

**ՆԱՅԱՍԱԿՆԻ ՆԱՆՐԱԴԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA**

Նայասարանի քիմիական հանդես
Химический журнал Армении 69, №1-2, 2016 Chemical Journal of Armenia

УДК 547.972

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ФЛАВОНОИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ СОЦВЕТИЙ
БЕССМЕРТНИКА КРАСНОВАТОГО, ПЛОДОВ РАСТОРОПШИ
ПЯТНИСТОЙ И МАКЛЮРЫ ОРАНЖЕВОЙ**

Г. С. АНАНИКЯН

Научно-технологический центр органической
и фармацевтической химии НАН Республики Армения
Институт тонкой органической химии им. А.Л.Мнджояна
Армения, 0014, Ереван, пр. Азатутян, 26
Тел.(374-10)281754. E-mail: hrach63@mail.ru
Национальный политехнический университет Армении
Армения, 0009, Ереван, ул.Теряна, 105

Поступило 8 II 2016

Целью данной работы являлось сравнительное изучение антирадикальной активности флавоноидных компонентов соцветий бессмертника красноватого, плодов расторопши пятнистой и маклюры оранжевой спектрофотометрическим методом с применением свободного радикала —2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. Показано, что пренилированный изофлавоноид — помиферин, полученный из маклюры оранжевой, и его смесь с другим пренилированным изофлавоноидом — осайном, имеют более выраженную антирадикальную активность, чем остальные исследуемые образцы.

Рис. 4, табл. 2, библиографические ссылки 7.

Смесь флавоноидных соединений (фламин), выделяемая из соцветий бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* /L./ Moench), используется для лечения холециститов, гепатохолециститов, а также других заболеваний печени и желчных путей. Основными активными ингредиентами фламина являются флавоноиды салипурпозид (1), изосалипурпозид (2), апигенин (4), нарингенин (5) и кемпферол (3) (рис. 1) [1].

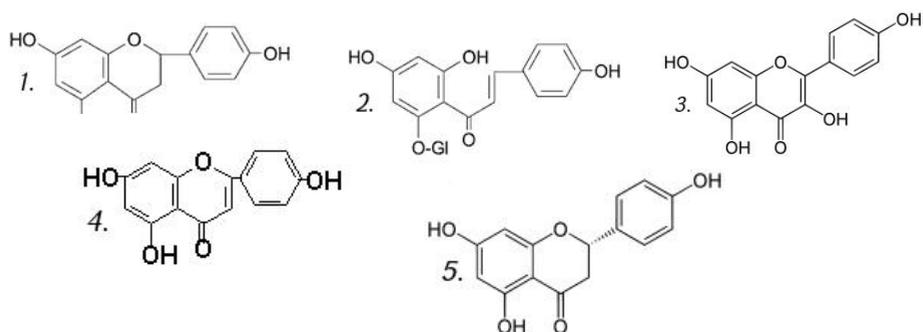


Рис. 1. Основные компоненты препарата фламин: 1. салипурпозид, 2. изосалипурпозид, 3. кемпферол, 4. апигенин, 5. нарингенин.

Ранее [2] было показано, что в качестве сырья для получения фламина, кроме бессмертника песчаного, можно использовать и бессмертник красноватый (*Helichrysum rubicundum* (C. Koch) Takht.).

В качестве эффективных гепатопротекторных средств в современной медицине признаны препараты, содержащие смесь флаволигнанов (силимарин), которая получается из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* /L/ Gaertn.) [3]. Главными компонентами силимарина являются флаволигнаны силибин (рис. 2 а) и силидианин (рис. 2 б).

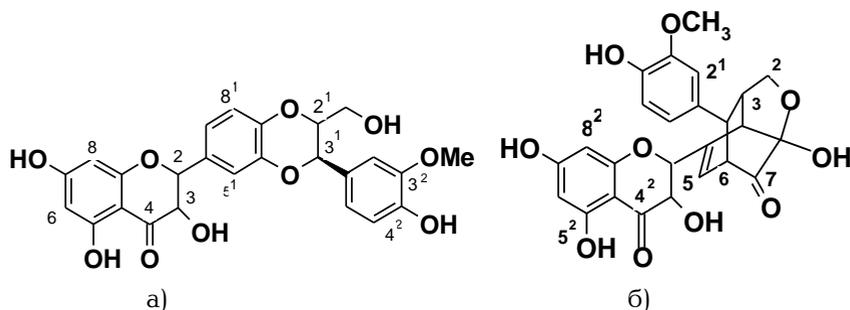


Рис. 2. Компоненты силимарина: а) силибин, б) силидианин.

В плодах маклюры оранжевой (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.) содержатся биологически активные пренилированные изофлавоноиды осаин и помиферин (рис.3). Настойки, получаемые из плодов, используются в народной медицине для лечения широкого спектра болезней, а плоды маклюры служат сырьем для приготовления также различных лечебных мазей.

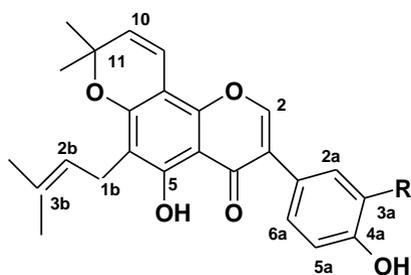


Рис. 3. Структурная формула осaina (R=H) и помиферина (R=OH).

Известно, что флавоноидные соединения, благодаря содержанию в своей структуре фенольных гидроксильных групп, обладают антиоксидантной, антирадикальной активностью, обуславливающей широкий спектр их лечебных свойств. Представлялось интересным и целесообразным провести сравнение антирадикальной активности выделенных нами ранее фламина [2], силимарина [3] и смеси осайн-помиферин [4].

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Для исследования антирадикальной активности в качестве испытуемых веществ использовались фламин, полученный из цветков бессмертника красноватого, растущего в Армении, силимарин, выделенный из семян расторопши пятнистой, собранных в Арцахе, помиферин и смесь осайн и помиферина, полученных из плодов дерева маклюры оранжевой, интродуцированной в Ереване, а также смесь силимарина и фламина.

Для измерения антирадикальной активности использован ранее описанный спектрофотометрический метод [5]. Определения проводились спектрофотометром "Helios (Termo Electron corp.)" при длине волны 515 нм. В качестве свободного радикала использовался 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, Sigma Aldrich GmbH, M=394). Для приготовления растворов использовался дважды перегнанный, высушенный молекулярными ситами, абсолютный метанол.

Испытуемые вещества изучались тремя группами в разные дни.

Известно, что между концентрацией и оптической плотностью вещества существует линейная зависимость [6], поэтому для корреляционных расчетов были использованы два метанольных раствора с известными концентрациями ДФПГ (20×10^{-5} и 2×10^{-5} г/л), а для расчетов уравнений корреляционных прямых применяли уравнение прямой по координатам двух точек [7]. Так как для корреляции использовалась зависимость концентрации (С, ось Y) от оптической плотности (D, ось X), то в нашем случае уравнение выглядит следующим образом:

$$\frac{D - D_1}{D_2 - D_1} = \frac{C - C_1}{C_2 - C_1},$$

где D_1 – оптическая плотность раствора ДФПГ с концентрацией 2×10^{-5} г/л (C_1); D_2 – оптическая плотность раствора ДФПГ с концентрацией 20×10^{-5} г/л (C_2); D – измеренная оптическая плотность метанольного раствора смеси ДФПГ с испытуемыми образцами; C – рассчитанная величина концентрации, соответствующей оптической плотности D .

Вставив определенные нами оптические плотности для метанольных растворов 20×10^{-5} и 2×10^{-5} г/л в уравнение, мы получили упрощенное уравнение калибровочной прямой:

$$C = \left(\frac{18 \cdot D}{D_2 - D_1} - \frac{18 \cdot D_1}{D_2 - D_1} + 2 \right) \cdot 10^{-5} \quad (1)$$

Далее рассчитывались корреляционные уравнения для каждой группы веществ, определялись концентрации остаточного количества ДФПГ в смесях (C), на основе которых – активности испытуемых веществ в процентах (A).

$$A = 100 - \frac{C \cdot 100}{20 \cdot 10^{-5}}, \quad (2)$$

Определение антирадикальной активности

Для приготовления ДФПГ в метаноле с концентрацией 20×10^{-5} г/л растворили 2 мг ДФПГ в 100 мл абсолютного метанола, и по методике [5] на каждый исследуемый образец брали по 2 мл полученного раствора.

Для корреляционного перерасчета к 1 мл раствора ДФПГ концентрации 20×10^{-5} г/л добавлено 9 мл метанола, приготовлено 10 мл раствора с концентрацией ДФПГ 2×10^{-5} г/л, измерена оптическая плотность исходного и разбавленного растворов при 515 нм (табл. 1).

Таблица 1

Данные для расчетов корреляций

Смесь силимарина и фламина		Помиферин, смесь осаина и помиферина		Фламин и силимарин	
концентрация ДФПГ, ($\times 10^{-5}$ г/л)	оптическая плотность	концентрация ДФПГ, ($\times 10^{-5}$ г/л)	оптическая плотность	концентрация ДФПГ, ($\times 10^{-5}$ г/л)	оптическая плотность
20	0.496	20	0.348	20	0.404
2	0.084	2	0.068	2	0.071

На основе данных табл. 1 и уравнения (1) были рассчитаны корреляционные уравнения зависимости концентраций ДФПГ от оптической плотности.

Для исследования были взвешены (с точностью до 0.1 мг) 1 и 3 мг помиферина, 1 и 3 мг осаина, смеси осаина и помиферина (по 1 и по 3 мг), 3 мг силимарина, 3 мг фламина, а также смеси силимарина с фламином (по 1 и по 3 мг). Навески каждого образца были растворены в 10 мл метанола; из растворов брали по 0.1 мл, смешивали с 2 мл раствора ДФПГ с концентрацией 20×10^{-5} г/л, и измеряли оптическую плотность каждой полученной смеси через 1, 5, 20 мин до неизменности величины плотности (до "плато").

Исходя из полученных данных оптической плотности по корреляционным уравнениям рассчитывались соответствующие концентрации ДФПГ и антирадикальная активность образцов, выраженная в процентах по формуле (2).

Результаты и их обсуждение

Исходя из данных табл. 1 рассчитанные уравнения корреляционных прямых имеют следующий вид:

$$C = (43.6893204 \cdot D - 1.66990291) \cdot 10^{-5} \text{ (для смесей силимарина с фламином)}$$

$$C = (54.0540541 \cdot D - 1.83783784) \cdot 10^{-5} \text{ (для фламина и силимарина)}$$

$$C = (64.2857143 \cdot D - 2.37142857) \cdot 10^{-5} \text{ (для помиф. и смесей осаина с помиферином)}$$

Испытания осаина как в дозе 1, так и 3 мг не выявили уменьшения концентрации ДФПГ.

Результаты измерений оптической плотности смесей испытуемых образцов с ДФПГ в зависимости от времени, концентрации, рассчитанные с помощью соответствующих корреляционных уравнений, а также соответствующие проценты активности образцов представлены в табл. 2а, 2б и 2в.

Таблица 2а

Результаты исследования фламина и силимарина

		Время, мин		
		1	5	20
Фламин 3 мг	D	0.222	0.182	0.155
	$C \times 10^{-5}$, г/л	10.162	8	6.541
	АРА, %	49.189	60	67.297
Силимарин 3 мг	D	0.357	0.311	0.286
	$C \times 10^{-5}$, г/л	17.459	14.973	13.622
	АРА, %	12.703	25.135	31.892

Результаты исследования смесей фламина и силимарина

		Время, мин		
		1	5	20
1 мг + 1 мг	D	0.341	0.328	0.317
	$C \times 10^{-5}$, г/л	13.228	12.660	12.180
	АРА, %	33.859	36.699	39.102
3 мг + 3 мг	D	0.259	0.22	0.203
	$C \times 10^{-5}$, г/л	9.646	7.942	7.199
	АРА, %	51.772	60.291	64.005

Таблица 26

Результаты исследования помиферина и смесей осаина с помиферином

		Время, мин					Время, мин		
		1	5	20			1	5	20
Помиф. 1 мг	D	0.193	0.132	0.132	1 мг + 1 мг	D	0.221	0.131	0.131
	$C \times 10^{-5}$, г/л	10.036	6.114	6.114		$C \times 10^{-5}$, г/л	11.836	6.05	6.05
	АРА, %	49.821	69.429	69.429		АРА, %	40.821	69.75	69.75
Помиф. 3 мг	D	0.227	0.112	0.112	3 мг + 3 мг	D	0.053	0.053	0.053
	$C \times 10^{-5}$, г/л	12.221	4.829	4.829		$C \times 10^{-5}$, г/л	1.036	1.036	1.036
	АРА, %	38.893	75.857	75.857		АРА, %	94.821	94.821	94.821

Из данных таблиц однозначно видно, что фламин превосходит по своей активности как индивидуальный силимарин, так и смесь силимарина с фламином. Показано, что из испытанных флавоноидных соединений наиболее эффективным антирадикальным свойством обладает помиферин, действие которого проявляется быстро и потенцируется примесью осаина, хотя сам осаин не выявил антирадикальную активность.

Наиболее наглядно вышесказанное отражается на графике фиксации антирадикальной активности (рис. 4). График четко показывает достижение "плато" сразу, в течение минуты в случае смеси помиферина с осаином (по 3 мг, активность 94.8%), и на пятой минуте в случае помиферина 3 мг (активность 75.9%), а также помиферина 1 мг (активность 69.4%), смеси осаина и помиферина (по 1 мг, активность 69.8%). Остальные образцы достигают плато к 20 минуте, причем смесь силимарина с фламином (по 1 мг, активность 39.1%) и 3 мг силимарина (активность 31.9%) проявляют низкую активность.

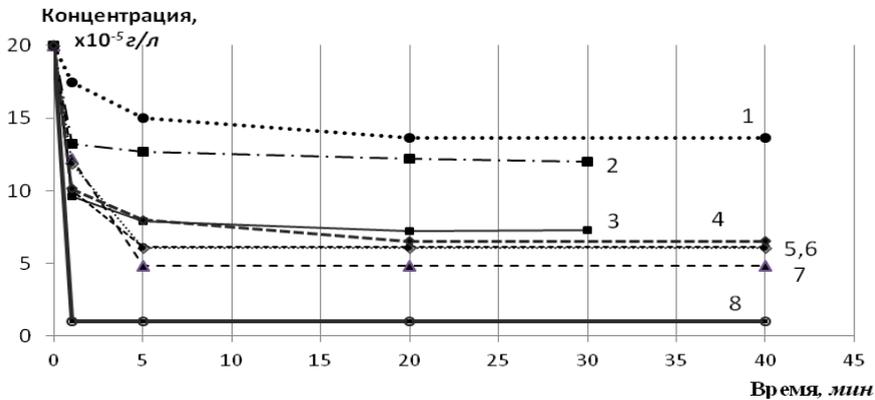


Рис. 4. График фиксации антирадикальной активности: 1 – силимарина (3 мг); 2 – смеси силимарина с фламином (1 мг); 3 – смеси силимарина с фламином (3 мг); 4 – фламина (3 мг); 5 – помиферина (1 мг); 6 – смеси осаина с помиферином (1 мг); 7 – помиферина (3 мг); 8 – смеси осаина с помиферином (3 мг).

На основе полученных результатов можно сделать следующие выводы. Из изученных в данной работе флавоноидных соединений только осаин лишен антирадикальной активности, в то время как другой пре-нилированный изофлавоон маклюры (помиферин) является наиболее активным и быстродействующим антирадикальным соединением. Показано, что фламин уступает по активности помиферину, и его максимальная активность наступает на 20-ой минуте, а также проявляет бóльшую активность, чем силимарин и смеси силимарина с фламином. Предполагается, что смесь осаина с помиферином потенцирует антирадикальную активность помиферина.

ՄԱՎՆՈՒՐԱ ՆԱՐՆՋԱԳՈՒՅՆԻ, ԿԱԹՆԱՓՈՒՇ ՊՈՒՏԱՎՈՐԻ ՊՏՈՒՂՆԵՐԻ ԵՎ ԱՆԹՈՒՍՄ ԿԱՐՄՐԱՎՈՒՆԻ ԾԱՂԿԱԶԱՄԲՅՈՒՂՆԵՐԻ ԾԼԱՎՈՆՈՒԴԱՅԻՆ ԲԱՂԱԴՐԻՉՆԵՐԻ ՆԱԿԱՌԱԴԻԿԱԼԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՆԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄ

Ն. Ս. ԱՆԱՆԻԿՅԱՆ

Աշխատանքի նպատակն էր համեմատել մակլուրա նարնջագույնի և կաթնափուշ պուտավորի պտուղների, ինչպես նաև անթառամ կարմրավունի ծաղկազամբյուղների ֆլավոնոիդային բաղադրիչների հակառադիկալային ակտիվությունը: Հետազոտությունները իրականացվել են սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով, որպես ազատ ռադիկալ օգտագործվել է 2,2-դիֆենիլ-1-պիրիլի՛հիդրազիլը: Արդյունքում ցույց է տրվել, որ պրենիլացված իզոֆլավոն պոմիֆերինը և դրա խառնուրդը մակլուրայի պտղի կազմի մեջ մտնող այլ պրենիլացված իզոֆլավոն օսաինի հետ ցուցաբերում են ավելի բարձր հակառադիկալային ակտիվություն, քան մնացած ուսումնասիրված բոլոր օրինակները:

COMPARATIVE ANTIRADICAL ACTIVITY ANALYSIS OF FLAVONOIDAL COMPOUNDS OF MACLURA POMIFERA, SILYBUM MARIANUM FRUITS AND HELICHRYSUM RUBICUNDUM FLOWERS

H. S. ANANIYAN

The Scientific Technological Center of Organic
and Pharmaceutical Chemistry NAS RA
A.L. Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry
26, Azatutyan Str., Yerevan, 0014, Armenia
Tel. + 37410281754, E-mail: hrach63@mail.ru
National Polytechnic University of Armenia
105, Teryan Str., Yerevan, 0009, Armenia

The aim of this work was a comparative investigation of antiradical activity of flavonoidal components of *Maclura pomifera*, *Silybum marianum* fruits and *Helichrysum rubicundum* flowers. The comparison was realized by spectrophotometric method, as free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was used. It is shown that prenyl isoflavone pomiferin and its mixture with other isoflavone osain have better antiradical activity than other studied samples.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Патент Российской Федерации номер: 2071341. Способ получения фламина. *Заболотный В.А., Емельянова В.И., Супрун О.В., Бренина Е.А., Зубченко Т.Н., Комиссаренко Е.П.* Опубл. 10.01.1997.
- [2] *Ананикян Г.С., Оганесян Г.П., Мнацаканян В.А.* // Вестник ГИУА, Ереван, 2015, ч.2, с. 663.
- [3] *Ананикян Г.С., Мнацаканян В.А., Паносян Г.А., Саргисян С.А.* // Хим.ж. Армении, 2015, т. 68, №1, с. 51.
- [4] *Ананикян Г.С., Ананикян В. В., Ерибекян М.И., Мнацаканян В.А., Паносян Г.А.* // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2015, №9, с. 673.
- [5] *Sánchez-Moreno C., Larrauri J., Saura-Calixto F.* // Journ.Sci.Food.Agric., 1998, v. 76, p. 70.
- [6] *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика, М., Мир, 1976, 541 с.
- [7] *Привалов И.* Аналитическая геометрия, М., Наука, 1966, 272 с.