

Г.М. Саякова, А.К. Бошкаева, А.Е. Хамитова  
 Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова,  
 г. Алматы, Республика Казахстан

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (TRIFOLIUM PRATENSE)

Антиоксиданты играют большую роль в жизни человека. Ингибиторы окисления природного происхождения представляют большой интерес, как безопасные лекарственные средства, в отличие от синтетических препаратов. В данной работе приводятся результаты определения антиоксидантной активности растительного сырья – травы Клевера лугового (*Trifolium pratense*) с помощью FRAP и DPPH методов.

**Ключевые слова:** Клевер луговой (*Trifolium pratense*), антиоксидант, FRAP, DPPH

**Актуальность.** Свободные радикалы и реакции с их участием играют важную роль в причинах возникновения многих заболеваний человека, а также в старении организма в целом. Они возникают эндогенно при обычных реакциях обмена веществ или экзогенно, например, как компоненты табакокурения или от загрязнения окружающей среды, токсинов и радиации [1]. Высокоактивные молекулы в виде свободных радикалов вызывают разрушение тканей, вступая во взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами, ДНК и белками. Фармакологическая коррекция окислительного процесса осуществляется с помощью биологически активных веществ (БАВ), в частности антиоксидантов. Они прерывают быстрорастущие процессы окисления, образуя малоактивные радикалы, легко выводимые из организма. Одной из самых перспективных групп БАВ, обладающей антиоксидантной активностью, являются растительные фенольные соединения [2]. Их антиоксидантная активность объясняется двумя особенностями. Во-первых, они связывают ионы тяжелых металлов (образуя с ними устойчивые комплексы), которые являются катализаторами окислительных процессов. Во-вторых, фенольные соединения взаимодействуют с высокоактивными свободными радикалами, возникающими при аутоокислении, например, липидных компонентов, переводя их в малоактивные [3]. Поэтому антиоксиданты и исследование антирадикальных свойств соединений в последнее время получили широкое распространение.

Многие растения содержат флавоноиды – большую группу соединений с полифенольной структурой, которые связывают свободные радикалы, т.е. являются антиоксидантами, также витамины, аминокислоты, минералы, микроэлементы обладающие антиоксидантными свойствами или непосредственно, или опосредованно, так как входят в состав ферментов-антиоксидантов [4]. Одним из таких видов растений является распространенный в Республике Казахстан Клевер луговой (*Trifolium pratense*).

Существует определенный перечень растительного сырья, которые обладают достаточной антиоксидантной активностью, на основе чего создаются различные коммерческие препараты пищевого и лечебно-профилактического назначения, поэтому лабораторное определение антиоксидантной активности как природного сырья Клевера лугового является важным элементом установления его качества.

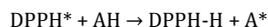
**Целью** работы является исследование антиоксидантной активности сырья – травы Клевера лугового (*Trifolium pratense*).

**Материалы и методы исследования.** В качестве объекта исследования использована высушенная трава Клевера лугового (*Trifolium pratense*) ручного сбора в период цветения (июнь-июль 2017 г.), на месте естественного произрастания в Восточной части Алакольского района Алматинской области и в Каскелене.

Антиоксидантную активность определяли двумя методами – FRAP и DPPH. Метод FRAP (ferric reducing antioxidant power) основан на регистрации снижения концентрации, комплексного иона трехвалентного железа – TPTZ (2,4,6-3(2-пиридил)-1,3,5-триазин) при взаимодействии с антиоксидантом. Связывание  $Fe^{2+}$  с лигандом создает весьма интенсивную темно-синюю окраску раствора. Измерив оптическую плотность можно найти количество восстановленного железа, и соотнести с количеством антиоксидантов. В качестве эталонного вещества использовали аскорбиновую кислоту [4; 5].

В методе DPPH молекула 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) представляет собой радикал, характеризующийся стабильностью в различных средах и в широком интервале температур, что объясняется максимальной делокализацией свободного электрона по всей молекуле и пространственным экранированием атомов, несущих наибольшую спиновую плотность, а также отсутствием атомов водорода в тех положениях, где может происходить изомеризация или диспропорционирование. Кроме того, делокализация является причиной интенсивной фиолетовой окраски этого радикала в водно-спиртовых средах [4; 6].

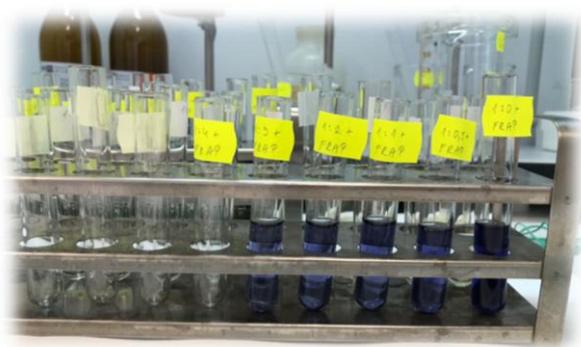
Метод основан на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ,  $M = 394,33$ ), растворенного в метаноле с образцом антиоксиданта (АН) по схеме:



В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 517 нм обычными методами спектрофотометрии.

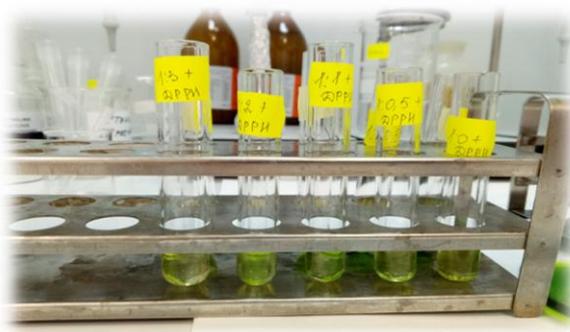
Растительное сырье массой 1,5 г помещали в коническую колбу с 96% этанолом при первом методе (FRAP), с метанолом при втором методе (DPPH). Затем колбу поместили на 30 минут в аппарат Tesla Teson 4 UC 006 DM1 для получения извлечения под действием ультразвука. Отфильтровав извлечение два раза через вату, получили основной раствор [7]. После приготовили пять образцов, отмерив с помощью дозаторов типа Micropipette 10-100 мкл и 100-1000 мкл с комплектами наконечников по следующим соотношениям:

Соотношение	Основной раствор	Этанол 96% (при FRAP методе) или Метанол (при DPPH методе)
1:0	1 мл	0 мл
1:0,5	0,667 мл	0,333 мл
1:1	0,5 мл	0,5 мл
1:2	0,333 мл	0,667 мл
1:3	0,25 мл	0,75 мл



Затем с каждого образца, брали по 0,1 мл и добавляли 3 мл FRAPреагента. Через 5 минут измеряли поглощение при  $\lambda=593$  нм. При этом появлялась темно-синяя окраска. В качестве раствора сравнения использовали FRAP реагент.

При DPPH методе с каждого образца брали по 0,2 мл и добавляли 1,8 мл DPPH реагента. При этом наблюдали переход окраски из фиолетового в желтый цвет. Через 30 минут измеряли поглощение при  $\lambda=517$  нм. В качестве раствора сравнения использовали раствор состоящий из 1,8 мл DPPH реагента и 0,2 мл метанола.



**Результаты исследования.** Последовательно были измерены поглощения СПФ методом при  $\lambda=593$  нм (при FRAP методе) и  $\lambda=517$  нм (при DPPH методе) изучаемых образцов растительного сырья. Антиоксидантную активность определяли с помощью следующих формул:  $AA = \frac{A}{0,134} (\text{мг/мл})$  для первого метода (FRAP)

$AA = \frac{A_p - A}{A_p} * 100\%$  для второго метода (DPPH)

где, A-поглощение исследуемых образцов,  $A_p$ -поглощение раствора сравнения, 0,134 - поглощение аскорбиновой кислоты (витамина С).

Также в DPPH методе определили минимальную акцепторную активность антиоксиданта при котором снижается 50% свободных радикалов (EC50).

Таблица 1 - Результаты исследования антиоксидантной активности по FRAP методу

Сырье	Разведение	Концентрация (мг/мл)	Поглощение	аналогичное количество аскорбиновой кислоты (мг/мл)
Клевер луговой (Trifolium pratense)	1:0	50,0	0,449	3,350746269
	1:0,5	33,3	0,346	2,582089552
	1:1	25,0	0,253	1,888059701
	1:2	16,7	0,132	0,985074627
	1:3	12,5	0,071	0,529850746

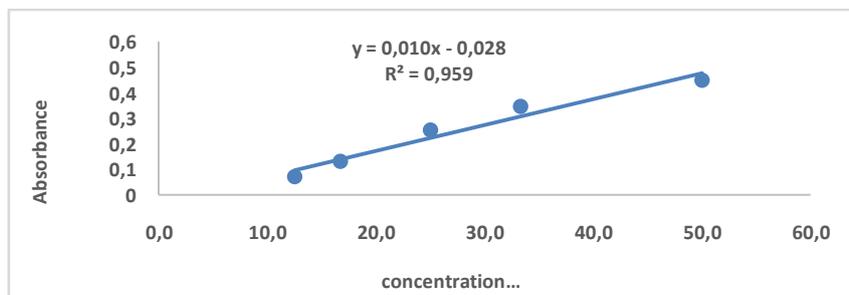


График 1 - Результаты исследования антиоксидантной активности по FRAP методу

Таблица 2 - Результаты исследования антиоксидантной активности по DPPH методу

Сырье	Разведение	Концентрация (мг/мл)	Поглощение	Акцепторная активность (%)	EC50 (log)
-------	------------	----------------------	------------	----------------------------	------------

Клевер луговой (Trifolium pratense)	1 : 0	50,0	0,095	85,11	24,71
	1:0,5	33,3	0,096	84,95	
	1:1	25,0	0,078	87,77	
	1:2	16,7	0,071	88,87	
	1:3	12,5	0,057	91,07	
	Раствор сравнения		0,638		

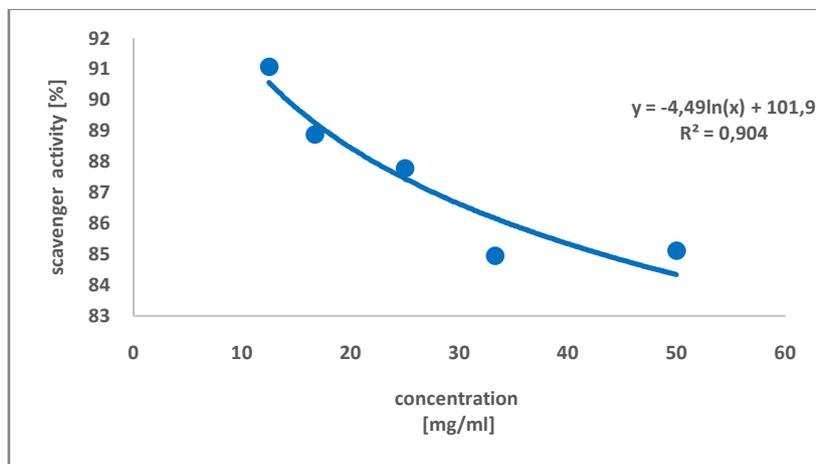


График 2 - Результаты исследования антиоксидантной активности по DPPH методу

**Выводы.** На основании проведенной работы на базе Университета Коменского в Братиславе (кафедра Фармакогнозии и ботаники) можно сделать вывод, что отечественное растительное сырье Клевер луговой обладает высокой антиоксидантной активностью в изученных методах. Мы установили, что исследованное сырье обладает высокой восстанавливающей активностью, которая возрастает с увеличением концентрации фенольных веществ (FRAP метод). Антиоксидантная активность растительного сырья - травы Клевера лугового при концентрации 50 мг/мл была эквивалентна 3,35 мг/мл аскорбиновой кислоты (FRAP метод). Также определили концентрацию, вызывающий 50% эффект (EC50), которая составляет 24,71 мг/мл (DPPH метод). Это растительное сырье в дальнейшем можно рекомендовать как основу для использования в качестве биологически активных добавок в лечебно-профилактическом питании.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Переверзева О.А., Миронов С.Ю. «Изучение антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина» // Научное сообщество студентов XXI столетия. «Естественные науки»: сб. ст. по мат. XVII междунар. студ. науч.-практ. конф. – 2008. - №3(17). – С. 12-16.
- 2 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 // Химия растительного сырья. - 2011. - №3. – С. 117-121.
- 3 Сирота Т.В. Способ определения антиоксидантной активности супероксидсмутазы и химических соединений // Патент РФ № 2144674 от 20.01.2000.
- 4 Хасанова С.Р., Плеханова Т.И., Гашимова Д.Т., Галияхметова Э.Х., Клыш Е.А. Сравнительное изучение антиоксидантной активности растительных сборов // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2007. - №1. - С.163-166.
- 5 Сборник описаний лабораторных работ по курсу «Биологическая химия». – Славянск – на – Кубани: Идательский центр СГПИ, 2006. - 44 с.
- 6 Абдулин И.Ф. Органические антиоксиданты как объекты анализа // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. - 2001. - Т.7, №6. - С.3-13.
- 7 Европейская Фармакопея 6 издание 2008 г.

**Г.М. Саякова, А.К. Бошкаева, А.Е. Хамитова**

*С.Д. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық медицина университеті,  
Қазақстан Республикасы, Алматы қ.*

#### **ҚЫЗЫЛБАС БЕДЕ (TRIFOLIUM PRATENSE) ОТАНДЫҚ ӨСІМДІК ШИКІЗАТЫНЫҢ АНТИОКСИДАНТТЫ БЕЛСЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ**

**Түйін:** Антиоксиданттар адамның өмірінде үлкен рөл атқарады. Табиғи текті тотығу ингибиторлары синтетикалық препараттарға қарағанда қауіпсіз дәрілік заттар ретінде қызығушылық танытады. Осы жұмыста Қызылбас беде (Trifolium pratense) отандық өсімдік шикізатының антиоксидантты белсенділігін FRAP және DPPH әдістері көмегімен анықтау нәтижелері келтіріледі.

**Түйінді сөздер:** Қызылбас беде (Trifolium pratense), антиоксидант, FRAP, DPPH.

**G.M. Sayakova, A.K. Boshkaeva, A.E. Khamitova**  
*Asfendiyarov Kazakh National medical university,  
Republic of Kazakhstan, Almaty city*

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DOMESTIC PLANT RAW MATERIAL OF RED CLOVER  
(TRIFOLIUM PRATENSE)**

**Resume:** Antioxidants have a big role in human life. Inhibitors of oxidation of natural origin have big interest as safe drugs, unlike synthetic drugs. In this research include the results of the determination of the antioxidant activity of plant raw materials - the grass of Red clover (*Trifolium pratense*) with FRAP and DPPH methods.

**Keywords:** *Trifolium pratense*, antioxidant, FRAP, DPPH.