

УДК 544.72:547.96

БИОАКТИВНЫЕ КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ КРЕМНЕЗЕМ-ЖЕЛАТИНОВЫХ МАТРИЦ И ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ МАГНОЛИЙ

О.Н. Ставинская ^{1*}, И.В. Лагута ¹, О.И. Дзюба ², Р.В. Иванников ², Т.В. Фесенко ¹

¹ *Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, okstavinskaya@yahoo.com*

² *Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко Национальной академии наук Украины
ул. Тимирязевская, 1, Киев, 01014, Украина, nbg@nbg.kiev.ua*

*Получены водно-спиртовые экстракты листьев магнолий *Magnolia sieboldi* K.Koch., *Magnolia kobus* DC. Engl., *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod., *Magnolia stellata* (Sieb.et Zucc.) Maxim. Изучены их состав и антиоксидатные свойства. На основе выделенных экстрактов и кремнезем-желатиновых матриц получены биоактивные композиты, исследовано их набухание в водной среде и десорбция антиоксидантов из композитов в воду.*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время возрастает интерес к поиску, разработке и всестороннему исследованию антиоксидантов природного происхождения из доступного и дешевого растительного сырья. Антиоксиданты (АО), т.е. вещества, способные значительно замедлять или предотвращать окисление субстрата [1], широко используются в составе лекарственных средств, в косметологии, пищевой промышленности, ветеринарии. Источниками природных АО для отечественной фармакологической промышленности могут быть, например, такие лекарственные растения, как календула, ромашка, подорожник, мелисса, шиповник, черемуха. В качестве потенциально интересного и богатого биологически активными соединениями сырья можно рассматривать и магнолии. Согласно результатам исследования [2], кора и цветы магнолий особенно богаты такими природными АО, как фенолы, флавоноиды, танины. Ценной особенностью этих растений, наряду с высоким содержанием в них биоактивных веществ, является высокая степень экстракции АО не только в спиртовые растворы, но и в водную среду [2]. Большое количество видов и экземпляров магнолий представлены в коллекции Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко НАН Украины, а использование технологий асептического размножения может обеспечить быстрое наращивание биомассы, необходимое для получения промышленных количеств биоактивных веществ.

Наряду с поиском новых природных АО большое внимание уделяют созданию форм и композиций, обеспечивающих максимально эффективное действие активного вещества. Создание конкретной композиции или лекарственной формы может решить такие задачи, как объединение в одном составе нескольких активных веществ, увеличение стабильности препаратов при хранении, обеспечение пролонгированного действия активного вещества. Одной из перспективных лекарственных форм пролонгированного действия являются содержащие АО кремнезем-желатиновые композиты. Добавление кремнезема в желатиновые капсулы или пластинки приводит, в целом, к уменьшению их набухания в водной среде и к замедлению высвобождения инкорпорированного в композит активного вещества [3, 4]. Активное вещество, в свою очередь, может влиять на взаимодействие кремнезема и желатина и, соответственно, на свойства получаемых композитов. Целью настоящей работы было предварительное тестирование антиоксидантных свойств экстрактов из листьев магнолий и оценка их потенциальной пригодности для использования в составе кремнезем-желатиновых композитов пролонгированного действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В эксперименте использовали свежие листья четырех видов магнолий из коллекции Национального ботанического сада им. Н.Н. Гришко. Экстракцию биоактивных веществ проводили в 70 % раствор этанола согласно методике, опи-

* контактный автор okstavinskaya@yahoo.com

санной в [5]. Условия получения и обозначения полученных экстрактов приведены в табл. 1.

Табл. 1. Условия получения и обозначения экстрактов

Сырье	Условия экстракции	Образец
<i>Magnolia sieboldii</i>	соотношение сырья и экстрагента 1 г/100 мл, время экстракции 30 мин	М1
<i>Magnolia kobus</i>		М2
<i>Magnolia soulangeana</i>		М3
<i>Magnolia stellata</i>		М4

Качественной анализ содержащихся в экстрактах АО проводили с использованием методов тонкослойной хроматографии [6] и ЛДИ масс-спектрометрии (ЛДИ МС). В качестве реперных соединений для хроматографического анализа использовали рутин, кверцетин, кверцетрин, морин, гесперидин и метилизофлавоны.

ЛДИ масс-спектры экстрактов получали с помощью масс-спектрометра Autoflex II (Bruker Daltonics Inc, Германия), оборудованного азотным лазером ($\lambda = 337$ нм). Ионизация образцов производилась импульсами длительностью 3 нс с частотой 20 Гц. Спектры негативных ионов регистрировали с использованием линейного режима с временной задержкой экстракции ионов в 10 нс при мощности лазера 37 мДж. Исследуемые растворы наносили на стандартную металлическую подложку, предварительно обработанную графитовым карандашом, и высушивали при комнатных условиях. Каждый спектр, записанный в массовом диапазоне от 0 до 1000 а.е.м., представлял собой накопленную сумму не менее 100 отдельных масс-спектров.

Для характеристики антиоксидантных свойств экстрактов и композитов использовали методы Фолина-Чоколтеу и ДФПГ-тест. Для определения общего фенольного индекса [7] к 1 мл экстракта в 70 % спирте 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 получаса, измеряли поглощение при 750 нм и рассчитывали общий фенольный индекс [7].

Для определения антирадикальной активности АО использовали реакцию со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ) [8]. К 2 мл 70 %-го спирта добавляли 2 мл 0,15 мМ раствора ДФПГ и 1 мл экстракта, разведенного в соотношении 1:40. 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 АО.

Кремнезем-желатиновые композиты получали с использованием высокодисперсного кремнезема марки А-300 с удельной поверхностью 250 м²/г и желатина фирмы Fluka. Готовили навески желатина и кремнезема, отвечающие их содержанию 50 и 20 мг/мл соответственно в объеме 10 мл. В стаканчик с кремнеземом добавляли 4 мл дистиллированной воды и 1 мл экстракта в 70 %-м спирте и перемешивали на магнитной мешалке в течение 20 мин. В стаканчик с желатином наливали 5 мл воды, затем ставили его на водяную баню и перемешивали содержимое в течение 20 мин, до растворения желатина. После этого к раствору добавляли суспензию кремнезема в водно-спиртовом растворе и перемешивали в течение 5 мин. Композиты готовили в виде тонких пленок: 2 мл кремнезем-желатиновой суспензии выливали тонким слоем в чашки Петри диаметром 4 см и высушивали в течение нескольких суток при комнатной температуре.

В работе использовали 2 вида контроля: композиты с АО, но без кремнезема, а также желатиновые и кремнезем-желатиновые пленки без АО. Приготовление контрольных желатиновых композитов, содержащих АО, отличалось тем, что к раствору желатина добавляли 4 мл дистиллированной воды и 1 мл экстракта. При получении желатиновых и кремнезем-желатиновых пленок, не содержащих АО, к раствору желатина добавляли соответственно водно-спиртовую смесь (4 мл воды и 1 мл 70 %-го спирта) или суспензию кремнезема в водно-спиртовой смеси.

При изучении набухания пленок в водной среде сухие пленки взвешивали, опускали в воду, затем, через определенные промежутки времени, извлекали их из раствора и взвешиванием определяли прирост массы. Эксперимент по десорбции экстрактов из композитов проводили в условиях постоянного объема раствора. В стаканчик с пленкой добавляли 10 мл дистиллированной воды, через определенные промежутки времени регистрировали УФ спектры растворов. Измеряли оптическую плотность при длине волны 330 нм, соответствующей максимуму поглощения в спектрах исходных экстрактов, и с учетом калибровочных измерений оценивали долю десорбированного вещества.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 2 представлены данные о качественном составе экстрактов М1–М4, получен-

ные методами тонкослойной хроматографии и ЛДИ масс-спектрометрии.

Табл. 2. Состав экстрактов по данным тонкослойной хроматографии – 1 и ЛДИ МС– 2

Состав	M1	M2	M3	M4
рутин ¹	+	+	–	+
кверцетин ^{1,2}	+	+	+	+
кверцетрин ¹	+	+	+	+
морин ¹	–	–	+	–
кофейная кислота ²	+	+	+	+
кумариновая кислота ²	+	+	+	+
хлорогеновая кислота ²	–	+	–	–

Результаты хроматографического анализа экстрактов с использованием перечисленных выше реперных соединений показывают, что во всех исследованных образцах присутствуют кверцетин и кверцетрин. В экстрактах M1, M2 и M4 обнаруживается также рутин, а образце M3 – морин. Такие АО, как гесперидин и метилизофлаван, в листьях магнолий не идентифицируются.

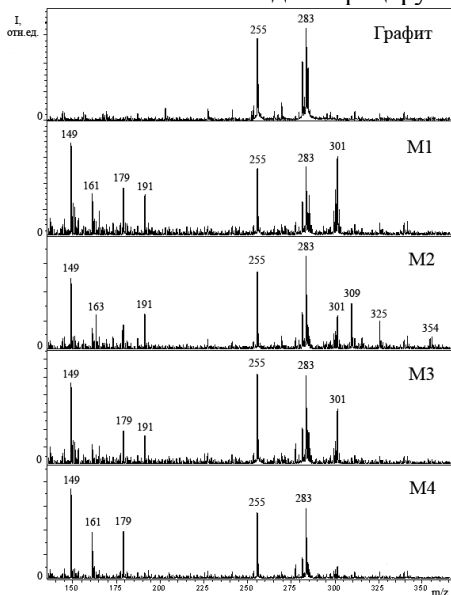


Рис. 1. ЛДИ масс-спектры экстрактов M1-M4 при десорбции с поверхности графита (негативные ионы)

Результаты анализа экстрактов методом ЛДИ МС (рис. 1) подтверждают присутствие во всех исследованных растворах кверцетина/морина (молекулярная масса обоих соединений M= 302, пик в негативной моде m/z 301) и обнаруживают также присутствие в экстрактах кумариновой (M=164, m/z 163) и кофейной кислот (M=180, m/z 179). В масс-спектре экстракта M2 наблюдается также пик m/z 354, который можно отнести к хлорогеновой кислоте (M=355). Наличие в

спектрах пиков с m/z 149, 161, 191, может быть обусловлено фрагментацией биомолекул в условиях ЛДИ эксперимента [9].

Присутствие в экстрактах кумариновой, кофейной и хлорогеновой кислот подтверждается УФ спектрами образцов (рис. 2). Как видно из рисунка, во всех спектрах наблюдается интенсивное поглощение при длине волны 330 нм, что характерно для этих соединений. Раствор кверцетина в УФ спектре имеет максимум при длине волны около 360 нм; поглощение в этой области также наблюдается во всех полученных спектрах, хотя и выражено слабее.

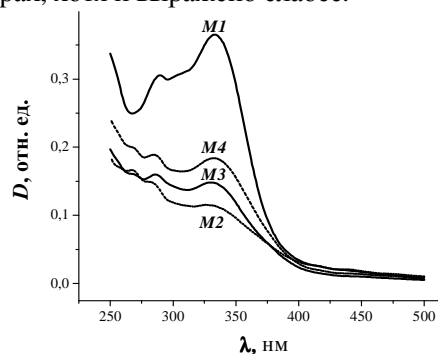


Рис. 2. УФ спектры экстрактов M1–M4 в 70 %-м спирте (разведение 1:125)

Согласно данным исследования [2], в экстрактах цветков магнолий *Michelia champaca* преобладали такие фенольные антиоксиданты как кверцетин, катехин, кофейная и кумариновая кислоты. Таким образом, по составу фенольных антиоксидантов экстракты из листьев магнолий видов *Magnolia sieboldi*, *Magnolia kobus*, *Magnolia soulangeana*, *Magnolia stellata* качественно близки к экстрактам из цветков магнолий *Michelia champaca*.

В табл. 3 приведены значения общего фенольного индекса для полученных экстрактов, характеризующие антиоксидантную способность присутствующих в них соединений.

Табл. 3. Антиоксидантная способность экстрактов M1-M4

Образец	Общий фенольный индекс	Эквивалентная концентрация аскорбиновой кислоты в экстракте, мМ
M1	7,4	3,7
M2	6,0	3,0
M3	8,0	4,0
M4	5,6	2,8
1 мМ р-р аскорбиновой кислоты	2,0	1,0

Сопоставление полученных значений фенольного индекса с соответствующими дан-

ными для аскорбиновой кислоты [10] позволяет заключить, что содержание антиоксидантов в экстрактах эквивалентно концентрации аскорбиновой кислоты от 2,5 до 4,0 мМоль. Таким образом, полученные экстракты имеют высокое содержание АО, так что листья магнолий представляются ценным сырьем для извлечения биоактивных соединений.

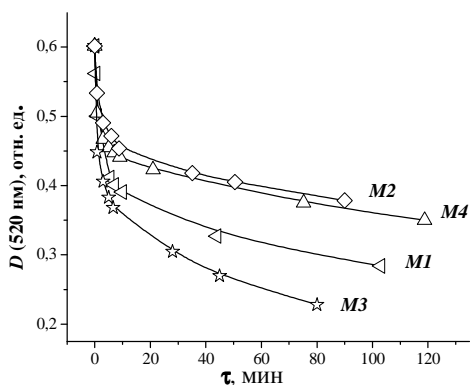


Рис. 3. Кинетические кривые гибели радикала ДФПГ в реакции с АО-компонентами экстрактов М1–М4

На рис. 3 приведены кинетические кривые гибели радикалов ДФПГ в реакции с АО, присутствующими в образцах М1–М4. Как видно из рисунка, несмотря на значительное разбавление экстрактов (1:40), все образцы демонстрируют эффективное восстановление радикалов ДФПГ. Данные по скорости восстановления радикалов коррелируют с общим фенольным индексом образцов: экстракты М1 и М3 с более высоким содержанием фенолов характеризуются и более высокой скоростью реакции с ДФПГ.

На кинетических кривых (рис. 3) можно выделить быструю (первые 5–7 мин) и медленную стадии реакции. Наличие двух стадий реакции наблюдали, например, и при взаимодействии ДФПГ с экстрактивными веществами пажиты обыкновенной и тысячелистника обыкновенного [11]. Наличие быстрой и медленной фазы процесса связано, очевидно, со сложным составом экстрактов, с присутствием в них АО, отличающихся по скорости и стехиометрии реакции с радикалом, а также с тем, что в реакции могут принимать участие не только исходные АО, но и продукты их взаимодействия с ДФПГ. Так, например, из литературных данных [10, 12, 13] известно, что такие АО, как аскорбиновая кислота характеризуются высокой скоростью восстановления радикалов ДФПГ и стехиометрией реакции 2:1, определяемой наличием в молекуле аскорбиновой кислоты двух групп, способных отдавать

радикал водорода. Реакция взаимодействия ДФПГ с кофейной кислотой [12] протекает сравнительно медленно, однако общее количество восстановленных молекул радикала, приходящееся на одну молекулу АО, составляет 4:1. Поскольку молекула кофейной кислоты содержит только 2 группы-донора водорода, можно предположить, что образующиеся на первом этапе реакции продукты окисления кофейной кислоты способны к дальнейшему взаимодействию с ДФПГ.

На рис. 4 и 5 представлены данные, иллюстрирующие свойства желатиновых пленок (образцы Gel+M1, Gel+M2, Gel+M3, Gel+M4) и кремнезем-желатиновых композитов (образцы Gel+SiO₂+M1, Gel+SiO₂+M2, Gel+SiO₂+M3, Gel+SiO₂+M4), полученных с использованием экстрактов М1–М4.

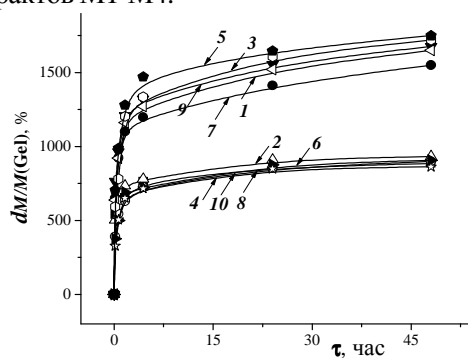


Рис. 4. Набухание в воде желатиновых пленок (1 – Gel, 3 – Gel+M1, 5 – Gel+M2, 7 – Gel+M3, 9 – Gel+M4) и кремнезем-желатиновых композитов (2 – Gel+SiO₂, 4 – Gel+SiO₂+M1, 6 – Gel+SiO₂+M2, 8 – Gel+SiO₂+M3, 10 – Gel+SiO₂+M4); τ – время, ч; dM/M(Gel) – количество поглощенной воды в отношении к массе желатина в сухих образцах, %

Как было показано ранее, кремнезем-желатиновые композиты поглощают воду, набухают и растворяются значительно медленнее, чем материалы из чистого желатина [3, 4]. Кремнезем в композите выполняет роль своеобразного сшивающего агента, что обусловлено, по-видимому, высокой концентрацией на его поверхности ≡SiO и ≡SiOH-групп, способных к электростатическим взаимодействиям с положительно заряженными участками молекул желатина и к образованию водородных связей с карбоксильными или аминогруппами биополимера [14–16]. Введение в кремнезем-желатиновую суспензию дополнительных компонентов (индивидуальных антиоксидантов или растительных экстрактов) может, со своей стороны, влиять на взаимодействие молекул желатина между собой или с кремнеземом

и на формирование пространственной структуры композита в процессе гелеобразования.

Так, например, ранее нами было показано, что композиты, содержащие в качестве активного вещества катионы тиамин, отличались от контрольных образцов очень быстрым набуханием и растворением [4]. Значительное набухание наблюдали [15] и для кремнезем-желатиновых материалов, полученных в присутствии катионов натрия. Представленные на рис. 4 данные показывают, что в нашем случае присутствие экстрактов практически не сказывается на набухании композитов, т.е. компоненты экстрактов, по-видимому, не препятствуют формированию структуры композита и не влияют на свойства получаемого материала.

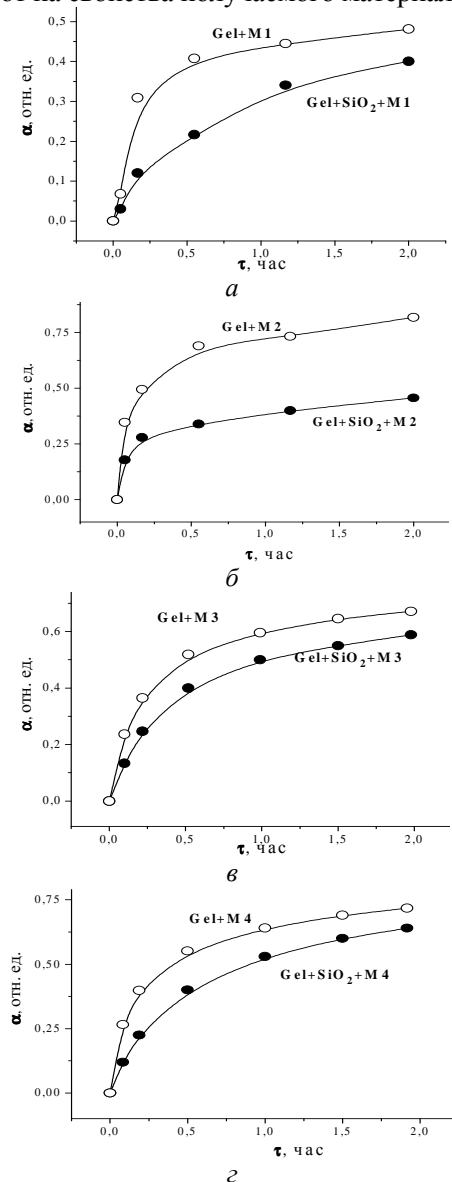


Рис. 5. Десорбция экстрактов М1–М4 из желатиновой (Gel) и кремнезем-желатиновых (Gel+SiO₂)

пленок (τ – время, час; α – доля десорбированного вещества, отн. ед.)

Кремнезем-желатиновые композиты отличаются от желатиновых пленок более медленным набуханием (рис. 4) и пролонгированным высвобождением активного вещества (рис. 5). Замедление десорбции компонентов экстрактов из кремнезем-желатиновых композитов наиболее заметно в первые несколько часов контакта материала с водой, т.е. композит обеспечивает более равномерное высвобождение АО. Через сутки количество активных веществ, десорбированных из желатиновой и кремнезем-желатиновой пленок, практически уравнивалось и составляло около 70–85 % от общего содержания их в образцах. Через двое суток практически все АО переходили в раствор, при этом десорбированные вещества проявляли антиоксидантную способность, соответствующую расчетному количеству высвобожденных АО (табл. 4).

Табл. 4. Общий фенольный индекс растворов через 2 суток контакта с композитом, эквивалентная и максимально возможная концентрация аскорбиновой кислоты в растворах 1–4 после контакта с кремнезем-желатиновыми композитами, содержащими экстракты М1–М4

Раствор	Общий фенольный индекс, мМ	Эквивалентная концентрация, мМ	Максимальная эквивалентная концентрация, мМ
1	0,14	0,07	0,07
2	0,11	0,05	0,06
3	0,16	0,08	0,08
4	0,12	0,06	0,06

Таким образом, полученные данные показывают, что экстракты листьев магнолий *Magnolia sieboldi*, *Magnolia kobus*, *Magnolia soulangeana*, *Magnolia stellata* проявляют высокие антиоксидантные свойства, а при добавлении в кремнезем-желатиновые матрицы не оказывают существенного влияния на их набухание и растворение. Биокompозиты на основе выделенных экстрактов и кремнезем-желатиновых матриц характеризуются сравнительно медленным высвобождением антиоксидантов в водную среду и представляют собой потенциально интересные объекты для использования в качестве лекарственных форм пролонгированного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunhe D.K. Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives. – New York: CRC Press, 1996. – 512 p.
2. Nagavani V., Raghava Rao T. Evaluation of antioxidant potential and identification of polyphenols by RP-HPLC in *Michelia champaca*

- by RP-HPLC in *Michelia champaca* flowers // Adv. Biol. Res. – 2010. – V.4, N 3. – P. 159–168.
3. Ставинська О.Н., Лагута І.В., Кузема П.А. Влияние высокодисперсного кремнезема на водопоглощение желатиновых материалов // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2011. – Т. 47, № 3. – С. 248–252.
 4. Ставинська О.Н., Лагута І.В. Свойства кремнезем-желатиновых композитов // Журн. физ. химии. – 2010. – Т. 84, № 6. – С. 1158–1162.
 5. Методические указания к лабораторным занятиям. Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья – Санкт-Петербург: СПХФА, 1998. – 60 с.
 6. Гродзинський А.М., Гродзинський Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – Киев: Наук. думка, 1973. – 591 с.
 7. Alonso A.M., Domínguez C., Guilleán D., Barroso 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. – V. 50. – P. 112–117.
 8. Yulky J.-H., Lee S.-Y., Han Y.-S. et al. Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanoparticle // Bull. Korean Chem. Soc. – 2003. – V. 24, N 4. – P. 49–503.
 9. Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS // Molecules. – 2007 – V. 12. – P. 593–606.
 10. Лагута І., Ставинська О., Оранська Е, Чернявська Т. Взаємодія аскорбинової кислоти з высокодисперсним кремнеземом // Доповіді НАН України. – 2009. – № 12. – С. 152–157.
 11. Волков В.А., Пахомов П.М. Кинетика взаимодействия радикала ДФПГ с экстрактивными веществами растений в различных средах // Ползуновский вестник. – 2008. – № 3. – С. 309–313.
 12. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // Lebensm. Wiss. Technol. – 1995. – V. 28. – P. 25–30.
 13. Лагута І.В., Ставинська О.Н., Кайдалова Ю.А. и др. Антиоксидантные свойства некоторых производных флавонола // Химия, физика и технология поверхности. – 2008. – № 14. – С. 483–487.
 14. Smitha S., Mukundan P., Krishna P., Warriar K.G.K. Silica-gelatin bio-hybrid and transparent nano-coating through sol-gel technique // Mater. Chem. Phys. – 2007. – V. 103. – P. 318–322.
 15. Coradin T., Bah S., Livage J. Gelatin-silicate interaction: from nanoparticles to composite gels // Colloids Surf. B. – 2004. – V. 35. – P. 53–58.
 16. Smitha S., Shajesh P., Mukundan P. et al. Synthesis of biocompatible silica-gelatin nano-hybrid by sol-gel process // Colloid Surf. B. – 2007. – V. 55. – P. 38–43.

Поступила 26.05.2011, принята 06.06.2011

Біоактивні композити на основі кремнезем-желатинових матриць та екстрактів із листя магнолій

О.М. Ставинська, І.В. Лагута, О.І. Дзюба, Р.В. Іванніков, Т.В. Фесенко

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, okstavinskaya@yahoo.com
Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка Національної академії наук України
вул. Тимірязєвська, 1, Київ, 01014, Україна, nbg@nbg.kiev.ua

Отримано водно-спиртові екстракти листя магнолій *Magnolia sieboldi* K.Koch., *Magnolia kobus* DC. Engl., *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod., *Magnolia stellata* (Sieb.et Zucc.) Maxim. Вивчено їхній склад та антиоксидантні властивості. На основі вилучених екстрактів та кремнезем-желатинових матриць одержано біоактивні композити, досліджено їхнє набухання у водному середовищі та десорбцію антиоксидантів із композитів у воду.

Bioactive composites based on silica-gelatin matrix and extracts of magnolia leaves

O.N. Stavinskaya, I.V. Laguta, O.I. Dzyuba, R.V. Ivannikov, T.V. Fesenko

Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, okstavinskaya@yahoo.com
Gryshko National Botanic Garden of National Academy of Sciences of Ukraine
1 Timiryazevskaya Str., Kyiv, 01014, Ukraine, nbg@nbg.kiev.ua

Aqueous-ethanol extracts of *Magnolia sieboldi* K.Koch., *Magnolia kobus* DC. Engl., *Magnolia soulangeana* Soul.-Bod., *Magnolia stellata* (Sieb.et Zucc.) Maxim leaves have been obtained, antioxidant potential of the extracts has been evaluated. The bioactive composites based on the extracts and silica-gelatin matrix have been prepared. The swelling of the composites and desorption of the antioxidants to aqueous medium (water) have been tested.