

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.35+615.32

**Антиоксидантная активность некоторых водных экстрактов, применяемых в традиционной китайской медицине**А.А. Байжуманов<sup>1</sup>, \* , Л. Май<sup>2</sup>, А.И. Юсипович<sup>1</sup> , Г.В. Максимов<sup>1</sup><sup>1</sup>Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>биологический факультет, Университет МГУ–ППИ в Шэньчжэнь, Китай, 518172, провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, район Лунган, ул. Жуи, д. 299

\*e-mail: adilbayzhumanov@biophys.msu.ru

В 2020 г. Министерство здравоохранения Китая внесло *Dendrobium officinale*, *Ganoderma lucidum*, *Gastrodia elata*, *Cornus officinalis*, *Eucommiae ulmoides*, *Cistanche deserticola*, *Astragalus membranaceus*, *Panax quinquefolium* и *Codonopsis pilosula* в список разрешенного к применению лекарственного растительного сырья. Установлено, что водные экстракты *E. ulmoides*, *C. deserticola* и *C. officinalis* обладают наиболее высокими значениями общей антиоксидантной активности, а экстракты *G. elata* и *D. officinale* были наименее эффективны. Проведенный регрессионный анализ показал корреляцию между суммарным содержанием фенольных соединений в экстрактах и общей антиоксидантной активностью ( $r=0,67$ ,  $p=0,039$ ). Во всех использованных тест-системах наиболее эффективными антиоксидантными свойствами обладал экстракт *E. ulmoides*.

**Ключевые слова:** традиционные средства китайской медицины, водные экстракты, антиоксидантная активность, фенольные соединения, окислительный стресс, активные формы кислорода, свободные радикалы

Современные фармакологические исследования показывают, что окислительный стресс может приводить к различным патологическим состояниям и заболеваниям, таким как старение, рак, гипертония, болезнь Паркинсона, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и др. [1]. Фрукты, овощи и травы, а также их производные содержат большое количество фенольных соединений, которые способны улавливать свободные радикалы, а также хелатировать ионы железа и меди, уменьшая, тем самым, окислительный стресс. Так, эпидемиологические исследования показали, что риск инфаркта миокарда имеет обратную зависимость от потребления чая и вина, содержащих много полифенолов [2], а риск смерти от ишемической болезни сердца у женщин в постменопаузе и болезнь Паркинсона имеют отрицательную корреляцию с употреблением витамина Е [3, 4]. Также существуют данные, что продукты, богатые ликопином, могут помочь в лечении патологий печени [5].

Многие лекарственные растения традиционной китайской медицины проявляют антиоксидантную активность [7]. Так, например, в работе В. Чжэна и Ш.Ю. Ван [6] была показана антиоксидантную активность 12 лекарственных и 27 пищевых растений.

В 2012 г. министерство здравоохранения Китая опубликовало список из 86 широко используе-

мых препаратов традиционной китайской медицины (ТКМ) природного происхождения. В 2014 г. в этот список были добавлены еще 15 препаратов ТКМ на основе растительного и животного сырья, а также грибов. В январе 2020 г. в список добавлено 9 препаратов ТКМ из растительного сырья на основе *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, *Ganoderma lucidum* Karst, *Gastrodia elata* Blume, *Cornus officinalis* Torr. ex Dur., *Eucommiae ulmoides* Oliv., *Cistanche deserticola* Ma, *Astragalus membranaceus* Moench, *Panax quinquefolium* L., *Codonopsis pilosula* Franch.

Целью нашей работы стала оценка антиоксидантной активности 9 водных экстрактов растительного сырья, применяемого в ТКМ: *D. officinale*, *G. lucidum*, *G. elata*, *C. officinalis*, *E. ulmoides*, *C. deserticola*, *A. membranaceus*, *P. quinquefolium*, *C. pilosula*.

**Материалы и методы**

**Приготовление водных экстрактов средств ТКМ.** Все сухие образцы сырья ТКМ, кроме *E. ulmoides*, были приобретены в сертифицированных аптеках Beijing Tong-Ren-Tang (Шэньчжэнь, Китай). *E. ulmoides* была куплена в аптеке Ali Health (Китай). Экстракты готовили по методике, описанной ранее [7]. Для приготовления водных экстрактов мы использовали сухие препараты стебля *D. officinale* и *A. membranaceus*, склероция

*G. lucidum*, корневища *G. elata*, ягод *C. officinalis*, листьев *E. ulmoides*, корней *C. deserticola*, *P. quinquefolius* и *C. pilosula*. Сухие образцы сырья предварительно измельчали, а затем растирали в ступках в мелкий порошок. Для получения водного экстракта 0,25 г порошка сырья ТКМ смешивали с 5 мл деионизированной воды, затем экстрагировали на водяной бане при встряхивании при 80 °С в течение 30 мин. Настой охлаждали до комнатной температуры и затем центрифугировали в течение 10 мин, супернатант пропускали через фильтр Millipore (Merck KGaA, Германия) с размером пор 0,45 мкм. Фильтрат хранили в холодильнике при 4 °С и все показатели измеряли в течение одних суток после экстракции.

**Определение суммарного содержания водорастворимых фенолов.** Общее содержание фенольных соединений определяли по методике с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [8]. 0,05 мл водного экстракта образца смешивали с 0,5 мл 0,2 N реактива Фолина-Чокальтеу (Sigma-Aldrich, США). Смесь встряхивали в течение 1 мин. После инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре к смеси добавляли 0,4 мл 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и снова встряхивали. После инкубации смеси в течение 15 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре модель Hitachi 556 (Hitachi, Япония) при длине волны 765 нм. В качестве калибровочного раствора использовали растворы хлорогеновой кислоты с концентрациями от 0 до 250 мкг/мл. Общее содержание фенольных соединений в водных экстрактах выражали в мкг хлорогеновой кислоты/мл экстракта.

**Определение общей антиоксидантной активности.** Общую антиоксидантную активность водных экстрактов оценивали по образованию окрашенного комплекса восстановленного железа с 2,4,6-трипиредилтриазином [9].

Ранее [10] было показано, что часовая инкубация плазмы крови с различными концентрациями растворов двухвалентного железа и перекиси водорода при температуре 37 °С вызывает накопление конечных продуктов перекисного окисления липидов, которое можно оценить по уровню реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). ТБК-активные продукты определяли по методу, опубликованному ранее [11].

Для запуска процесса пероксидации в плазме крови в течение 1 ч при 37 °С инкубировали реакционную смесь 1, которая состояла из 100 мкл плазмы крови, 50 мкл деионизированной воды, 15 мкл 0,88 M раствора пероксида водорода и 15 мкл 1 mM раствора  $\text{FeSO}_4$  (опыт), и реакционную смесь 2, которая состояла из 100 мкл плазмы и 80 мкл деионизированной воды (контроль 1). Сразу после инкубации приступали к определению ТБК-активных продуктов. Кроме этого, количество ТБК-активных продуктов определяли сразу после добавления в реакционную смесь, со-

стоящую из 100 мкл плазмы крови и 50 мкл деионизированной воды, 15 мкл 0,88 M раствора пероксида водорода и 15 мкл 1 mM раствора  $\text{FeSO}_4$  (контроль 2). Для определения антиоксидантной активности в реакционную смесь вместо 50 мкл воды вносили 50 мкл испытуемого водного экстракта сырья ТКМ.

Измерение оптического поглощения проводили на спектрофотометре Hitachi 556 (Hitachi, Япония) при длине волны 532 нм. Каждое измерение проводили в трех повторностях. Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитывали на основе коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида и выражали в нмолях/мл плазмы.

**Оценка антиоксидантной активности водных экстрактов сырья ТКМ методом хемилюминесценции.** Хемилюминесценцию, индуцированную реакцией Фентона, измеряли с помощью люминометра Люм-1 (Люмтек, Россия) с 4–5 повторами. Сигнал люминесценции измеряли каждые 10 с и выражали в относительных единицах. Ход измерения: в кювету с 0,1 мл раствора 1 mM  $\text{FeSO}_4$  добавляли 0,05 мл 3%-ного пероксида водорода и начинали регистрацию сигнала люминесценции. Через 40 с после старта реакции в кювету добавляли 10 мкл дистиллированной воды (реакция Фентона) или 10 мкл водного экстракта и после добавления продолжали измерять кинетику хемилюминесценции в течение 70 с.

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с использованием демоверсии программы GraphPad Prism v. 8.1 (GraphPad Software Inc., США). Полученные результаты в тексте представлены как медиана [нижняя квартиль; верхняя квартиль]. Достоверность различий между группами, оценивали при помощи теста Краскала–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна ( $p < 0,05$ ); для оценки достоверности различий между группами при измерении кинетики изменения интенсивности хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона, после добавления водных экстрактов ТКМ, оценивали при помощи теста Фридмана с последующим апостериорным тестом Данна ( $p < 0,05$ ). Оценку корреляций проводили с помощью коэффициента корреляции Спирмена ( $p < 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

В работе использовались водные экстракты сухих препаратов исследуемых растений, это было обусловлено тем, что в ТКМ эти средства традиционно используют в виде лечебных настоев и отваров, что позволило оценивать антиоксидантную активность растительного сырья в условиях, сходных с условиями их использования в виде лекарственных препаратов.

В экстрактах растений и грибов антиоксидантами в основном являются различные фе-

нольные соединения. Суммарное содержание фенольных соединений в водных экстрактах растений ТКМ сильно различалось, в пределах от 131,56 до 1258,52 мкг хлорогеновой кислоты/мл образца (рис. 1А). У *E. ulmoides* было самое высокое содержание фенолов (1259,0 [1248,0; 1269,0] мкг/мл), за ним следовал *C. officinalis* (948,2 [933,3; 963,0] мкг/мл). Среди отобранных образцов *G. lucidum* и *D. officinale* имели самое низкое содержание фенольных соединений (132,2 [128,5; 134,3] мкг/мл и 266,7 [260,7; 280,0] мкг/мл соответственно).

На рис. 1Б показано, что общая антиоксидантная активность образцов увеличивается в следующем порядке: *G. elata* < *D. officinale* < *A. membranaceus* < *G. lucidum* < *C. pilosula* < *P. quinquefolius* < *C. officinalis* < *C. deserticola* < *E. ulmoides*.

Водные экстракты *E. ulmoides* показывают самое высокое значение общей антиоксидантной активности (6353,0 [5953,0; 6471,0] мкмоль  $Fe^{2+}$ /л). Образцы *C. deserticola* и *C. officinalis* также показали значительную антиоксидантную активность (4113,0 [3859,0; 4132,0] и 2946,0 [2936,0; 3548,0] мкмоль  $Fe^{2+}$ /л). Значения общей антиоксидантной активности у образцов *G. elata*

и *D. officinale* были самыми низкими (88,2 [78,8; 117,6] и 195,3 [176,5; 221,2] мкмоль  $Fe^{2+}$ /л соответственно). Образцы *P. quinquefolius*, *C. pilosula*, *G. lucidum*, *A. membranaceus* слабо отличались друг от друга по своей антиоксидантной активности.

Проведенный регрессионный анализ обнаружил корреляцию между суммарным содержанием фенольных соединений в образце и общей антиоксидантной активностью, значение коэффициента Спирмена ( $r$ ) составляет 0,67 ( $p=0,039$ ). Этот результат согласуется с результатами предыдущих исследований, согласно которым фенольные соединения во многом определяют антиоксидантные свойства лекарственных растений ТКМ [7]. Фенольные соединения состоят из одного или нескольких ароматических колец, содержащих одну или несколько гидроксильных групп. Гидроксильные группы могут гасить свободные радикалы путем образования резонансно-стабилизированных феноксильных радикалов [12].

Для оценки влияния исследуемых экстрактов на процессы перекисного окисления липидов изучили их способность предотвращать окислительную деградацию липидов в плазме крови при реакции Фентона. На рис. 2А показано, что часовая инкубация плазмы крови при 37 °С с перок-

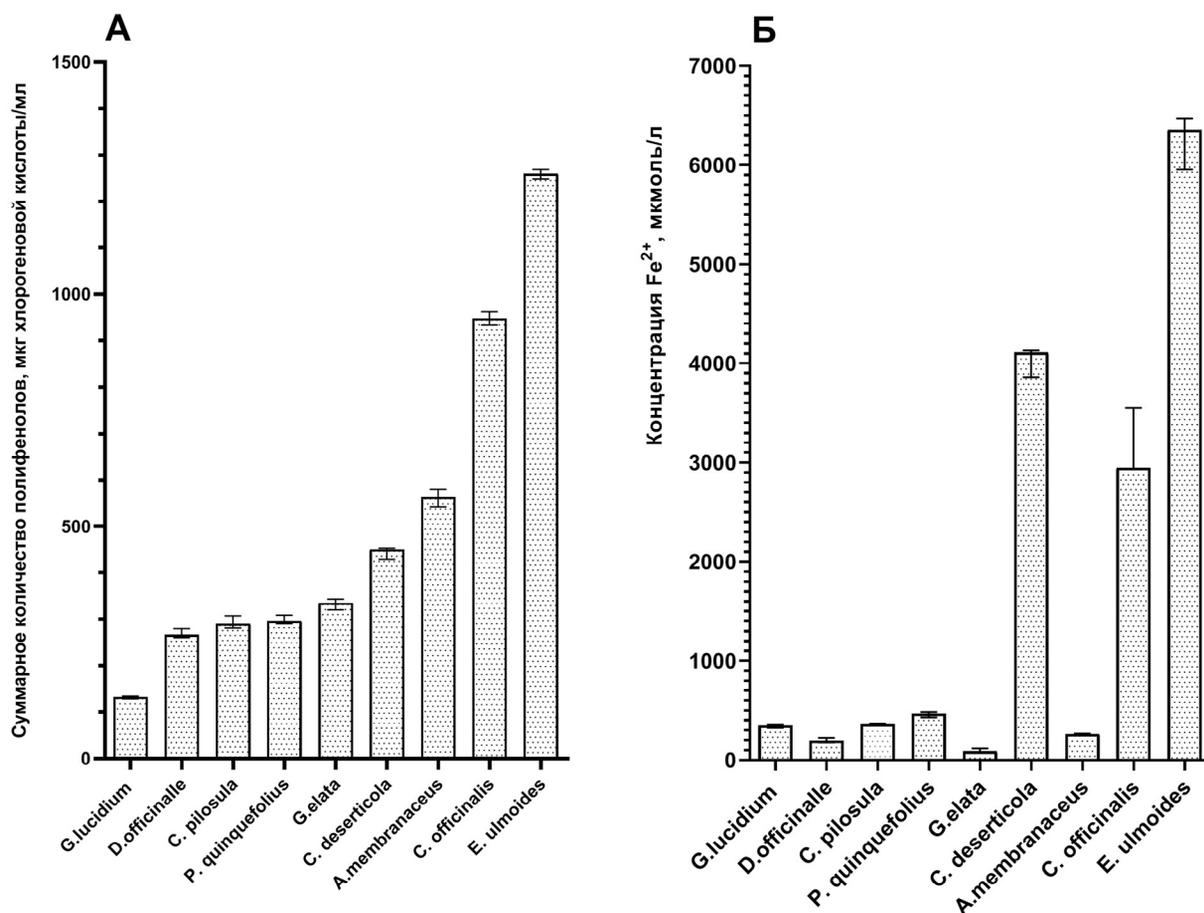


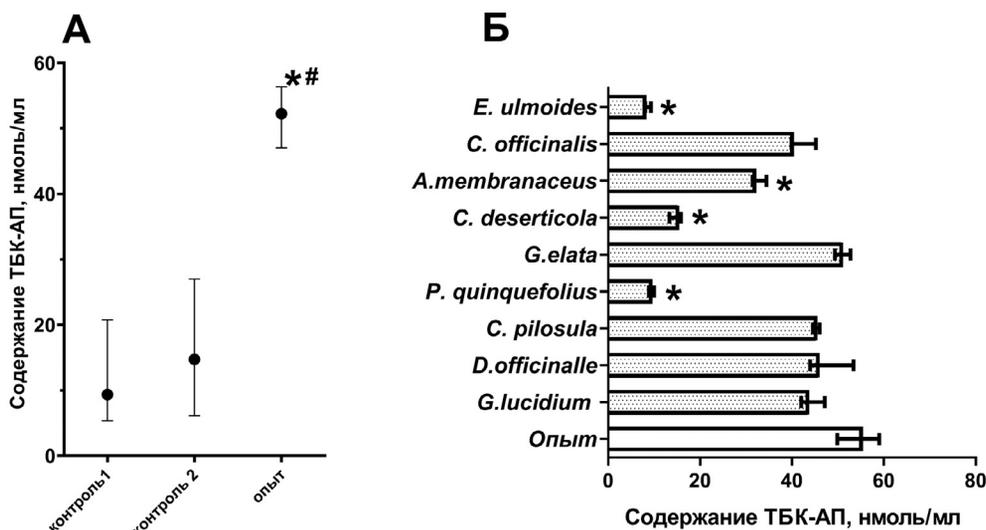
Рис. 1. Оценка суммарного количества полифенолов и общей антиоксидантной активности в водных экстрактах средств традиционной китайской медицины. А – суммарное количество полифенолов в водных экстрактах средств ТКМ; Б – общая антиоксидантная активность в водных экстрактах средств ТКМ.

сидом водорода и раствором FeSO<sub>4</sub> (в конечной концентрации 7,3 мМ и 8,3 мкМ соответственно) в 2,5 раза увеличивает количество ТБК-активных продуктов по сравнению с образцами, которые инкубировались без перекиси и раствора FeSO<sub>4</sub> (контроль 1), и образцами, в которых ТБК-активные продукты измеряли сразу после добавления в плазму перекиси водорода и раствора FeSO<sub>4</sub> (контроль 2) без инкубации.

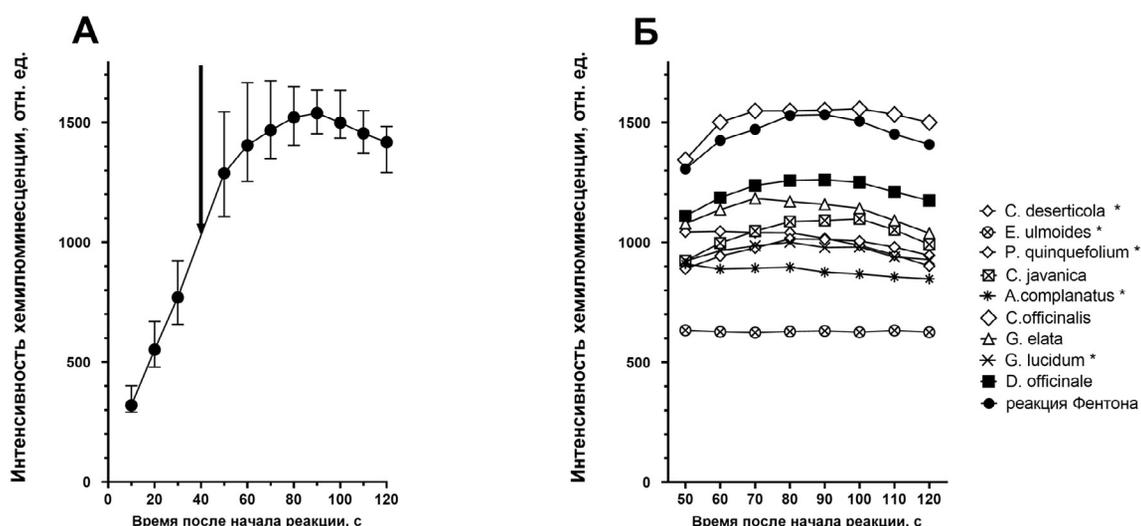
На рис. 2Б показано, что добавление в инкубационную среду экстрактов *E. ulmoides*, *C. deserticola* и *P. quinquefolius* ингибирует накопле-

ние ТБК-активных продуктов. Добавление других исследуемых водных экстрактов растений не приводило к значимому эффекту.

На данный момент не существует методов, которые давали бы полную информацию о состоянии и взаимодействиях сложных систем, в которых образуются и вступают в реакции антиоксиданты. В связи с этим в данной работе дополнительно оценили общую антиоксидантную активность по хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона. На рис. 3А показано, что после добавления в кювету с 1 мМ FeSO<sub>4</sub>



**Рис. 2.** Оценка антиоксидантной активности водных экстрактов средств традиционной китайской медицины по их способности ингибировать накопление ТБК-активных продуктов в плазме крови, индуцированное реакцией Фентона. **А** – накопление ТБК-активных продуктов через час после запуска реакции Фентона (опыт), в контроле 1 реакцию не запускали, в контроле 2 ТБК-активные продукты измеряли сразу после запуска реакции; **Б** – накопление ТБК-активных продуктов в плазме крови, индуцированное реакцией Фентона, без (опыт) и после добавления экстрактов средств ТКМ; Астериски (\*#) – достоверные различия между группами (для А: \* – контроль 1 и опыт, # – контроль 2 и опыт; для Б – опыт и с добавлением экстрактов соответственно), различия оценивали используя тест Краскела–Уоллеса с последующим апостериорным тестом Данна ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** Оценка антиоксидантной способности водных экстрактов средств традиционной китайской медицины по хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона. Данные представлены как медиана + интерквартильный размах (А) и медиана (Б). **А** – кинетика изменения интенсивности хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона, стрелкой обозначено время внесения воды или экстрактов средств ТКМ; **Б** – кинетика изменения интенсивности хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона, после добавления водных экстрактов средств ТКМ. Астериски (\*) – достоверные различия между группами, различия оценивали, используя тест Фризмана с последующим апостериорным тестом Данна ( $p < 0,05$ ).

(рН 2) раствора 3%-ного пероксида водорода возможно регистрировать сигнал хемилюминесценции. Спектральный диапазон чувствительности фотоэлектронного умножителя составляет 400–700 нм, а в этой области из возможных продуктов, образующихся при инициации реакции Фентона, может высвечиваться только димер синглетного кислорода ( $\lambda = 480, 535$  и  $580$  нм) [13].

Установлено, что водные экстракты 8 образцов, за исключением *C. officinalis*, в различной степени вызывают эффект ингибирования реакции Фентона. Интенсивность хемилюминесценции после добавления экстрактов *G. lucidum*, *E. ulmoides*, *A. membranaceus*, *P. quinquefolius* и *C. pilosula* значительно отличалась от интенсивности хемилюминесценции при реакции Фентона (рис. 3Б). Эти эффекты могут быть связаны с тем, что антиоксиданты, содержащиеся в экстрактах, могут выступать и как тушители свободных радикалов, и как хелаторы ионов двухвалентного железа.

Таким образом, определено суммарное количество фенольных соединений и изучены антиоксидантные свойства 9 экстрактов ТКМ, изучены

их общая антиоксидантная активность, а также способность ингибировать процесс перекисного окисления липидов и хемилюминесценции, индуцированных реакцией Фентона. При сравнении их антиоксидантной активности наиболее перспективным источником антиоксидантов проявил себя водный экстракт *E. ulmoides*. Об антиоксидантных свойствах коры *E. ulmoides* известно из литературных данных, нами же показано, что и экстракты листьев этого растения могут быть богатым источником антиоксидантов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Инновационного комитета науки и технологии города Шэнчжень, КНР (грант № 20200828172651001), а также при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» и в рамках государственного задания МГУ (проект № 121032500076-1).

Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. Oxidative stress: Harms and benefits for human health // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017. Vol. 2017: 8416763.
- Fraga C.G., Croft K.D., Kennedy D.O., Tomás-Barberán F.A. The effects of polyphenols and other bioactives on human health // *Food Funct.* 2019. Vol. 10. N 2. P. 514–528.
- Kushi L.H., Folsom A.R., Prineas R.J., Mink P.J., Wu Y., Bostick R.M. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women // *N. Engl. J. Med.* 1996. Vol. 334. N 18 P. 1156–1162.
- Park H.A., Ellis A.C. Dietary antioxidants and Parkinson's disease // *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 2020. Vol. 9. N 7: 570.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005. Vol. 45 N 4. P. 287–306.
- Zheng W., Wang S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs // *J. Agric. Food Chem.* 2001. Vol. 49. N 11. P. 5165–5170.
- He F., Chen J., Dong K., Leng Y., Xu J., Hu P., Yao Y., Xiong J., Pei X. Multi-technical analysis on the antioxidative capacity and total phenol contents of 94 traditional Chinese dietary medicinal herbs // *Food Sci. Nutr.* 2018. Vol. 6. N 6. P. 1358–1369.
- Garjani A., Tila D., Hamedeyazdan S., Vaez H., Rameshrad M., Pashaii M., Fathiazad F. An investigation on cardioprotective potential of *Marrubium vulgare* aqueous fraction against ischaemia-reperfusion injury in isolated rat heart // *Folia Morphol. (Warsz).* 2017. Vol. 76. N 3. P. 361–371.
- Pankratova M.S., Baizhumanov A.A., Yusipovich A.I., Faassen M., Shiryayeva T.Y., Peterkova V.A., Kovalenko S.S., Kazakova T.A., Maksimov G.V. Imbalance in the blood antioxidant system in growth hormone-deficient children before and after 1 year of recombinant growth hormone therapy // *PeerJ.* 2015: e1055
- Agil A., Fuller C.J., Jialal I. Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediated oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction // *Clin. Chem.* 1995. Vol. 41. N 2. P. 220–225
- Матюлько И.С., Байжуманов А.А., Хиразова Е.Э., Маслова М.В. Влияние различных режимов пищевой депривации на систему антиоксидантной защиты крови и поведенческую активность крыс // *Журн. мед.-биол. исслед.* 2018. Т. 6. № 3. С. 254–261.
- Ramkisson J.S., Mahomoodally M.F., Ahmed N., Subratty A.H. Relationship between total phenolic content, antioxidant potential, and antiglycation abilities of common culinary herbs and spices // *J. Med. Food.* 2012. Vol. 15. N 12. P. 1116–1123.
- Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Усп. биол. химии.* 2009. Т. 49. № 7. С. 341–388.

Поступила в редакцию 03.09.2021

После доработки 30.11.2021

Принята в печать 20.12.2021

## RESEARCH ARTICLE

## Antioxidant activity of certain aquatic extracts used in traditional Chinese medicine

A.A. Bayzhumanov<sup>1,\*</sup> , L. Mai<sup>2</sup>, A.I. Yusipovich<sup>1</sup> , G.V. Maksimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>School of Biology, Shenzhen MSU–BIT University,  
Ruyi Rd. 299, Longgang district, 518172, Shenzhen, Guangdong province, China

\*e-mail: [adilbayzhumanov@biophys.msu.ru](mailto:adilbayzhumanov@biophys.msu.ru)

In 2020, the Ministry of Health of China added *Dendrobium officinale*, *Ganoderma lucidum*, *Gastrodia elata*, *Cornus officinalis*, *Eucommiae ulmoides*, *Cistanche deserticola*, *Astragalus membranaceus*, *Panax quinquefolium*, *Codonopsis pilosula* to the list of approved medicinal plant raw materials. It was found that aqueous extracts of *E. ulmoides*, *C. deserticola* and *C. officinalis* have the overall values of the total antioxidant activity; and *G. elata* and *D. officinale* extracts were the least efficient among all tested plants. The performed regression analysis showed a correlation between the total content of phenolic compounds in the extracts and the total antioxidant activity ( $r=0.67$ ,  $p=0.039$ ). In all used test systems, *E. ulmoides* extract had the most effective antioxidant properties.

**Keywords:** *traditional Chinese medicine, water extracts, antioxidant activity, phenolic compounds, oxidative stress, reactive oxygen species, free radicals*

**Funding:** The research was funded by Shenzhen Science and Technology Innovation Committee (People's Republic of China), project number 20200828172651001; also, this study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032500076-1, by Russian the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology”.

### Сведения об авторах

*Байжуманов Адиль Ануарович* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: [adilbayzhumanov@biophys.msu.ru](mailto:adilbayzhumanov@biophys.msu.ru)

*Май Лиша* – аспирант биологического факультета Университета МГУ–ППИ в Шэньчжэне. Тел.: (0755) 8989 2372; e-mail: [mailisha18@163.com](mailto:mailisha18@163.com)

*Юсипович Александр Иванович* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: [yusipovich@biophys.msu.ru](mailto:yusipovich@biophys.msu.ru)

*Максимов Георгий Владимирович* – докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: [gmaksimov@mail.ru](mailto:gmaksimov@mail.ru)