
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.05.073>

УДК 541.183: 542.924

**И.В. Лагута¹, Т.В. Фесенко¹,
О.Н. Ставинская¹, Н.Я. Левчик², О.И. Дзюба²**

¹ Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, Киев

² Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев

E-mail: icvmtt34@gmail.com

Антиоксидантные/восстановительные свойства экстрактов из листьев растений рода *Vitex*

Представлено академиком НАН Украины Н.Т. Картемом

*Изучены состав и антиоксидантные/восстановительные свойства экстрактов из листьев растений трех видов витекса — *Vitex cannabifolia*, *Vitex agnus-castus*, *Vitex negundo*. Показано, что все экстракты имеют высокое содержание фенольных антиоксидантов и проявляют значительную активность в реакции ингибирования радикалов ДФПГ и в “зеленом” синтезе наночастиц серебра. Активность экстрактов различных видов витекса в реакции с радикалом ДФПГ и в “зеленом” синтезе наночастиц серебра отличается друг от друга и коррелирует с содержанием в экстрактах флавоноидов и с общим содержанием фенолов соответственно.*

Ключевые слова: экстракты витекса, фенолы, флавоноиды, антиоксидантная активность, восстановительная способность.

Антиоксиданты природного происхождения широко используются в составе лекарственных средств, в косметологии, пищевой промышленности, а также в качестве восстановителей в процессах “зеленой” химии, в связи с чем является актуальным поиск доступных сырьевых ресурсов для их получения [1, 2]. В предыдущей работе по результатам скрининга растений — потенциальных источников эффективных антиоксидантов/восстановителей, нами было обнаружено, что экстракты из листьев растений рода витекс обладают высокими антиоксидантными свойствами и являются перспективным сырьем для выделения биологически активных веществ [3]. В настоящем сообщении приведены результаты исследования антиоксидантных/восстановительных свойств экстрактов трех видов витекса и изучения возможности их использования в качестве антиоксидантов в биологических средах и в качестве восстановителей в «зеленом» синтезе наночастиц.

В эксперименте использовали растения *Vitex* трех видов: *V. cannabifolia*, *V. agnus-castus*, *V. negundo*. Биологически активные вещества извлекали из листьев растений путем экстракции в 70%-й раствор этанола согласно методике, описанной в работе [4]. Соотношение сырья и экстрагента составляло 1 г/100 мл, время экстракции — 30 мин.

© И.В. Лагута, Т.В. Фесенко, О.Н. Ставинская, Н.Я. Левчик, О.И. Дзюба, 2017

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2017. № 5

Для определения содержания флавоноидов в листьях растений [4] 1 мл экстракта помещали в мерную колбу, добавляли 5 мл 2 %-го раствора $AlCl_3$ (“Sigma-Aldrich”) в 95 % этаноле и доводили объем раствора до 25 мл. Смесь перемешивали в течение 30 мин и измеряли оптическую плотность раствора при 410 нм. Для приготовления раствора сравнения к 1 мл экстракта добавляли 0,1 мл концентрированной уксусной кислоты, после чего объем раствора доводили до 25 мл 95 %-м этанолом. В качестве калибровочных использовали растворы рутина (“Sigma-Aldrich”) различной концентрации в 95 % этаноле. Общее содержание флавоноидов в листьях растений представлено в виде эквивалентного содержания рутина в 1 г сухого вещества.

Для характеристики антиоксидантных/восстановительных свойств экстрактов использовали методы Фолина—Чоколтеу и ДФПГ-тест. Для определения общего фенольного индекса [5] к 1 мл экстракта последовательно добавляли 11,5 мл воды, 5 мл 20 %-го раствора карбоната натрия, 1,25 мл реактива Фолина-Чоколтеу и 6,25 мл воды, так что суммарный объем раствора составлял 25 мл. Раствор перемешивали в течение 30 мин, измеряли поглощение при 750 нм и рассчитывали общий фенольный индекс согласно [5]. Сопоставляя полученные значения фенольного индекса экстрактов с соответствующими данными для аскорбиновой кислоты (фенольный индекс раствора аскорбиновой кислоты с концентрацией 0,5 ммоль/л составлял 1 [6]), оценивали эквивалентную концентрацию антиоксиданта в растворах.

Антирадикальную активность антиоксидантов определяли по результатам реакции со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ) [7]. К 2 мл 70 %-го спирта добавляли 2 мл 0,15 ммоль/л раствора дифенилпикрилгидразида и 1 мл исходного экстракта или экстракта, разведенного в соотношении 1:100. Концентрацию стабильных радикалов через различные промежутки времени после начала реакции определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности в максимуме поглощения 520 нм. Для контроля использовали раствор с той же концентрацией ДФПГ, но без антиоксиданта. Для оценки потенциальной эффективности антиоксидантов в условиях, моделирующих протекание процессов в биологических средах, реакцию экстрактов с ДФПГ осуществляли в среде 0,1 ммоль/л соляной кислоты [8]. Для этого к 5 мл реакционной смеси добавляли 0,005 мл 0,1 моль/л соляной кислоты.

В таблице представлены результаты исследования состава экстрактов из листьев витекса (содержание флавоноидов, значения общего фенольного индекса и эквивалентной концентрации аскорбиновой кислоты), а также результаты ДФПГ-теста. Как видно из данных таблицы, наибольшие значения фенольного индекса и, соответственно, наибольшая

Содержание фенольных антиоксидантов/восстановителей в экстрактах витекса

Название растения	Содержание флавоноидов, %	Общий фенольный индекс, отн. ед.	Эквивалентная концентрация аскорбиновой кислоты, ммоль/л	Доля радикалов ДФПГ, ингибированных за 30 мин, %
<i>Vitex cannabifolia</i>	1,2	15,0	7,5	~100
<i>Vitex agnus-castus</i>	1,5	14,8	7,4	~100
<i>Vitex negundo</i>	1,2	25,0	12,5	~100

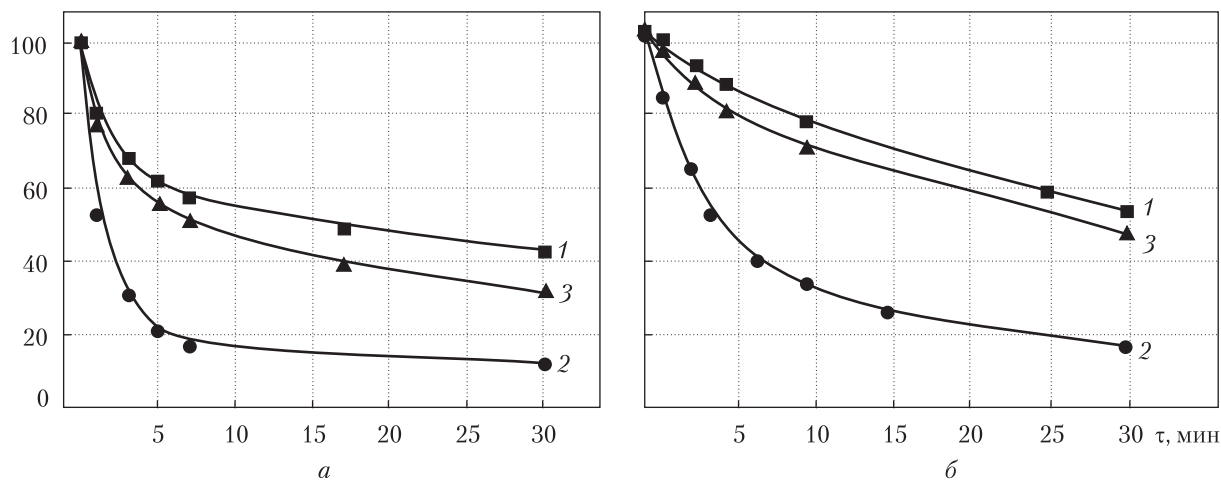
$C/C_0, \%$


Рис. 1. Кинетические кривые гибели радикала ДФПГ в реакции с экстрактами *Vitex cannabifolia* (1), *Vitex agnus-castus* (2), *Vitex negundo* (3) в стандартных условиях (а) и в среде 0,1 ммоль/л HCl (б). Разбавление исходных экстрактов 1:100. C/C_0 — отношение концентрации радикала в растворе к исходной концентрации, %

эквивалентная концентрация аскорбиновой кислоты наблюдаются для экстрактов растений *V. negundo*; общее количество фенолов в экстрактах *V. cannabifolia* и *V. agnus-castus* практически одинаково. В то же время наибольшее количество флавоноидов регистрируется в экстрактах *V. agnus-castus*, а в экстрактах *V. negundo* и *V. cannabifolia* содержание флавоноидов практически одинаковое. Все неразбавленные экстракты проявляли очень высокую активность в реакции с ДФПГ, обеспечивая практически полное ингибирование радикалов в первые секунды реакции.

Общий фенольный индекс, как известно, характеризует количество фенолов в растворе и потенциальную антиоксидантную/восстановительную способность соединений, в то время как активность экстрактов в конкретных реакциях (ингибирование радикалов, восстановление ионов металлов) может определяться другими свойствами антиоксидантов/восстановителей. На рис. 1, а представлены кинетические кривые гибели радикалов ДФПГ в реакции с антиоксидантами, присутствующими в разбавленных экстрактах из листьев различных видов витекса. Несмотря на значительное разбавление экстрактов, все образцы характеризуются эффективным восстановлением радикала ДФПГ. При этом наибольшую активность в реакции проявляет не экстракт *Vitex negundo* с максимальным фенольным индексом, а экстракт *V. agnus-castus*, характеризующийся наибольшим содержанием флавоноидов. Возможно, флавоноиды вносят больший, по сравнению с другими фенолами, вклад в реакцию с ДФПГ за счет того, что продукты их первичного взаимодействия с радикалом могут восстанавливать еще один радикал [7]. Более высокая активность экстракта *V. negundo* по сравнению с экстрактом *V. cannabifolia* с тем же содержанием флавоноидов связана, по видимому, со значительно большей общей концентрацией фенолов.

Согласно данным [8, 9], антирадикальное действие фенольных антиоксидантов может осуществляться по двум параллельным механизмам. В первом случае (механизм SPLET) реакция происходит через стадию ионизации фенольного соединения путем протонирования

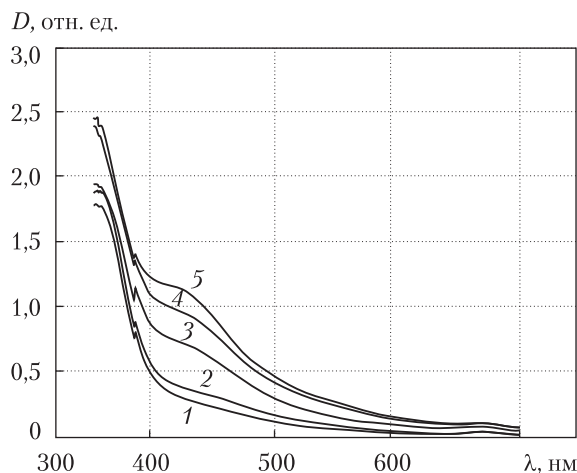


Рис. 2. УФ спектры реакционной смеси *Vitex negundo*/AgNO₃. Время реакции: 1 ч (1), 2 ч (2), 3 ч (3), 1 сут (4) и 3 сут (5). *D* – оптическая плотность раствора

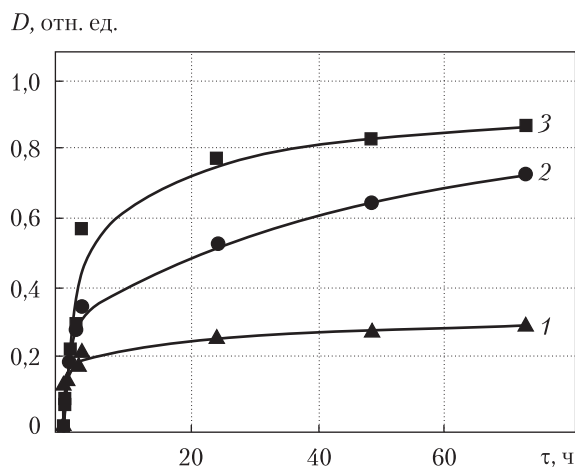


Рис. 3. Поглощение в максимуме 450 нм в спектрах реакционных смесей экстрактов и раствора серебра в зависимости от времени реакции. 1 – *Vitex cannabifolia*/AgNO₃; 2 – *Vitex agnus-castus*/AgNO₃; 3 – *Vitex negundo*/AgNO₃

молекул растворителя. Второй механизм (НАТ) основан на непосредственной передаче атома водорода от антиоксиданта к радикалу. При проведении ДФПГ-теста в обычных условиях реализуется преимущественно первый механизм, тогда как основную роль в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в биологических средах, имеет механизм, связанный с переносом атома водорода. Для оценки потенциальной эффективности действия антиоксидантов в “биологических” условиях (например, в подавлении процессов цепного пероксидного окисления липидов) реакцию экстрактов с ДФПГ осуществляли в среде 0,1 ммоль/л соляной кислоты. Присутствие кислоты подавляет ионизацию фенолов, и восстановление радикалов осуществляется преимущественно по механизму переноса водорода [8].

Сравнение кривых ингибирования радикалов экстрактами витекса в стандартных условиях и в среде 0,1 ммоль/л HCl (см. рис. 1) показывает, во-первых, что реакция по второму механизму происходит заметно медленнее. При этом сравнительная активность экстрактов различных видов витекса оказывается в том же ряду: *V. agnus-castus* > *V. negundo* > *V. cannabifolia*. Таким образом, можно ожидать, что экстракт *V. agnus-castus* с наибольшим содержанием флавоноидов будет проявлять наибольшие антиоксидантные свойства при использовании в реакциях, протекающих в биологических системах.

Экстракты всех трех растений витекса проявили и значительную активность в синтезе наночастиц серебра. На рис. 2 представлены примеры спектров реакционной смеси экстракт *V. negundo*/раствор соли серебра через различное время после начала реакции. Наличие в спектрах полосы в области 450 нм обусловлено плазмонным резонансом частиц серебра и свидетельствует о формировании наночастиц. На рис. 3 приведена зависимость интенсивности полосы плазмонного резонанса 450 нм в УФ спектрах в зависимости от времени реакции для всех трех экстрактов. Как видно из рис. 3, наиболее высокую активность в реакции восстановления ионов Ag⁺ проявляет экстракт *V. negundo* с наибольшим фенольным индексом. При этом качественный состав восстановителей, очевидно, тоже имеет зна-

чение: при практически одинаковом общем содержании фенолов в экстрактах *V. agnus-castus* и *V. cannabifolia* экстракт с большей долей флавоноидов *V. agnus-castus* проявляет значительно более высокую активность в синтезе наночастиц (ср. кривые 1 и 2). Как известно, флавоноиды являются очень активными восстановителями [10] и рассматриваются некоторыми исследователями [11] в качестве компонентов растительных экстрактов, играющих основную роль в синтезе наночастиц.

Таким образом, согласно полученным данным, экстракты *Vitex cannabifolia*, *Vitex agnus-castus*, *Vitex negundo* содержат большое количество фенольных антиоксидантов/восстановителей и проявляют высокую активность и в реакции ингибирования радикалов, и в «зеленом» синтезе наночастиц серебра. Обнаружено, что антиоксидантная/восстановительная активность различных экстрактов коррелирует с содержанием в них фенолов и флавоноидов. На основании полученных результатов можно предположить, что в биологических средах наибольшую антиоксидантную активность будет проявлять экстракт *Vitex agnus-castus*, характеризующийся наибольшим содержанием флавоноидов, тогда как наиболее эффективным восстановителем в синтезе наночастиц серебра представляется экстракт *Vitex negundo* с максимальным общим содержанием фенольных антиоксидантов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 2006. **94**. P. 550–557. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
2. Irvani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 2011. **13**. P. 2638–2650. doi: <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
3. Лагута И.В., Ставинская О.Н., Дзюба О.И., Иванников Р.В. Анализ антиоксидантных свойств экстрактов растений. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2015. № 5. С. 130–137. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.05.130>
4. Комарова М.Н., Николаева Л.А., Регир В.Г. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья: методические указания к лабораторным занятиям. Санкт-Петербург: Гос. хим.-фарм. академия, 1998. 60 с.
5. Alonso A.M., Domínguez C., Guilleán D., Barroso C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.* 2002. **50**. P. 3112–3115. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0116101>
6. Stavinskaya O.M., Kuzema P.O., Laguta I.V., Pakhlov E.M., Kazakova O.O., Chernyavskaya T.V. Interaction of ascorbic acid with hydrophilic-hydrophobic silicas. *Annales UMCS. Chemia.* 2007. **62**. P. 124–135.
7. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 1995. **28**. P. 25–30. doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
8. Волков В.А., Пахомов П.М. Кинетика взаимодействия радикала ДФПГ с экстрактивными веществами растений в различных средах. *Ползунов. вестн.* 2008. № 3. С. 309–313.
9. Litwinienko G., Ingold K.U. Solvent Effects on the Rates and Mechanisms of Reaction of Phenols with Free Radicals. *Acc. Chem. Res.* 2007. **40**. P. 222–230. doi: <https://doi.org/10.1021/ar0682029>
10. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med.* 1996. **20**. P. 7933–7956. doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
11. Zhou Y., Lin W., Huang J., Wang W., Gao Y., Lin L., Li Q., Lin L., Du M. Biosynthesis of gold nanoparticles by foliar broths: roles of biocompounds and other attributes of the extracts. *Nanoscale Res. Lett.* 2010. **5**. P. 1351–1359. doi: <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9652-8>

Поступило в редакцию 11.11.2016

REFERENCES

1. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.*, 94, pp. 550-557. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>.
2. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.*, 13, pp. 2638-2650. doi: <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
3. Laguta, I. V., Stavinskaya, O. N., Dzyuba, O. I. & Ivannikov, R. V. (2015). Analysis of antioxidant properties of plants extracts. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 5, pp. 130-137 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.05.130>.
4. Komarova, M. N., Nikolaeva, L. A. & Regir, V. G. (1998). Phytochemical analysis of medicinal plants: guidelines for laboratory studies. Saint-Petersburg: State Chem.-Pharmaceut. Acad. (in Russian).
5. Alonso, A. M., Domianquez, C., Guillelan, D. & Barroso, C. G. (2002). Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.*, 50, pp. 3112-3115. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0116101>
6. Stavinskaya, O. M., Kuzema, P. O., Laguta, I. V., Pakhlov, E. M., Kazakova, O. O. & Chernyavskaya, T. V. (2007). Interaction of ascorbic acid with hydrophilic-hydrophobic silicas. *Annales UMCS. Chemia*, 62, pp. 124-135.
7. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28, pp. 25-30. doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
8. Volkov, V. A. & Pakhomov, P. M. (2008). Kinetics of the interaction of the radical DPPH with extractive substances of plants in various media. *Polzunov. vestn.*, No. 3, pp. 309-313 (in Russian).
9. Litwinienko, G. & Ingold, K. U. (2007). Solvent Effects on the Rates and Mechanisms of Reaction of Phenols with Free Radicals. *Acc. Chem. Res.*, 40, pp. 222-230. doi: <https://doi.org/10.1021/ar0682029>
10. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med.*, 20, pp. 7933-7956. doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
11. Zhou, Y., Lin, W., Huang, J., Wang, W., Gao, Y., Lin, L., Li, Q., Lin, L. & Du, M. (2010). Biosynthesis of gold nanoparticles by foliar broths: roles of biocompounds and other attributes of the extracts. *Nanoscale Res. Lett.*, 5, pp. 1351-1359. doi: <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9652-8>

Received 11.11.2016

И.В. Лагута¹, Т.В. Фесенко¹,
О.М. Ставинська¹, Н.Я. Левчик², О.І. Дзюба²

¹ Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Київ

² Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Київ

E-mail: icvmtt34@gmail.com

АНТИОКСИДАНТНІ / ВІДНОВЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ
ЕКСТРАКТІВ ІЗ ЛИСТЯ РОСЛИН РОДУ *VITEX*

Вивчено склад і антиоксидантні/ відновлювальні властивості екстрактів із листя рослин трьох видів вітексу — *Vitex cannabifolia*, *Vitex agnus-castus*, *Vitex negundo*. Показано, що всі екстракти мають високий вміст фенольних антиоксидантів і виявляють значну активність у реакції інгібування радикалів ДФПГ та в “зеленому” синтезі наночастинок срібла. Активність екстрактів різних видів вітексу в реакції з радикалом ДФПГ та в “зеленому” синтезі наночастинок срібла відрізняється одна від одної і корелює з вмістом в екстрактах флавоноїдів і з загальним вмістом фенолів відповідно.

Ключові слова: екстракти вітексу, феноли, флавоноїди, антиоксидантна активність, відновлювальна здатність.

I.V. Laguta¹, T.V. Fesenko¹,
O.N. Stavinskaya¹, N.Ya. Levchyk², O.I. Dzyuba²

¹ Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

² M.M. Gryshko National Botanic Garden of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: icvmtt34@gmail.com

ANTIOXIDANT/REDUCING PROPERTIES
OF THE EXTRACTS FROM THE GENUS *VITEX* PLANT LEAVES

Ethanol extracts from *Vitex cannabifolia*, *Vitex agnus-castus*, and *Vitex negundo* leaves are prepared, and the antioxidant/reducing properties of the extracts are investigated. All the extracts are found to contain a significant amount of phenol antioxidants, including flavonoids, and possess the high ability to reduce both DPPH radicals and Ag⁺ ions. The activities of the extracts in the reaction with DPPH radicals and in the “green” synthesis of silver nanoparticles differ from each other and correlate with the flavonoid content and total phenol content, respectively.

Keywords: *Vitex* extracts, phenol, flavonoids, antioxidant activity, reducing ability.