyscias fruticosa</i> L.	$0,542 \pm 0,009$
<i>Polyscias crispatum</i> L.	$0,528 \pm 0,013$
<i>Polyscias scutellaria</i> L.	$0,531 \pm 0,011$

Общее содержание фенольных соединений в экстрактах вегетативной массы исследуемых растений составило 889,1–1101,9 мг ГК/100 г сырой навески (таблица 3).

Таблица 3. – Общее количество фенольных соединений (ОКФС) в экстрактах полисциаса

Вид	ОКФС, мг ГК / 100 г сырой навески
<i>Polyscias fruticosa</i> L.	$1101,9 \pm 18,4$
<i>Polyscias crispatum</i> L.	$889,1 \pm 14,9$
<i>Polyscias scutellaria</i> L.	$909,2 \pm 17,1$

Изученные растения по уменьшению содержания фенольных соединений экстрактов их вегетативной массы можно распределить следующим образом: *Polyscias fruticosa* > *Polyscias scutellaria* > *Polyscias crispatum*.

В целом установлена высокая корреляция между ОКФС и АОА. Максимальные значения общего количества фенольных соединений и антиоксидантной активности, измеренной методиками АБТС и FRAP, были выявлены у экстрактов полисциаса кустарникового (*P. fruticosa*), немного меньшие значения достигнуты у экстрактов полисциаса шлемовидного (*P. scutellaria*) и наименьшие – у полисциаса курчавого (*P. crispatum*). Возможно, это объясняется тем, что у полисциаса курчавого наименьшая площадь листовой пластинки, что не дает возможности синтеза фенольных соединений, обладающих антиоксидантной активностью в таких же количествах, как у других представителей исследуемых видов.

Исходя из сведений, представленных в литературных источниках, также можно сравнить уровень антиоксидантной активности экстрактов полисциаса с экстрактами других лекарственных растений, имеющих ярко выраженные антирадикальные свойства или имеющие полезные фармакологические характеристики (таблица 4) [7].

В таблице 4 лекарственные растения представлены выборочно, начиная с вида, показавшего максимальные значения антиоксидантной активности – 2,523 ммоль Fe⁺²/л (*Melissae folium* L.), заканчивая *Althaea officinalis* L., антиоксидантная активность экстрактов которого, измеренная по методике FRAP, составила 0,059 ммоль Fe⁺²/л. Женьшень обыкновенный и полисциас кустарниковый по своим показателям завершают первую половину этого списка со значениями 0,592 и 0,542 ммоль Fe⁺²/л соответственно. Полисциас шлемовидный и курчавый расположились в начале второй половины списка, уступая лишь мать-и-мачехе – 0,531 и 0,528 ммоль Fe⁺²/л. Однако все вышеназванные результаты близки по своим значениям, что говорит о высокой антирадикальной активности как одних, так и других видов.

Таблица 4. – Антиоксидантная активность (по методу FRAP) экстрактов некоторых лекарственных растений

Вид	Показатель АОА, ммоль Fe ⁺² /л	Литературный источник
Мелисса лекарственная (<i>Melissae folium</i> L.)	2,523	[8]
Спирея серая (<i>Spiraea herba</i> Zabel.)	1,526	[8]
Ива травянистая (<i>Salix herbaceae</i> L.)	1,089	[8]
Тимьян обыкновенный (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	0,907	[8]
Мята перечная (<i>Mentha piperita</i> L.)	0,899	[8]
Сумах дубильный (<i>Rhus coriaria</i> L.)	0,713	[8]
Вероника длиннолистная (<i>Veronica longifolia</i> L.)	0,651	[8]
Женьшень обыкновенный (<i>Panax ginseng</i> L.)	0,592	[5]
Полисциас кустарниковый (<i>Polyscias fruticose</i> L.)	0,542	
Мать-и-мачеха (<i>Tussilago farfara</i> L.)	0,535	[8]
Полисциас шлемовидный (<i>Polyscias scutellaria</i> L.)	0,531	
Полисциас курчавый (<i>Polyscias crispatum</i> L.)	0,528	
Эхинацея пурпурная (<i>Echinacea purpurea</i> Moench.)	0,403	[8]
Крапива двудомная (<i>Urtica dioica</i> L.)	0,316	[8]
Лопух обыкновенный (<i>Arctium lappa</i> L.)	0,234	[8]
Вербена лекарственная (<i>Verbena officinalis</i> L.)	0,209	[8]
Фенхель обыкновенный (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	0,142	[8]
Календула лекарственная (<i>Calendula officinalis</i> L.)	0,138	[8]
Цетрария исландская (<i>Cetraria islandica</i> L.)	0,125	[8]
Алтей лекарственный (<i>Althaea officinalis</i> L.)	0,059	[8]

Полученные результаты говорят о высокой антиоксидантной активности экстрактов листьев полисциаса (максимальные значения достигнуты у экстракта листьев полисциаса кустарникового), если сравнивать их с показателями АОА экстрактов листьев женьшеня обыкновенного, который является признанным высокоэффективным ингибитором свободных радикалов [5]. Поэтому дальнейшие исследования в этой области могут привести к получению в будущем высокоактивных фармацевтических компонентов, предотвращающих разрушающее и пагубное действие свободных радикалов на различные биологические системы, в том числе на организм человека.

Использование экстрактов растений полисциаса объективно может принести пользу фармацевтической промышленности, так как они имеют достаточно усредненный показатель антиоксидантной активности, связанный с общим количеством фенольных соединений, и не способны нанести вред даже при использовании их в больших дозах и высоких концентрациях.

Заклучение

Таким образом, общепринятые методики АБТС и FRAP можно использовать для оценки антиоксидантной активности экстрактов полисциаса и их компонентов, т. к. являются достаточно доступными и показывают результаты с высокой коррелятивной зависимостью от общего содержания фенольных соединений.

Последующие исследования компонентного состава и антиоксидантной активности соединений представителей родов *Polyscias* имеют большой научный и практический потенциал, играют огромную роль в современной фармакологии для получения соединений с высокой антиоксидантной активностью, а также способствуют развитию биотехнологических разработок, направленных на промышленное внедрение выращивания культур клеток и тканей *in vitro*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, H. W. Ginseng leaf-stem: Bioactive constituents and pharmacological functions / H. W. Wang, D. C. Peng, J. T. Xie // *Chin. Med.* – 2009. – Vol. 4. – P. 1–8.
2. Seog, H. M. Antioxidant activities of cultivated and wild Korean ginseng leaves / H. M. Seog, I. W. Choi, H. Y. Cho // *Food Chem.* – 2005. – Vol. 92. – P. 535–540.
3. Lee, L.-S. Hypolipidemic and Antioxidant Properties of Phenolic Compound-Rich Extracts from White Ginseng (*Panax ginseng*) in Cholesterol-Fed Rabbits / L.-S. Lee, C.-W. Cho // *Molecules.* – 2013. – Vol. 18. – P. 17381–17399.
4. Chung, I.-M. Comparative phenolic compound profiles and antioxidative activity of the fruit, leaves, and roots of Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) according to cultivation years / I.-M. Chung, J.-J. Lim // *J. Ginseng Research.* – 2015. – Vol. 40. – P. 68–75.
5. Кочкин, Д. В. Качественный и количественный состав тритерпеновых гликозидов культур клеток *in vitro* представителей семейства Araliaceae (*Panax* spp., *Polyscias* spp.) / Д. В. Кочкин, А. М. Носов // Биология растительных клеток *in vitro* и биотехнология : материалы Междунар. науч. конф., Казань, 14–16 окт. 2013. – Казань : Наука, 2013. – С. 45–46.
6. Антирадикальная активность листьев женьшеня / А. Г. Шутова [и др.] // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 6–8 июня 2017 г. – Минск : Медиосонт, 2017. – С. 157–161.
7. Ludwiczuk, A. Estimation of the chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of extracts received from leaves and roots of American ginseng / A. Ludwiczuk, T. Wolski // *Herba Polonica.* – 2006. – Vol. 52, Nr 4. – P. 79–90.
8. Katalanic, V. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols / V. Katalanic, M. Milos // *Food Chem.* – 2004. – Vol. 94. – P. 550–557.

Рукапіс наступіў у рэдакцыю 19.03.2020