

Муниципальное бюджетное образовательное учреждение
Средняя школа №3 г. Родники

Оценка антиоксидантной активности подорожника большого *Plantago major* L

**Яблокова Юлия Алексеевна,
10 класс**

Научный руководитель: Волкова Татьяна Геннадьевна,
доцент кафедры фундаментальной и прикладной химии, кандидат химических
наук, доцент, ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет»

г. Родники 2023г.

Содержание

Введение.....	3
1.Обзор литературы	3
1.1.Активные формы кислорода	3
1.2.Антиоксидантная система растений	4
1.3.Аскорбиновая кислота	5
1.4.Антиоксиданты подорожника большого	6
2.Экспериментальная часть	8
2.1.Количественное определение аскорбиновой кислоты	8
2.2.Определение молекулярных дескрипторов	9
3. Обсуждение результатов	11
3.1. Содержание аскорбиновой кислоты в подорожнике большом	11
3.2. Молекулярные дескрипторы аскорбиновой кислоты	12
Заключение	13
Список литературы	13
Приложения	15

Введение

Важнейшим внешним источником антиоксидантов для организма человека является растительное сырье и продукты его переработки, которые используются в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Использование природных антиоксидантов в качестве доступной, дешевой и безопасной альтернативы синтетическим препаратам безусловно является важным направлением в сфере охраны здоровья человека [1]. В листьях подорожника большого обнаружен богатый состав БАВ, таких как: дубильные вещества (около 5.7%); витамины (кислота аскорбиновая (289 мг%), каротин (23 мг%), витамины К и U); иридоидный гликозид аукубин (около 1%), который при реакции гидролиза расщепляется на глюкозу и аукубигенин; фенилэтанойдные производные плантамайозид, изоплантамайозид и актеозид; органические кислоты (лимонная (1.53%), вишневая (1.87%)); флавоноиды.

Целью настоящего исследования стало определение количественного содержания одного из компонентов антиоксидантной системы подорожника большого – аскорбиновой кислоты в листьях *Plantago major* L, соответствующих разным этапам вегетации, а также определения молекулярных дескрипторов аскорбиновой кислоты.

Задачи:

- 1) анализ научной литературы по теме исследования;
- 2) титриметрическое определение содержания аскорбиновой кислоты в образцах подорожника большого;
- 3) определение молекулярных дескрипторов аскорбиновой кислоты и сравнение их с критериями Липински.

Объекты исследования - 2 образца листьев подорожника большого, собранные в июне и июле 2022 г. на территории Родниковского района Ивановской области; 1 образец промышленной серии сырья подорожника большого производитель торговая марка ФармаЦвет (АО «Красногорсклексредства»).

1. Обзор литературы

1.1. Активные формы кислорода

Растения в течение всей своей жизни постоянно взаимодействуют с молекулярным кислородом, который вовлекается во многие метаболические процессы, приводя и к образованию активных форм кислорода (АФК) — соединений, образующихся в результате неполного восстановления O_2 [10]:

- супероксид анион радикал $O_2^{\cdot -}$,
- гидропероксидный радикал HO_2^{\cdot} ,
- пероксид водорода H_2O_2 ,
- гидроксильный радикал HO^{\cdot} ,
- синглетный кислород 1O_2
- озон O_3 .

Наиболее активной формой кислорода считают короткоживущий и чрезвычайно реакционноспособный гидроксильный радикал $\text{HO}\cdot$. Наиболее долгоживущей формой АФК является H_2O_2 . АФК образуются в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах, а также и в других клеточных компартментах (рис. 1).

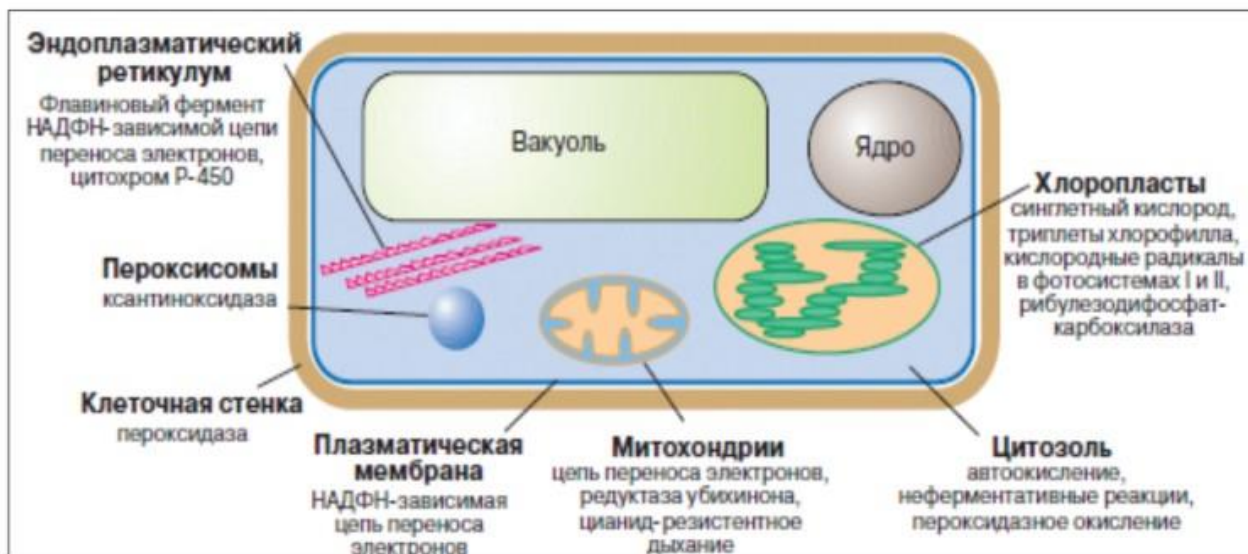


Рис.1. Основные места образования активных форм кислорода в растительной клетке

При действии различных экологических факторов, вызывающих стресс, в клетках повышается количество АФК, и это приводит к повреждениям липидов, нуклеиновых кислот и белков.

Все вышеизложенное свидетельствует о важной роли АФК в жизнедеятельности растений и их влиянии на различные метаболические процессы.

1.2. Антиоксидантная система растений

Антиоксидантная система растений включает различные химические вещества (рис.2.) .



Рис.2 Основные компоненты антиоксидантной системы растений

Антиоксиданты — это молекулы, которые способны прерывать (блокировать) реакции свободнорадикального окисления.[9] Выделяют высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты. Роль ферментов (высокомолекулярные) в антиоксидантной системе заключается в ингибировании зарождения цепей окисления путем удаления супероксидного радикала и перекисных продуктов. Действие низкомолекулярных направлено на ограничение дальнейшего развития цепных реакций, при этом они часто выступают в качестве антирадикальных агентов.

1.3. Аскорбиновая кислота

Аскорбиновая кислота (аскорбат, витамин С) (рис.3) находится в большом количестве в растительных тканях и играет очень важную роль: оказывает существенное влияние на многие физиологические процессы растений, включая рост, дифференциацию тканей и органов и метаболизм. Функция аскорбата - восстановление многих свободных радикалов и минимизация разрушительных воздействий окислительного стресса.

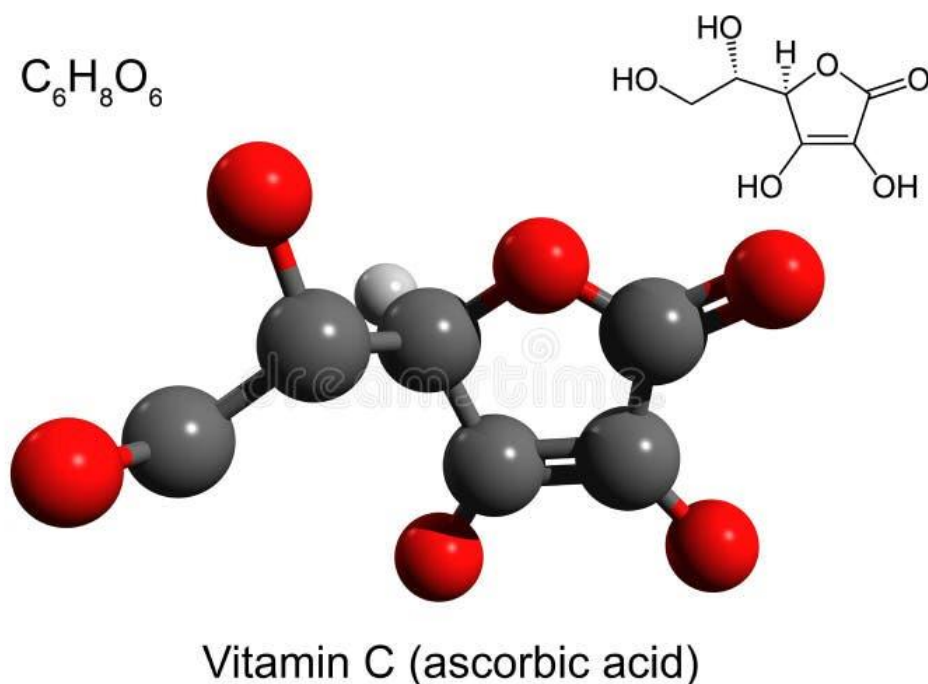


Рис. 3. Структура аскорбиновой кислоты

Как антиоксидант аскорбиновая кислота реагирует с супероксидом кислорода, пероксидом водорода и радикалом токоферола, при этом окисляясь до монодегидроаскорбиновой кислоты (МДГА) или до дигидроаскорбиновой кислоты (ДГА). Окисленные формы превращаются в аскорбат с помощью редуктаз МДГА и ДГА соответственно. [10]

1.4. Антиоксиданты подорожника большого

Подорожник большой (*Plantago major* L.) - это одно из многих лекарственных растений, целебные свойства которого известны с глубокой древности. До сих пор *Plantago major* L., используется в народной медицине по всему миру для профилактики и лечения ряда кожных и инфекционных заболеваний, проблем касающихся органов пищеварения, дыхания, репродукции, кровообращения, против опухолей, для облегчения боли и снижения температуры, а также как эффективное ранозаживляющее средство [1]. Так же исследования [2] показали, что экстракты из надземных частей подорожника большого обладают широким спектром антиоксидантной активности и являются перспективными для производства медицинских препаратов на их основе. Антиоксидантная активность в ряде случаев оказалась равноценной или превышала аналогичную для чистой аскорбиновой кислоты, что доказывает целесообразность дальнейшего поиска путей применения экстрактов подорожника большого в целях замены синтетических антиоксидантов экологически чистыми, доступными и безопасными препаратами растительного происхождения.

Прогноз *in silico* на платформе PassOnline основных видов фармакологической активности листьев подорожника большого показал, что для него характерны антиоксидантное, противовоспалительное, противоопухолевое, вазопротекторное, гепатопротекторное, гипохолестеринемическое, противогрибковое и сосудорасширяющее действие [3]. В таблице 1 приведены разные биологически активные вещества, содержащиеся в подорожнике большом и проявляющие обладающие антиоксидантным действием. Максимальная вероятность проявления данного свойства характерна для аскорбиновой кислоты.

Таблица 1

**Прогноз основных видов фармакологической активности
компонентов сока подорожника большого *in silico***

Фармакологическая активность	Биологически активные вещества													
	Аукубин		Плантамай-озид		Кофейная кислота		Скополетин		Эскулетин		Галактуроновая кислота		Аскорбиновая кислота	
	P _a	P _i	P _a	P _i	P _a	P _i	P _a	P _i	P _a	P _i	P _a	P _i	P _a	P _i
Противовоспалительный	0.911	0.003	0.663	0.021	0.651	0.023	0.629	0.026	0.675	0.019	-	-	0.779	0.008
Антиоксидантный	0.883	0.004	0.767	0.004	0.603	0.025	0.540	0.005	0.608	0.004	0.522	0.043	0.928	0.003
Гепатопротекторный	0.848	0.003	0.938	0.002	-	-	0.644	0.009	0.623	0.011	-	-	-	-
Противоопухолевый	0.849	0.007	0.797	0.012	0.607	0.005	0.723	0.022	0.686	0.028	-	-	0.617	0.041
Гипохолестеринемический	0.844	0.004	0.954	0.001	0.630	0.012	0.605	0.013	0.628	0.012	-	-	-	-
Вазопротекторный	0.729	0.006	0.884	0.003	0.782	0.006	0.747	0.008	0.773	0.006	-	-	0.948	0.002
Сосудорасширяющий	-	-	0.689	0.010	0.639	0.016	0.627	0.012	0.574	0.017	-	-	-	-
Противогрибковый	0.679	0.011	0.758	0.007	0.873	0.008	-	-	-	-	0.561	0.022	-	-
Антибактериальный	0.538	0.013	0.627	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Отхаркивающий	-	-	0.622	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Слабительный	-	-	0.594	0.003	-	-	-	-	-	-	0.763	0.002	-	-
Противоязвенный	-	-	-	-	0.610	0.010	-	-	-	-	-	-	0.522	0.019
Ветрогонный	-	-	-	-	0.757	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-
Спазмолитический	-	-	-	-	-	-	0.824	0.004	0.877	0.003	-	-	-	-
Желчегонный	-	-	-	-	0.792	0.003	0.764	0.003	0.689	0.004	-	-	-	-
Вяжущий	-	-	-	-	-	-	0.516	0.003	0.740	0.002	-	-	-	-
Кровоостанавливающий	-	-	-	-	-	-	0.556	0.004	0.597	0.004	-	-	-	-
Ранозаживляющий	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.606	0.006
Антидиабетический	-	-	0.614	0.011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: P_a – вероятность наличия фармакологической активности, P_i – вероятность отсутствия фармакологической активности.

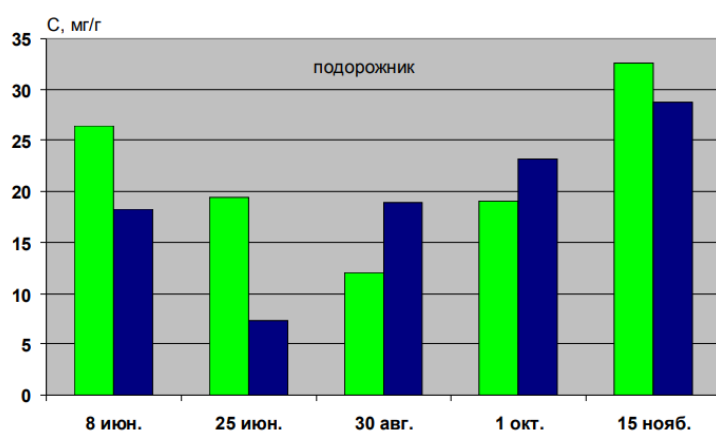


Рис.4. Суммарное содержание фенольных антиоксидантных в экстрактах экологически «чистых» (левые столбики) и экологически «грязных» (правые столбики) листьев подорожника

Проведенные в работе [4] исследования сезонной динамики содержания фенольных антиоксидантов в водных экстрактах листьев подорожника показывают, что накопление полифенольных соединений является динамическим процессом, который зависит от стрессового и возрастного факторов, а также от освещенности. Сезонные колебания сильнее проявляются для экологически неблагоприятных мест произрастания.

Изучение антиоксидантного статуса растений является удобной моделью для оценки устойчивости растений к антропогенным воздействиям [5]. В ходе исследований выявлено, что в условиях хронического загрязнения окружающей среды у подорожника большого в градиенте антропогенной нагрузки происходят существенные изменения на разных уровнях организации – молекулярном, клеточном, тканевом и организменном.

2. Экспериментальная часть

2.1. Количественное определение аскорбиновой кислоты [7]

Точную навеску (около 5 г) растительного материала растереть в фарфоровой ступке в 20 мл 1%-ной соляной кислоты. К полученному гомогенату добавить 100 мл 1%-ного раствора щавелевой кислоты. Через 5 минут отфильтровать через складчатый фильтр в сухую колбу.



В колбу для титрования отмерить пипеткой 5 мл отфильтрованного окрашенного экстракта, добавить мерным цилиндром 5 мл хлороформа и оттитровать 0,001 н раствором 2, 6-дихлор-фенолиндофенола при осторожном

перемешивании, наклоняя пробирку. Титрование прекратить при появлении красного окрашивания в слое хлороформа.



Для оценки поправки на реагенты приготовить контрольный раствор. В качестве контрольного раствора использовать 5 мл смеси из 1%-ных растворов соляной и щавелевой кислот (в соотношении объемов 1:5) и 5 мл хлороформа. Объем титранта, пошедший на контрольный опыт, необходимо вычесть из объема титранта, пошедшего на титрование опытного образца. Рассчитать массовую долю аскорбиновой кислоты (C_{AK} , мг %) по формуле

$$C_{AK} = \frac{T \times V_1 \times V_2}{m \times V_3} \times 100,$$

где T – титр 0,001 н раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте, 0,088 мг/мл;

V_1 – объем 0,001 н раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование экстракта с учетом поправки на реагенты, мл;

V_2 – общий объем экстракта, 100 мл;

V_3 – объем экстракта, взятого на титрование, 15 мл;

m – масса навески исследуемого материала, г;

100 – коэффициент пересчета на 100 г.

2.2. Определение молекулярных дескрипторов

Для поиска новых лекарственных препаратов и характеристики химических соединений используются молекулярные дескрипторы (характеристики), характеризующих его взаимодействие с биологической «мишенью».

Классификация дескрипторов основывается на учете эффекта, который описывает данный дескриптор. Обычно рассматривают три категории эффектов: электронные, стерические и межмолекулярные.

Для определения дескрипторов органических соединений в программе **HyperChem** имеется специальный блок *QSAR Properties (Quantitative «Structure – Activity» Relationships – Количественная связь между структурой молекулы и химической активностью вещества)*.

Ниже перечислены дескрипторы, включенные в блок *QSAR Properties* (рис. 5).

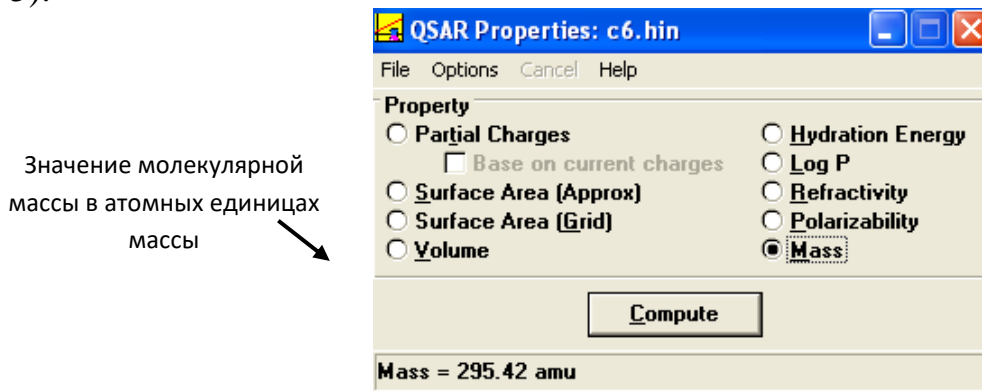


Рис. 5 Диалоговое окно *QSAR Properties* (рассчитана молекулярная масса).

Mass – молекулярная масса, дескриптор элементного уровня.

Partial Charges – заряды на атомах в молекуле, дескрипторы электронной структуры, характеризуют электростатическую составляющую внутримолекулярных взаимодействий.

Surface Area – площадь поверхности молекулы S } дескрипторы молекулярной формы (стерические)

Volume – молекулярный объем V

Log P – липофильность

Refractivity – рефракция

Polarizability – поляризуемость

Hydration Energy – энергия

водородной связи

} дескрипторы межмолекулярного взаимодействия

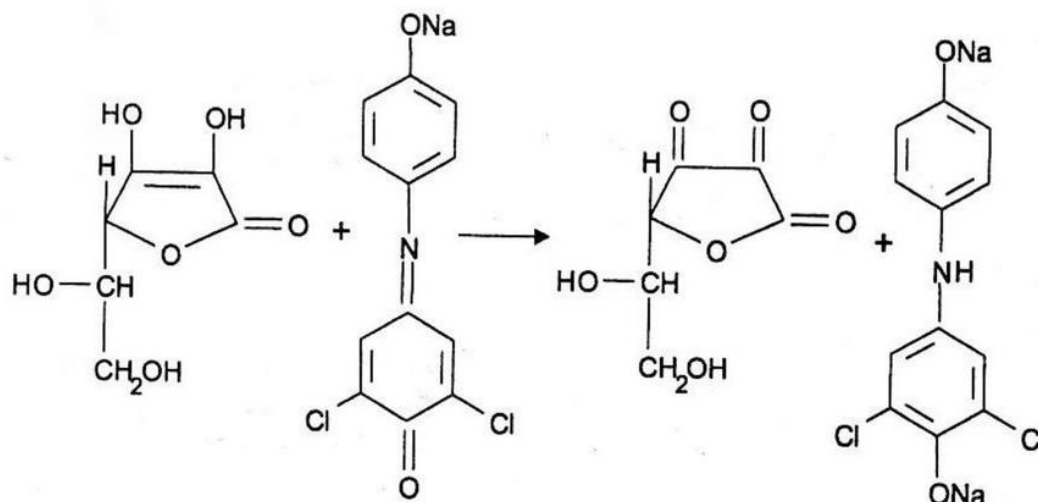
Липофильность – самая распространенная группа дескрипторов межмолекулярных взаимодействий. Она характеризует транспортные свойства соединений в биологических объектах. В подавляющем числе случаев для количественного описания липофильности берется распределение (P) вещества в модельной системе октанол–вода.

Знание молекулярных дескрипторов помогает сделать прогноз о биологической активности вещества.

3. Обсуждение результатов

3.1. Содержание аскорбиновой кислоты в подорожнике большом

Предварительный качественный анализ на аскорбиновую кислоту с 2, 6-дихлорфенолиндофенолом дал положительный результат:



Определение аскорбиновой кислоты в листьях подорожника большого собранного на разных этапах вегетации и в аптечном сборе проводили титриметрическим методом по методике, представленной в экспериментальной части. Результаты определений приведены в таблице 2. На титрование контрольной пробы пошло 0,05 мл 0,001 н раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола.

Таблица 2

Данные титрования и количественное содержание аскорбиновой кислоты в подорожнике большом

	V1, мл	V2, мл	V3, мл	V _{ср} , мл	C _{АК} , мг %
Июньский сбор	0,15	0,17	0,15	0,16	4,03
Июльский сбор	0,25	0,25	0,27	0,26	7,39
Аптечный сбор	0,15	0,12	0,15	0,14	3,37

Из данных таблицы видно, что содержание аскорбиновой кислоты в подорожнике большом для июньского и аптечного сборов имеет близкие значения и более низкие, по сравнению с июльским (рис.6).

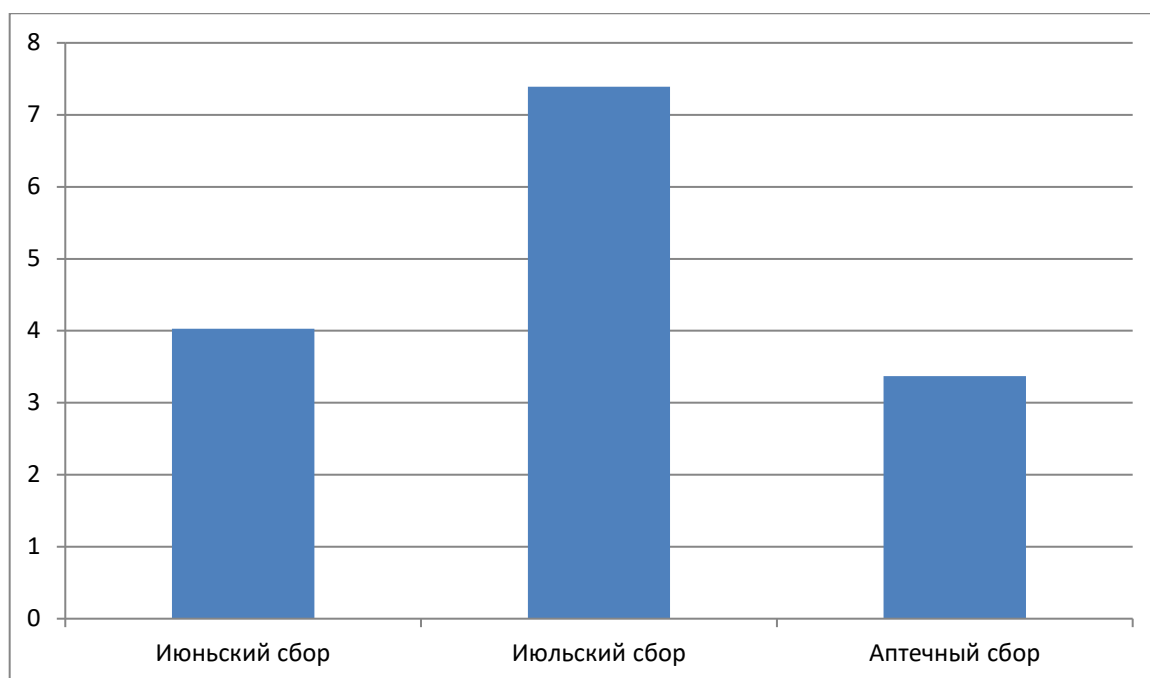


Рис.6. Диаграмма содержания аскорбиновой кислоты в подорожнике

3.2. Молекулярные дескрипторы аскорбиновой кислоты, определенные в программе NuregChem представлены в таблице 3.

Таблица 3

Рассчитанные молекулярные дескрипторы

Число доноров водор. связи	Число акцепторов водор. связи	m а.е.м.	V, Å ³	S, Å ²	logP
4	6	176,13	477,38	322.81	-2,44

Липински [8] были сформулированы требования к молекулам лекарственных препаратов (правила), основанные на значениях молекулярных дескрипторов:

1. Молекула лекарственного вещества должна иметь молекулярную массу не более 500 а.е.м.;
2. Липофильность $\lg P$, определяемая коэффициентом распределения (P) в системе «октанол–вода», должна быть менее 5;
3. В молекуле должно быть не более пяти доноров водородной связи, т. е. связей -O-H, >N-H, -S-H;
4. В молекуле должно быть не более 10 атомов азота и кислорода (грубая оценка числа акцепторов водородной связи).

Данные, представленные в таблице 3, показывают, что молекула аскорбиновой кислоты соответствует всем критериям Липински и относится к числу лекарственных веществ.

4. Заключение

Исследование показано, что экстракты листьев подорожника большого обладают широким спектром антиоксидантной активности и являются перспективными для производства медицинских препаратов на их основе. Одним из компонентов антиоксидантной системы растений является аскорбиновая кислота.

Определенное титриметрическим методом содержание аскорбиновой кислоты в подорожнике большом для июньского и аптечного сборов имеет близкие значения и более низкие, по сравнению с июльским.

Антиоксидантная активность доказывает целесообразность дальнейшего поиска путей применения экстрактов подорожника большого в целях замены синтетических антиоксидантов экологически чистыми, доступными и безопасными препаратами растительного происхождения.

5. Список литературы

1. Пастушкова Е.В. Анализ растительного технического сырья с высокой антиоксидантной активностью, произрастающего на территории Свердловской области/ Е.В Пастушкова// Научное обозрение. Технические науки. – 2016. - №3. - с. 78–86.
2. А.К. Джаманбалиева, Р.А Джусупова, Н.В Акатьев Исследование антиоксидантной активности Подорожника большого (*Plantago Major L.*), произрастающего в пригороде г. Уральска //Биологические науки Казахстана – 2023. - №1. - с.23-333
3. А. А. Верлина, А. В. Бузлама, А. С. Уйманова, А. А. Гудкова Прогноз видов фармакологической активности компонентов сока подорожника большого *In Silico* и оценка его антиоксидантной активности *In Vitro* // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология Фармация, 2021, №4, с.61-67
4. В.М. Мисин, Н.Н. Сажина, А.Ю. Завьялов Сезонная динамика изменения содержания антиоксидантов фенольного типа в листьях подорожника и одуванчика //Химия растительного сырья – 2010. -№3. – с.103-106.
5. Н. В. Гончарова, Ю. В. Жильцова, В. Ф. Ковалев, С. С. Позняк Антиоксидантный статус растений как инструмент исследования их устойчивости к антропогенному воздействию // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. 2018. № 3. С. 21–33
6. Гамаюрова В.С., Ржечицкая Л. Э. Пищевая химия: учебник для студентов вузов: учебное пособие, электронное издание сетевого распространения. – М.: «КДУ», «Добросвет», 2018. – 978-5-7913-1042-2. URL: <https://bookonline.ru/node/1525/>
7. Подорожник большой URL: <https://herbana.world/plant/podorozhnik-bolshoj.html> (дата обращения 15.10.2-22)

8. *Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings (англ.) // [Adv. Drug Deliv. Rev.](#) (англ.) [рус.](#) : journal. — 2001. — March (vol. 46, no. 1—3). — P. 3—26
9. Загоскина Н.В., Катанская В.М., Назаренко Л.В., Николаева Т.Н. Изменения роста проростков и содержания низкомолекулярных антиоксидантов после обработки семян пшеницы биофлавоноидами // Вестник МГПУ. Серия «Естественные науки». 2015. № 2 (18) С. 26–34.
10. Загоскина Н. В., Назаренко Л. В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник МГПУ. Серия «Естественные науки. 2016. № 22. С. 9-23

Приложения



Рисунок 1



Рисунок 2



Рисунок 3