

УДК 581.1:631.811.98:678.048:676.034
DOI: 10.15587/2519-8025.2017.119086

ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ РОСЛИН *CALENDULA OFFICINALIS* L. ЗА ВПЛИВУ БІОСТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ

© О. М. Лупак, Г. Я. Ковальчук, Г. Л. Антоняк

Вимірюванням окисно-відновного потенціалу з використанням медіаторної системи визначено інтегральну антиоксидантну активність водних та спиртових екстрактів суцвіть рослин *Calendula officinalis*, вирощених під впливом біостимуляторів росту. З'ясовано, що спиртові екстракти рослин *C. officinalis* виявляють антиоксидантну активність у 1,5–1,6 разів вищу, ніж водні. Внесення «Вермибіомагу» найбільш сприяло зростанню антиоксидантної активності екстрактів

Ключові слова: *Calendula officinalis* L., біостимулятори росту, потенціометричний метод, антиоксидантна активність, окисно-відновний потенціал

1. Вступ

Погіршення екологічного стану довкілля, зростання захворюваності населення загострили потребу в доброякісній лікарській рослинній сировині. Для офіційної та народної медицини цінною рослиною є *Calendula officinalis* завдяки широкому спектру фармакологічних властивостей, зокрема, антиоксидантних. Каротиноїди, флавоноїди, ефірна олія, сапоніни, гірка речовина календен, смолисті та дубильні речовини, слиз, інулін, органічні кислоти, фітостерини, ферменти, аскорбінова кислота, алкалоїди, тритерпендіоли квіток *C. officinalis* зумовлюють антисептичну, протизапальну, спазмолітичну, ранозагоювальну, седативну, сечогінну, жовчогінну дію [1]. За даними літератури, найвищу антиоксидантну активність має рослина сировина з високим вмістом фенольних та поліфенольних сполук, каротиноїдів, вітамінів А, Е, К і С [2, 3]. Основними біологічно активними речовинами (БАР) *C. officinalis* є каротиноїди та флавоноїди. На вміст БАР *C. officinalis* під час вирощування впливають різноманітні фактори. У разі культивування лікарських рослин рекомендують застосовувати біостимулятори росту, які забезпечують кращу стресостійкість рослин, дають змогу більш повно реалізувати їхні потенційні можливості, закладені генетично, а також покращити якість лікарської рослинної сировини [4, 5].

2. Літературний огляд

Відомо, що антиоксиданти – це речовини, які протидіють утворенню вільних радикалів та активних форм кисню, а також запобігають розвитку захворювань, зумовлених пошкодженням структур організму вільними радикалами. До природних антиоксидантів належать речовини біогенного походження, які при хімічній взаємодії виступають інгібіторами вільнорадикального окиснення незалежно від механізму дії, проте без незворотної інактивації ферментних та генетичних систем [6].

Антиоксидантна дія флавоноїдів в організмі людини проявляється завдяки здатності їхньої фенольної структури запобігати пероксидному окисненню ліпідів та утворювати хелатні комплекси з металами. Флавоноїди пригнічують активність фер-

ментів у циклі арахідонової кислоти, знижуючи утворення біореактивних форм кисню, взаємодіють як синергісти з антиоксидантними вітамінами, посилюючи їхній антиоксидантний потенціал [7]. Аскорбінова кислота (АК) взаємопов'язана з глутатіоном, токоферолом, бере участь в мікросомальному окисненні ендогенних речовин, стимулює активність цитохромного циклу, процесу гідроксилювання. Водночас АК сприяє активності цитохрому Р-450, макрофагів, нейтрофілів, фагоцитозу, проявляє антибактерійні властивості, підвищує неспецифічну резистентність організму. Антиоксидантна дія каротиноїдів полягає у послабленні впливу синглетного молекулярного кисню [6].

У багатьох дослідженнях [8, 9] проаналізована антиоксидантна активність (АОА) рослин за вмістом ферментів прооксидантно-антиоксидантної системи та проміжних продуктів пероксидного окиснення ліпідів. З метою визначення інтегральної АОА доцільно використовувати електрохімічні методи, зокрема, кулонометричний [3, 10] та потенціометричний [11, 12]. Потенціометричний метод дослідження характеризується високою чутливістю, простотою у виконанні, інформативністю та доступною вартістю.

У попередніх дослідженнях автори вивчали дію біостимуляторів «Вермибіомаг», «Вермийодіс» та «Вермистим» на активність ензимів антиоксидантної системи у рослинах *C. officinalis* в умовах Західного Лісостепу України [4]. Доцільним, з наукової точки зору, було б проаналізувати дію цих біостимуляторів на АОА екстрактів рослин *C. officinalis*.

3. Мета та задачі дослідження

Мета роботи – дослідити вплив біостимуляторів росту «Вермибіомаг», «Вермийодіс» та «Вермистим» на АОА водних та спиртових екстрактів рослин *C. officinalis* сорту «Польова красуня», вирощених у зоні Передкарпаття України.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

– отримати водні та спиртові екстракти суцвіть рослин *C. officinalis*, вирощених під впливом біостимуляторів росту;

– дослідити та порівняти їхню АОА.

4. Матеріали та методи дослідження

Рослини *S. officinalis* культивували впродовж 2015 року на навчально-дослідній ділянці Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (дерново-підзолисті ґрунти зони Передкарпаття) відповідно до методики проведення польових дослідів [13]. Аналіз хімічного складу ґрунту показав, що рН ґрунту слабкокисло, вміст гумусу в орному шарі – 2,1 %, забезпеченість поживними речовинами – середня.

Біостимулятори вносили в ґрунт дослідних ділянок двічі: у фенологічних фазах сходів та бутонізації рослин із нормою внесення 5 л/га. Як контроль використовували польові ділянки, у ґрунт яких під час культивування *S. officinalis* не вносили біостимулятори росту. Повторність досліду була трьохразовою. Облікова площа ділянки становила 10 м².

Метеорологічні умови 2015 р. відрізнялися від середніх багаторічних, особливо під час вегетації рослин. У цей період середньомісячна температура була дещо відмінною від середньої багаторічної. Прохолодна погода у квітні-травні та суха і жарка погода в липні-серпні впливала на ріст, розвиток, продуктивність рослин *S. officinalis*.

Матеріалом для дослідження були суцвіття рослин *S. officinalis*, зібрані із різних дослідних ділянок. Висушену до повітряно-сухого стану сировину подрібнювали до розмірів частинок 5 мм. Водні екстракти (настої) суцвіття *S. officinalis* готували відповідно до вимог Державної Фармакопеї XI [14], а спиртові витяжки – способом мацерації згідно з Державною Фармакопеєю України [15].

Визначення АОА проводили потенціометричним методом за допомогою медіаторної системи, модифікувавши два методи – Брайніної і співроб. [12] та Аронбаєва і співроб. [13]. Потенціометрію проводили з використанням приладу марки рН-301 в режимі вимірювання окисно-відновного потенціалу (ОВП). Як індикаторний електрод використовували платиновий електрод марки ЭПЛ-02, а як електрод порівняння – хлорсрібний електрод марки ЭВЛ-1М3.1, заповнений розчином калій хлориду з концентрацією 3 моль/дм³.

Медіаторна система складалася з 0,01 М K₃[Fe(CN)₆] і 0,0001 М K₄[Fe(CN)₆] в 0,066 М фосфатному буфері з рН 7,2 [12]. Спочатку вимірювали потенціал платинового індикаторного електроду в медіаторній системі. Для визначення АОА екстрактів 0,2 мл досліджуваного розчину змішували з 10 мл медіатора. Після встановлення рівноваги визначали потенціал платинового індикаторного електроду в отриманій суміші.

Як стандарт АОА використовували свіжотовлені водні та спиртові розчини АК із концентрацією 1 мг/мл з метою їх калібрування для наступного дослідження водних і спиртових екстрактів суцвіття *S. officinalis* [1].

Було досліджено зміну потенціалу в часі після додавання різних об'ємів (0,2; 0,4; 0,6 мл) стандартного водного розчину АК з концентрацією 1 мг/мл. Потенціал медіаторної системи після додавання розчину АК та перемішування суміші протягом 60 с суттєво змінювався вже за перші 15 с, помітні зміни по-

тенціалу у всіх випадках виявлялися аж до 50–60 с, а далі величина потенціалу стабілізувалася і після 100–150 с спостерігали поступове зростання величини ОВП. Ділянку поступового зростання потенціалу можна пояснити взаємодією кисню, розчиненого у водній медіаторній системі, з відновленою формою медіаторної системи і переходом її в окиснену форму. За отриманими часовими залежностями потенціалу для кінцевого вимірювання найбільш доцільно прийняти середнє значення на горизонтальній ділянці в межах від 50 до 150 с, де система прийшла до стану рівноваги і ще не відбувалося помітного зростання потенціалу внаслідок впливу розчиненого кисню. На рис. 1 наведено приклад залежності кінцевого значення потенціалу після додавання до медіаторної системи відповідних об'ємів стандартного розчину АК від від'ємного десяткового логарифму розрахованої концентрації АК в медіаторному розчині.

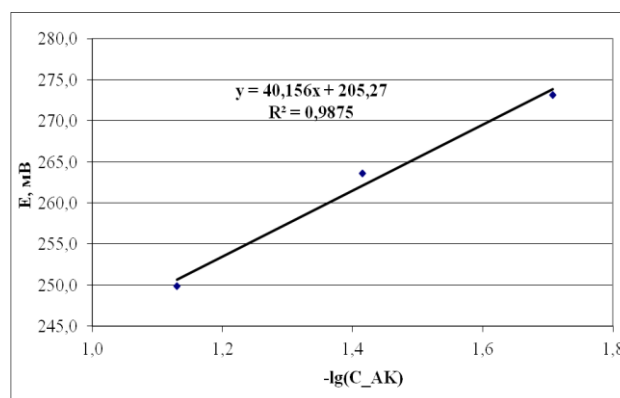


Рис. 1. Залежність кінцевого вимірювання потенціалу після додавання до медіаторної системи стандартного розчину АК (1 мг/мл) від $-lg[C(АК)]$ в медіаторному розчині

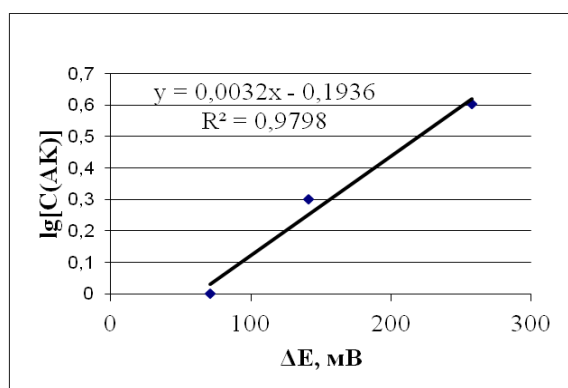
За отриманою залежністю (рис. 1) автори оцінили мінімальну розраховану концентрацію АК в медіаторному розчині. Отримана оцінка для граничної концентрації АК в 0,2 мл доданого стандартного розчину є співрозмірною з величиною біля 0,1 мг/мл, яка наведена в дослідженні [1].

Для калібрування медіаторної системи відносно АК було приготовлено три стандартні розчини з концентрацією АК – 1, 2, 4 мг/мл. Калібрувальні залежності медіаторної системи для визначення АОА будували в координатах «різниця потенціалу до та після додавання розчину АК – логарифм концентрації АК в початковому стандартному розчині» для водного та спиртового розчинів АК, відповідно.

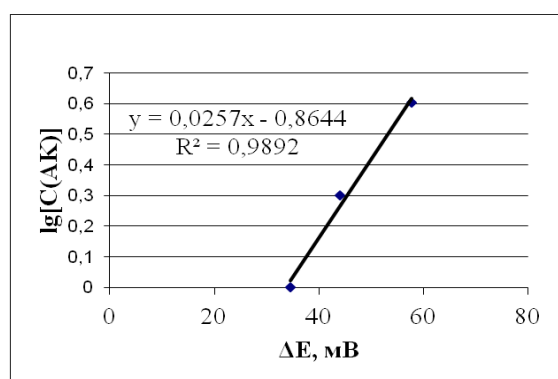
Ці калібрувальні залежності отримували щоразу під час визначення АОА нової серії екстрактів. Як видно з рис. 2, медіаторна система є більш чутливою (згідно нахилу у $0,0257 / 0,0032 = 8$ разів) до спиртових розчинів АК, що, очевидно, зумовлено впливом етанолу. Оцінка межі чутливості методу для моменту, коли різниця потенціалу до та після додавання розчину АК дорівнює нулю, дає такі величини концентрацій АК в стандартному розчині:

- 1) для спиртового розчину 0,63 мг/мл;
- 2) для водного розчину 0,13 мг/мл. Отримані величини оцінок ще раз підтверджують доцільність

застосування для калібрування діапазону концентрацій АК від 1 до 4 мг/мл.



а



б

Рис. 2. Приклади калібрувальних залежностей медіаторної системи для визначення АОА: а – спиртовий розчин АК; б – водний розчин АК

Величину антиоксидантної активності АОАх для досліджуваних екстрактів обчислювали за загальною формулою для отриманих калібрувальних залежностей (1):

$$\lg[C(AK)] = A \cdot \Delta E + B, \quad (1)$$

де А, В – коефіцієнти калібрувальних залежностей, згідно з методом найменших квадратів, який реалізо

вано в табличному процесорі Microsoft Excel; ΔE – різниця між ОВП медіаторної системи перед додаванням та після додавання розчину, в якому вимірювали АОА.

Таким чином, АОАх в одиницях концентрації АК (мг/мл) в екстракті визначали за формулою (2):

$$AOA_x = 10^{\lg[C(AK)]}, \quad [\text{мг АК/мл}] \quad (2)$$

Результати обробляли статистично за допомогою програми Microsoft Excel.

5. Результати досліджень та їх обговорення

Встановлено, що екстракти рослин *S. officinalis* сорту «Польова красуня», культивованих у зоні Передкарпаття за дії біостимуляторів росту, мають вищу АОА, порівняно із контролем (без внесення стимуляторів). Як свідчать показники ОВП водних екстрактів суцвіть рослин *S. officinalis*, АОА є вищою на 15,3–22,9 % у варіантах із застосуванням біостимуляторів, порівняно із контролем ($P \geq 0,95$) (рис. 3). У водних екстрактах найвищі показники АОА спостерігали у варіанті із внесенням «Вермибіомагу» (на 22,9 % над контролем). Дещо нижчі результати, порівняно із «Вермибіомагом», отримано у варіантах із внесенням «Вермийодісу» (на 17,1 % вище від контролю) та «Вермистиму» (на 15,3 % вище від контролю). Достовірною є різниця між варіантами із внесенням біостимуляторів «Вермибіомаг» та «Вермистим», а також «Вермийодіс» та «Вермистим».

Встановлено, що спиртові екстракти рослин, вирощених за дії біостимуляторів росту «Вермибіомаг», «Вермийодіс» та «Вермистим» мають на 24,2, 21,7 та 15 %, відповідно, вищу АОА від контролю.

З'ясовано, що спиртові екстракти суцвіть рослин *S. officinalis* у 1,5–1,6 разів проявляють вищу АОА, ніж водні.

Отримані результати узгоджуються із даними, отриманими в інших працях, у яких досліджували водні та спиртові екстракти лікарських рослин [1].

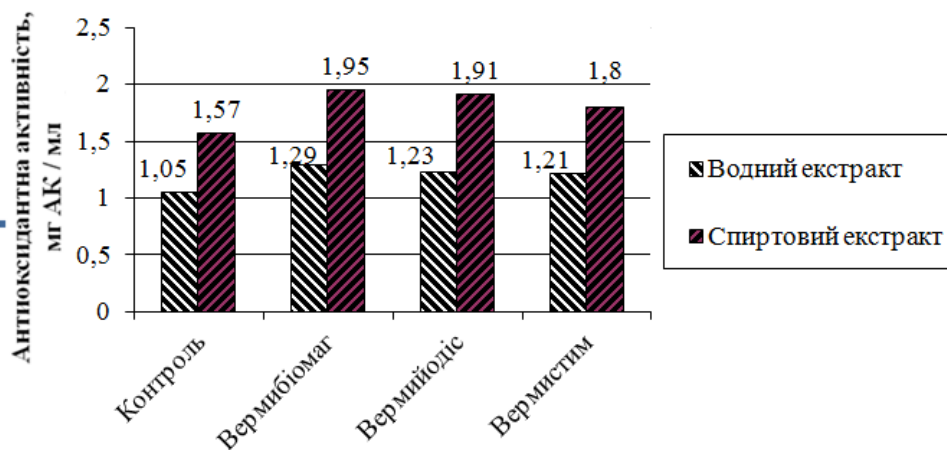


Рис. 3. Антиоксидантна активність водних та спиртових екстрактів рослин *S. officinalis* ($M \pm m$, $n=5$, $P \geq 0,95$)

6. Висновки

1. Отримано водні та спиртові екстракти суцвіть рослин *C. officinalis* сорту «Польова красуня», вирощених під впливом біостимуляторів росту «Вермибіомаг», «Вермийодіс» та «Вермистим» в умовах Передкарпаття України.

2. З'ясовано, що як водні, так і спиртові екстракти суцвіть рослин *C. officinalis* володіють антиоксидантною активністю.

3. Виявлено підвищення антиоксидантних властивостей водних екстрактів рослин *C. officinalis*, під впливом біостимулятора росту «Вермистим» – на 15,3 %, «Вермийодіс» – на 17,1 %, «Вермибіомаг» – на 22,9 % порівняно з контролем.

4. Встановлено, що спиртові екстракти суцвіть рослин *C. officinalis* мають вищу антиоксидантну активність у 1,5–1,6 разів, ніж водні.

Література

1. Сафонов, М. М. Повний атлас лікарських рослин [Текст] / М. М. Сафонов. – Тернопіль: Навчальна книга – Богдан, 2010. – 381 с.
2. Гойко, І. Ю. Визначення окислювально-відновлювального потенціалу для характеристики антиоксидантної активності нетрадиційної рослинної сировини [Текст] / І. Ю. Гойко // Харчова промисловість. – 2013. – № 14. – С. 6–9.
3. Головка, М. П. Антиоксидантні властивості деяких видів рослинної сировини [Текст] / М. П. Головка, Н. М. Пенкіна, В. В. Колесник // Східно-Європейський журнал передових технологій. – 2011. – Т. 4, № 6 (52). – С. 9–11. – Режим доступу: <http://journals.urau.ua/eejet/article/view/1414>
4. Лупак, О. М. Вплив біостимуляторів на активність ензимів антиоксидантної системи у рослинах *Calendula officinalis* L. в умовах Західного Лісостепу України [Текст] / О. М. Лупак, Г. М. Клепач, Г. Л. Антоняк // Біологічні студії. – 2017. – Т. 11, № 3-4. – С. 28–29.
5. Терек, О. І. Ріст і розвиток рослин [Текст]: навч. пос. / О. І. Терек, О. І. Пацула. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – 328 с.
6. Горчакова, Н. О. Антиоксидантні засоби – необхідні компоненти комплексної фармакотерапії [Текст] / Н. О. Горчакова, С. А. Олійник, К. Г. Гаркава, Л. П. Купраш, І. С. Чекман, В. А. Туманов та ін. // Фітотерапія в Україні. – 2000. – № 1 (9). – С. 7–13.
7. Чекман, І. С. Флавоноїди – клініко-фармакологічний аспект [Текст] / І. С. Чекман // Фітотерапія в Україні. – 2000. – № 2. – С. 3–5.
8. Гришко, В. М. Вплив регуляторів росту на стійкість проростків кукурудзи, розвиток процесів пероксидного окиснення ліпідів і вміст аскорбінової кислоти за сумісної дії кадмію і нікелю [Текст] / В. М. Гришко, Т. А. Демура // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 4. – С. 335–343.
9. Колупаєв, Ю. Є. Активні форми кисню і антиоксидантна система при перехресній адаптації рослин до дії абіотичних стресорів [Текст] / Ю. Є. Колупаєв, О. І. Обозний // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: біологія. – 2013. – № 3 (30). – С. 18–31.
10. Євлаш, В. В. Адаптація методу кулонометричного титрування щодо визначення антиоксидантної активності рослинної сировини та дієтичних добавок [Текст] / В. В. Євлаш, В. Г. Михайленко, В. О. Акмен // Східно-Європейський журнал передових технологій. – 2011. – Т. 5, № 3 (53). – С. 56–59. – Режим доступу: <http://journals.urau.ua/eejet/article/view/1196>
11. Аронбаєв, Д. М. Исследование антиоксидантной активности растительности Ферганской долины [Текст] / Д. М. Аронбаєв, В. А. Тен, М. Ф. Юлаєв, С. Д. Аронбаєв // Молодой учёный. – 2015. – № 4 (84). – С. 30–34.
12. Ivanova, A. V. Potentiometric Study of Antioxidant Activity: Development and Prospects [Text] / A. V. Ivanova, E. L. Gerasimova, K. Z. Brainina // Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2015. – Vol. 45, Issue 4. – P. 311–322. doi: 10.1080/10408347.2014.910443
13. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта [Текст] / А. Б. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
14. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье [Текст]. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
15. Державна Фармакопея України. Т. 3 [Текст]. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – 732 с.

Дата надходження рукопису 31.10.2017

Лупак Оксана Миколаївна, викладач, Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка, вул. І. Франка, 24, м. Дрогобич, Україна, 82100
E-mail: oksana_lupak@ukr.net

Ковальчук Галина Ярославівна, кандидат біологічних наук, доцент, Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка, вул. І. Франка, 24, м. Дрогобич, Україна, 82100
E-mail: galynakovalchuk5@gmail.com

Антоняк Галина Леонідівна, доктор біологічних наук, професор, Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Університетська, 1, м. Львів, Україна, 79000
E-mail: halyna_antonyak@yahoo.com