

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
ЭКСТРАКТОВ СОЦВЕТИЙ *TAGETES PATULA L.*

О.В. АСТАФЬЕВА, З.В. ЖАРКОВА, Г.Н. ГЕНАТУЛЛИНА

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России,
ул. Бакинская, д. 121, г. Астрахань, 414000, Россия, e-mail: rescenter@bk.ru

Аннотация. В настоящее время актуальным остается поиск источников веществ с антиоксидантными свойствами. Известными природными антиоксидантами являются фенольные соединения, в частности флавоноиды, способные нейтрализовать свободные радикалы. **Цель исследования** – определение фенольных компонентов и исследование антиоксидантной активности экстрактов соцветий бархатцев распростертых *Tagetes patula L.*, произрастающих на территории Астраханской области. **Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлись соцветия декоративных растений *T. patula L.*, культивируемые в городе Астрахань. Биологически активные вещества извлекали методом экстрагирования с использованием в качестве экстрагентов 70% этилового спирта и воды. Содержание фенольных соединений в полученных экстрактах исследовали методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии. Антиоксидантную активность экстрактов оценивали методом колориметрии свободных стабильных радикалов с помощью ДФПГ-теста. **Результаты и их обсуждение.** Было выявлено, что оптимальной элюирующей системой для выделения флавоноидных компонентов из соцветий *T. patula L.* является система бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5). Компоненты, выделенные спиртовой экстракцией, обладали более выраженной антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью аскорбиновой кислоты. **Заключение.** Полученные результаты являются основой для получения индивидуальных или комплексных фенольных соединений соцветий *T. patula L.* методом колоночной жидкостной хроматографии и дальнейшего определения их фармакологических свойств (антибактериальных, фунгицидных, антиоксидантных и др.).

Ключевые слова: бархатцы распростертые, *Tagetes patula L.*, экстракты, хроматография, тонкослойная хроматография, флавоноиды, антиоксидантная активность, фенольные соединения.

STUDY OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY
OF EXTRACTS OF *TAGETES PATULA L.*

O.V. ASTAFYEVA, Z.V. ZHARKOVA, G.N. GENATULLINA

Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia,
Bakinskaya Str., 121, Astrakhan, 414000, Russia, e-mail: rescenter@bk.ru

Abstract. Currently, the search for sources of substances with antioxidant properties remains relevant. Known natural antioxidants are phenolic compounds, in particular flavonoids, which can neutralize free radicals. **The research purpose** was to determine the phenolic components and to study the antioxidant activity of extracts from the inflorescences of the common marigolds *Tagetes patula L.* growing on the territory of the Astrakhan region. **Materials and research methods.** The object of the study was the inflorescences of ornamental plants *T. patula L.* cultivated in the city of Astrakhan. Biologically active substances were extracted by the method of extraction using 70% ethyl alcohol and water as extractants. The content of phenolic compounds in the obtained extracts was investigated by spectrophotometry and thin layer chromatography. The antioxidant activity of the extracts was assessed by the colorimetry method of free stable radicals using the DPPG test. **Results and its discussion.** It was found that the butanol-acetic acid-water system (4: 1: 5) is the optimal elution system for the isolation of flavonoid components from *Tagetes patula L.* inflorescences. The components isolated by alcohol extraction had a more pronounced antioxidant activity, comparable to that of ascorbic acid. **Conclusions.** The results obtained are the basis for obtaining individual or complex phenolic compounds of *Tagetes patula L.* inflorescences by liquid column chromatography and further determination of their pharmacological properties (antibacterial, fungicidal, antioxidant, etc.).

Keywords: marigolds prostrate, *Tagetes patula L.*, extracts, chromatography, thin layer chromatography, flavonoids, antioxidant activity, phenolic compounds.

Введение. В процессе жизнедеятельности человека в его организме постоянно протекают различные свободнорадикальные процессы, скорость которых поддерживается и регулируется многоступенчатой системой регуляции. Нарушения со стороны данной сложной системы регуляции свободнорадикаль-

ного окисления (СРО), недостаток или избыток свободных радикалов, накопление токсических продуктов окисления приводят к повреждению в клетках, и, как следствие, развитию различных патологических состояний [1,10]. В многокомпонентной системе регуляции СРО помимо ферментов, ответственных за образование и гибель активных форм кислорода, важное и непосредственное участие принимают *антиоксиданты* (АО), выступающие в роли ингибиторов окисления.

В последнее время в клинической практике для лечения и профилактики различных заболеваний все шире используются природные АО и синтетические препараты, созданные на основе фенольных соединений, ароматических аминов и других веществ растительного происхождения, обладающих антиоксидантными свойствами [3]. Фенольные компоненты представляют собой значительную подгруппу растительных фенолов, к которым относятся флавоноиды, способные нейтрализовать свободные радикалы [4].

Наиболее богаты флавоноидами растения семейств бобовых, астровых (сложноцветных), сельдерейных и др. В основном они накапливаются в соцветиях, плодах, корнях, семенах и древесине [6]. К растениям, обладающим ярко выраженным антиоксидантным действием, относятся бархатцы распростертые (*Tagetes patula L.*), являющиеся перспективным источником флавоноидных соединений [8,11,11]. Наряду с поиском перспективных источников флавоноидных соединений, актуальным остается и поиск простых, безопасных, экономически выгодных и эффективных способов извлечения и очистки.

Цель исследования – исследование фенольных соединений и определение антиоксидантной активности экстрактов соцветий бархатцев распростертых *Tagetes patula L.*, произрастающих на территории Астраханской области.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись соцветия декоративных растений *T. patula L.*, культивируемые в городе Астрахань.

Фенольные соединения из соцветий бархатцев экстрагировали с использованием таких растворителей как 70% раствор этилового спирта и дистиллированная вода [3].

Содержание основных групп химических веществ определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре ПЭ-5300В. Исследовали величину поглощения (абсорбция) в диапазоне длин волн от 315 до 1000 нм [5].

Идентификацию фенольных компонентов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках марки ПТСХ-АФ-В *Sorbfil Plates*, зернение 8-12 мкм, толщина слоя 80-100 мкм, размер пластинки 10.0×5.0 см. Детектирование хроматографических зон после разделения осуществляли проведя обработку парами йода, 2% раствором хлорида железа в этиловом спирте визуализировали в видимом и УФ-свете [2].

В качестве элюирующих систем применяли гексан; гексан:этилацетат (27:4); этанол:вода (9:1), (1:9), (3:2), (1:1); бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5); бензол:уксусная кислота (5:1); бензол:метанол (8:2); уксусная кислота:вода (6:4).

Антиоксидантную активность экстрактов определяли методом колориметрии свободных стабильных радикалов. *DPPH* (ДФПГ)–тест проводили фотометрическим методом при длине волны 517 нм на спектрофотометре ПЭ-5300В с использованием в качестве свободного радикала 0,5 мМ спиртового раствора *DPPH* (*Sigma-Aldrich*) в этаноле. Использовали кюветы 10×10×15 [10]. Образцом сравнения был выбран водный раствор аскорбиновой кислоты концентрацией 1 мг/мл. Для измерения готовили следующие растворы. В качестве отрицательного контроля (без присутствия антиоксиданта) к 500 мкл раствора ДФПГ добавляли 1500 мкл 96% этилового спирта. Как положительный контроль готовили раствор 1480 мкл этилового спирта 96% и 500 мкл раствора ДФПГ с 20 мкл раствора аскорбиновой кислоты (1мг/мл). Для исследования антиоксидантной активности полученных экстрактов к 1480 мкл этилового спирта 96% добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 20 мкл исследуемого образца. Все пробы готовили в трех повторностях.

После приготовления растворов пробы оставляли на 60 минут для протекания реакции окисления. Затем измеряли светопоглощение *Abs*, светопропускание *T* и оптическую плотность *D* рабочих растворов [10] и вычисляли показатель антиоксидантной активности (*AA*, %) по формуле: $AA = [1-(A_i-A_j)/A_c] \times 100\%$, где, A_i – абсорбция исследуемого раствора с *DPPH* реактивом, A_j – абсорбция исследуемого вещества, A_c – абсорбция *DPPH* раствора.

Результаты и их обсуждение. Первым этапом работы было определение основных групп экстрактивных веществ спектрофотометрическим методом. Спектры поглощения всех исследуемых экстрактов имели общую точку пересечения при длине волны 400 нм (рис. 1).

Известно, что именно в этой области [5] происходит максимальное светопоглощение фенольного кольца, а именно, поглощение в области 320-380 нм характерно для флавоноидов, а в области 350-390 нм – для флавонолов. Полученные результаты спектрометрии доказывают наличие флавоноидных соединений в исследуемых экстрактах соцветий *T. patula L.*

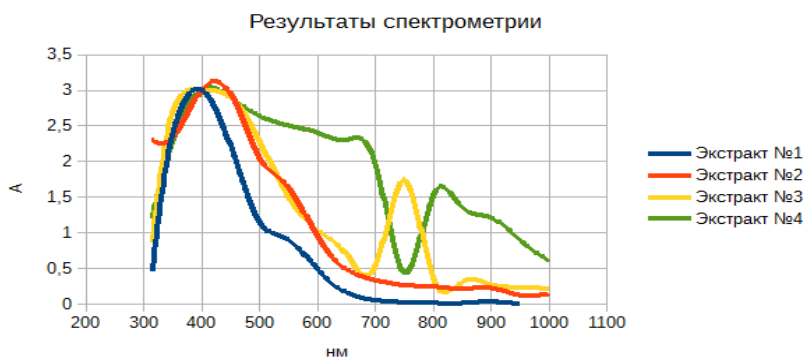


Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов *T. patula L.*

Следующим этапом работы был аналитический подбор оптимальной системы элюентов для выделения фенольных компонентов [2]. Провели подбор растворителей с разной степенью полярности.

Лучшее разделение и качество хроматографических зон достигнуто при применении системы бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5). Для каждой хроматографической зоны был подсчитан коэффициент удерживания *R_f*. Результаты идентификации зон на хроматограммах представлены в табл.

Таблица

Идентификация хроматографических зон на хроматограммах

Растворитель	<i>R_f</i> ±0,02	Окраска в видимом свете	Окраска в УФ / при нанесении хлорида железа 2% на пластинку
Бензол:метанол (8:2)	0,5	Желтая	Черная
Этанол:вода (6:4)	0,85	Желтая	Черная
Бензол:уксусная кислота (5:1)	0,1	Желтая	-
	0,66	Желтая	
	0,13	Желтая	
Уксусная кислота:вода (6:4)	0,87	Желтая	Черная
	0,81	Желтая	
Бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5)	0,63	Желто-зеленая	-
	0,31	Желтая	
	0,78	Желто-зеленая	
Этанол:вода (1:1)	0,84	Желтая	-
	0,81	Зеленая	
	0,17	Желтая	
Гексан:этилацетат (27:4)	0,17	Желтая	-
Этанол:вода (9:1)	0,73	Желтая	-
	0,38	Желтая	
	0,89	Желтая	
	0,69	Желтая	
Этанол:вода (1:9)	0,91	Желтая	-
	0,38	Желтая	
	0,89	Желтая	

При использовании таких систем как бензол:метанол (8:2), уксусная кислота:вода (6:4), гексан:этилацетат (27:4), этанол:вода (6:4) и этанол:вода (9:1) обнаружена одна хроматографическая зона с разными показателями *R_f*. Причем при применении этанолсодержащих систем этанол:вода (1:9) и этанол:вода (1:1) обнаружены четыре и три хроматографические зоны соответственно. Элюирующая система бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5) позволяет выделять из экстрактов три компонента. Три хроматографических зоны также были обнаружены при использовании системы бензол:уксусная кислота (6:4). В результате детекции в УФ-свете и обработки ТСХ-пластин раствором 2% хлорида железа были получены одинаковые результаты. Все исследуемые элюирующие системы выделяют фенольные соединения, в частности флавоноидной природы.

Далее изучали антиоксидантную активность полученных экстрактов (рис. 2).

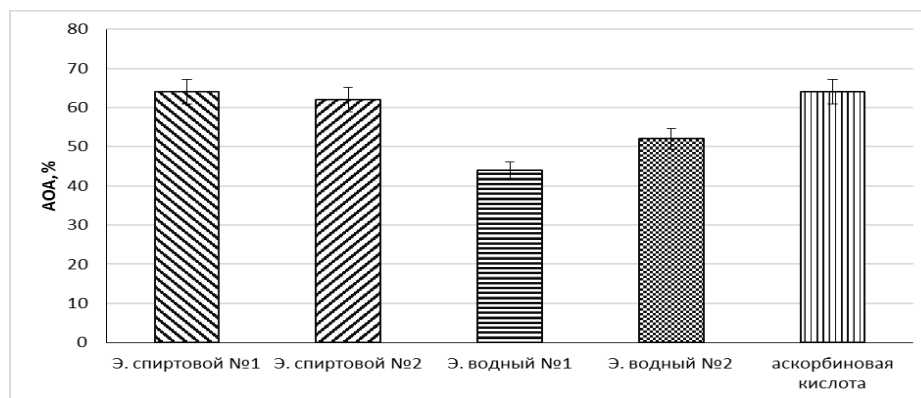


Рис. 2. Антиоксидантная активность экстрактов соцветий *T. patula L.*

Водно-спиртовые экстракты соцветий *T. patula L.* обладали более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с водными экстрактами (примерно в 1,5 раза). Предположительно, антиоксидантное действие связано с большим содержанием веществ, в том числе флавоноидных, выделенных методом водно-спиртовой экстракции. Антиоксидантная активность экстракта №1, полученного методом спиртового экстрагирования дробным кипячением сравнима с активностью аскорбиновой кислоты.

Заключение. Спектрофотометрическим методом было подтверждено наличие во всех исследуемых экстрактах фенольных соединений. Методом ТСХ определены фенольные компоненты и подобрана оптимальная система для отделения флавоноидов от балластных веществ из соцветий *T. patula L.* – бутанол:уксусная кислота:вода, которая обладала лучшей элюирующей способностью. С использованием данной системы были выделены три группы компонентов фенольной природы. Компоненты, выделенные спиртовой экстракцией, обладали более выраженной антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью аскорбиновой кислоты. Выявленные эффекты обусловлены вероятнее всего наличием флавоноидных компонентов. Водные экстракты также обладали антиоксидантной активностью, но меньше в 1,2-1,5 раза. Однако наличие у водных экстрактов антирадикального действия в сочетании с простым и безопасным способом получения, обуславливают необходимость дальнейшего их исследования. Экстракты соцветий *T. patula L.*, содержащие флавоноидные компоненты с выраженными антиоксидантными свойствами, могут быть предложены в качестве перспективного средства лечебного и профилактического назначения. Полученные результаты являются основой для получения индивидуальных или комплексных фенольных соединений соцветий *T. patula L.* методом колоночной жидкостной хроматографии и дальнейшего изучения их фармакологических свойств (антибактериальных, фунгицидных, антиоксидантных и др.).

Литература

1. Ажикова А.К., Самотруева М.А., Фельдман Б.В., Башкина О.А. Обоснование терапевтического использования растений рода гинкго билоба в качестве средства коррекции раневых поверхностей кожи (краткий обзор литературы). В сб.: Фармацевтические науки: от теории к практике. Заочная научно-практическая конференция с международным участием. 2016. С. 29–30.
2. Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика. Методы хроматографии и капиллярного электрофореза. М.: Техносфера, 2009. 472 с.
3. Злотников Э.Г. Краткий справочник по химии. Издание 3. СПб.: Питер, 2017. 192 с.
4. Марчишин С.М., Бердей Т.С., Козачок С.С., Демьяк О.Л. Определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот в траве *Tagetes erecta L.*, *Tagetes patula L.* и *Tagetes tenuifolia Cav.* методом ВЭЖХ // Медицинские и фармацевтические науки. 2013. №6. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-flavonoidov-i-gidroksikorichnyh-kislot-v-trave-tagetes-erecta-l-tagetes-patula-l-i-tagetes-tenuifolia-cav-metodom-vezhh/viewer.pdf> (дата обращения 23.09.2020).
5. Преч Э. Бюльманн Ф., Афгольтер К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных / пер. Тарасевича Б.Н. М.: Мир, Бином, Лаборатория знаний, 2002. 441 с.
6. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушкино: Синхробук, 2013. 318 с.
7. Цибизова А.А., Пахнова Л.Р., Башкина О.А., Брынцева И.А., Авдеева Е.С., Войнова В.И. Разработка состава средства для наружного применения на основе фитопелоидной композиции // Астраханский медицинский журнал. 2018. № 1 (13). С. 58–65.
8. Ясенявская А.Л., Самотруева М.А., Лужнова С.А. Влияние антиоксидантов на нейроэндокринный статус в условиях иммобилизационного стресса // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 8 (2). С. 57–59.

9. Bors M.D., Sosaci S., Tofana M., Muresan V., Pop A.V., Nagy M., Vlaic R. Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity of methanolic extracts of some brassica seeds // Bulletin UASIM Food Science and Technology. 2014. Vol. 7(2). P. 205–206. DOI: 10.15835 /buasvmcn-fst:10469.
10. Fabris S., Bertelle M., Astafyeva O., Gregoris E., Zangrando R., Gambaro A., Lima G.P.P., Stevanato R. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis // Pharmacology & Pharmacy. 2013. Vol. 4. P. 64–51. DOI: 10.4236/pp.2013.41006.
11. Munhoz V.M., Longhini R., Souza J.R.P., Zequi J.A.C., Leite Mello E.V.S., Lopes G.C., Mello J.C.P. Extraction of flavonoids from Tagetes patula: process optimization and screening for biological activity // Rev.Bras. Farmacogn. 2014. Vol.24. P. 576–583. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.10.001.
12. Yasukawa K., Yoshimasa K. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of Tagetes patula L.) on Acute Inflammation Model // International Journal of Inflammation. 2013. №1. P. 263–272. DOI: 10.1155/2013/309493.

References

1. Azhikova AK, Samotrueva MA, Fel'dman BV, Bashkina OA. Obosnovanie terapevticheskogo ispol'zovaniya rastenij roda ginkgo biloba v kachestve sredstva korrrekcii ranevyh poverhnostej kozhi (kratkij obzor literatury) [Substantiation of the therapeutic use of plants of the genus Ginkgo biloba as a means of correction of wound surfaces of the skin (a brief review of the literature)]. V sbornike: Farmaceuticheskie nauki: ot teorii k praktike. Zaochnaja nauchno-prakticheskaja konferencija s mezhdunarodnym uchastiem. 2016; 29-30. Russian.
2. Bekker Ju. Hromatografija. Instrumental'naja analitika. Metody hromatografii i kapilljarnogo jelektroforeza [Chromatography. Instrumental analytics. Chromatography and capillary electrophoresis methods]. Moscow: Tehnosfera; 2009. Russian.
3. Zlotnikov Je.G. Kratkij spravocnik po himii. Izdanie 3 [A short guide to chemistry. Edition 3]. Sankt-Peterburg: Piter; 2017. Russian.
4. Marchishin SM, Berdej TS, Kozachok SS, Demydjak OL. Opredelenie flavonoidov i gidroksikorichnyh kislot v trave Tagetes erecta l., Tagetes patula l. i Tagetes tenuifolia cav. metodom VJeZhH [Determination of flavonoids and hydroxycinnamic acids in the herb Tagetes erecta l., Tagetes patula l. and Tagetes tenuifolia cav. by HPLC]. Medicinskie i farmacevticheskie nauki. 2013; 6. Russian. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-flavonoidov-i-gidroksikorichnyh-kislot-v-trave-tagetes-erecta-l-tagetes-patula-l-i-tagetes-tenuifolia-cav-metodom-vezhh/viewer.pdf> (cited 2020 Sep 23).
5. Prech Je, Bjul'mann F, Affol'ter K. Opredelenie stroenija organicheskikh soedinenij. Tablicy spektral'nyh dannyh. per. Tarasevicha BN. [Determination of the structure of organic compounds. Spectral data tables. per. Tarasevich B.N.]. Moscow: Mir, Binom, Laboratorija znaniy; 2002. Russian.
6. Tarahovskij JuS, Kim BS, Abdrasilov EN, Muzafarov Flavonoidy: biohimija, biofizika, medicina [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushhino: Sinhrobuk; 2013. Russian.
7. Cibizova AA, Pahnova LR, Bashkina OA, Brynceva IA, Avdeeva ES, Vojnova VI. Razrabotka sostava sredstva dlja naruzhnogo primeneniya na osnove fitopeloidnoj kompozicii [Development of the composition of an agent for external use based on a phytopeloid composition]. Astrhanskij medicinskij zhurnal. 2018;1(13):58-65. Russian.
8. Jasenjvskaja AL, Samotrueva MA, Luzhnova SA. Vlijanie antioksidantov na nejroendokrinnij status v uslovijah immobilizacijnogo stressa [The effect of antioxidants on neuroendocrine status under conditions of immobilization stress]. Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 2014; 8 (2): 57-9. Russian.
9. Bors MD, Sosaci S, Tofana M, Muresan V, Pop AV, Nagy M, Vlaic R. Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity of methanolic extracts of some brassica seeds. Bulletin UASIM Food Science and Technology. 2014; 7(2): 205-6. DOI: 10.15835 /buasvmcn-fst:10469
10. Fabris S, Bertelle M, Astafyeva O, Gregoris E, Zangrando R, Gambaro A, Lima GPP, Stevanato R. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. Pharmacology & Pharmacy. 2013;4:64-51. DOI: 10.4236/pp.2013.41006
11. Munhoz VM, Longhini R, Souza JRP, Zequi JAC, Leite Mello EVS, Lopes GC, Mello JCP. Extraction of flavonoids from Tagetes patula: process optimization and screening for biological activity. Rev.Bras. Farmacogn. 2014; 24:76-83. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.10.001
12. Yasukawa K, Yoshimasa K. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of Tagetes patula L.) on Acute Inflammation Model. International Journal of Inflammation. 2013;263-72. DOI: 10.1155/2013/309493

Библиографическая ссылка:

Астафьева О.В., Жаркова З.В., Генатуллина Г.Н. Исследование фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов соцветий *Tagetes Patula l.* // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2021. №4. Публикация 3-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-4/3-6.pdf> (дата обращения: 27.07.2021). DOI: 10.24412/2075-4094-2021-4-3-6*

Bibliographic reference:

Astafyeva OV, Zharkova ZV, Genatullina GN. Issledovanie fenol'nyh soedinenij i antioksidantnoj aktivnosti jekstraktov socvetij Tagetes Patula l. [Study of phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of *Tagetes Patula l.*] Journal of New Medical Technologies, e-edition. 2021 [cited 2021 July 27];4 [about 5 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-4/3-6.pdf>. DOI: 10.24412/2075-4094-2021-4-3-6

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-4/e2021-4.pdf>