

## IN VITRO АНТИОКСИДАНТНИ СВОЙСТВА НА ИЗВЛЕЦИ ОТ СМРАДЛИКА (*COTINUS COGGYGRIA*)

Д. Павлов, М. Нашар, Д. Иванов<sup>1</sup>, Д. Иванова

**Key words:** *Antioxidant capacity, Polyphenol content, Aqueous and Ethanol infusions, Cotinus coggygia leaves and wood, Bulgarian Medicinal plant*

### ВЪВЕДЕНИЕ

Едно от петнадесетте най-популярни лечебни растения в България е обикновената евроазиатска смрадлика (*Cotinus coggygia* Scop., Anacardiaceae) (1). В народната медицина, листата от смрадлика (тетра) са често употребявана дрога, декоктите от която имат противовъзпалително и хемостатично действие и се използват предимно за промивки на устната кухина при зъбобол и гингивит (2), както и за компреси при гнојни рани, циреи и отоци, за промивки при бяло течение, компреси при младежки пъпки, бани при хемороиди и след изгаряне (3,4,5). Извлеките от смрадлика се използват основно външно – върху кожата и лигавиците, тъй като растението се счита за отровно (3,4). Въпреки това, има сведения за използването на воден извлек от листа и водно-алкохолен извлек от дървесина на смрадлика при диария и стомашна язва.

Листата от смрадлика имат високо съдържание на полифенолни съединения като галотанини и свободна галова киселина (3,4,5), антоцианини (6,7), флавоноиди (катехин, физетин, кверцетин, фустин, бутин и др.) (8,9). Етеричното мас-

The Eurasian smoke tree (*Cotinus coggygia* Scop., Anacardiaceae) is used by the Balkan folk medicine for its antiseptic and antimicrobial properties as well as for treatment of gingival and throat inflammations. Although that aqueous infusion from *C. coggygia* leaves has been applied mainly externally because of the large gallotannins content, there are few reports for an internal use of these infusions against gastric ulcer and diarrhea. *Cotinus coggygia* is considered to be a poisonous plant; however there are data from traditional folk medicine indicating an internal use of ethanol infusions from wood, as well. Aqueous and ethanol infusions from *Cotinus coggygia* leaves and wood were screened *in vitro* for antioxidant activity and phenolic compounds content. The aqueous infusions were prepared as herbal teas following the common use. The ethanol infusion was prepared following the traditional recipe for dyeing of high alcoholic beverages in Bulgaria. The present study confirms the high phenolic content and antioxidant potential of leaves from *C. coggygia* and may help in the identification of the medicinal plants that could contribute to sustain antioxidant status and protect against free radical damage. The high polyphenol content and antioxidant capacity of the 40% ethanol infusion is reported for the first time. It provides useful information for the development of safe food products and additives with appropriate antioxidant properties. This allows carrying out further investigation on biological effects of *C. coggygia* *in vivo*.

Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика, <sup>1</sup>Катедра по биология  
Медицински университет  
„Проф. Д-р Параскев Стоянов“ – Варна

ло е богато на терпени (лимонен, мирцен, пинен, камфен, линалоол, α-терпинеол, β-оцимен) (8,9). В дървесината се съдър-

жа предимно флавоноидите сулфуретин и фустин (10). Хроматографските анализи на запазени етнографски образци от кожи, вълни и коприна, оцветени с листа и дървесина от *C. coggygia* показват наличието на сулфуретин, физетин, фустин, кверцетин, таксифолин, бутин, бутеин, нарингенин, ликвиритигенин и изоликвиритигенин (11,12). Установените биологично активни фенолни съединения в *C. coggygia* имат добре документирана антиоксидантна активност като залавят реактивните кислородни видове, инхибират инициацията и пропацията на липидната пероксидация, и повишават активността на антиоксидантните ензими (супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, каталаза).

Водно-алкохолните извлеци от листа на смрадлика са с най-висока антиоксидантна активност и с най-високо съдържание на полифеноли измежду няколко десетки изследвани български лечебни растения (13,14). Тази биологична активност дава основание традиционно използваният воден извлек от листата на смрадлика да се сравни по отношение на полифенолно съдържание и *in-vitro* антиоксидантна активност с алкохолния извлек от дървесина, използвана сравнително рядко за оцветяването на традиционно употребяваните у нас високоалкохолни напитки, тъй като в научната литература липсват данни за антиоксидантните свойства на извлеци от дървесина на смрадлика.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

*Извлек от листа.* Изходният материал за приготвяне на водните извлеци от листа на смрадлика (*C. coggygia*) представлява търговски продукт на "Билек"ООД – Троян, който се продава без лекарско предписание в аптечната мрежа на град Варна. Приготвянето на водния извлек става като 4 g от листата на суха дрога се запарват за 10 min със 100 ml вряща вода, след което се филтрат и с разреждане 2 и 4 пъти се получа-

ват три извлека с три различни концентрации, съответно 1%, 2% и 4%.

*Извлек от дървесина.* Изходният материал за приготвянето на водно-алкохолния извлек от дървесина е суха сърцевина на стъблото на дървесен екземпляр от смрадлика. За приготвянето на извлека е следвана пропорция от традиционна рецепта за оцветяване на ракия: 2 g дървесина за литър ракия. Проба от дървесината се внася в 40% етанол и престоява в тъмна стъклена бутилка в продължение на 90 дни. За проследяване изменението в полифенолното съдържание и антиоксидантната активност на водно-алкохолния извлек в зависимост от времето, са взети 6 проби от 1 ml през първите 6 дни след внасянето на дървесината в етанола, а останалите 8 проби са взети съответно на 9, 13, 15, 20, 30, 45, 60 и 90 ден.

*Общото полифенолно съдържание (ОПС)* е определяно посредством спектрофотометричен метод (15). Методът се основава на способността на фенолните съединения да формират молибден-волфрамов комплекс с реактива на Folin-Ciocalteu, който представлява смес от фосфомолибденова и фосфоволфрамова киселина. Фенолните съединения имат способността да се окисляват, като отдават електрон при алкално рН и да редуцират фосфомолибденовите и фосфоволфрамовите комплекси.

В епруветка се накапват 150µl извлек, 750µl реактив на Folin-Ciocalteu, разреден *ex tempore* с дестилирана вода в съотношение 1:10 и 600µl 7.5% разтвор на Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Инкубира се за 10 min на водна баня при 50°C, след което се охлажда със студена вода за 5 минути. Отчита се абсорбцията срещу празната проба при λ=760 nm. За празната проба, вместо извлек се използва дестилирана вода. Абсорбцията се изчислява по формулата:

$$A = A_{\text{проба}} - A_{\text{празна проба}}$$

Концентрацията на полифенолите е определена чрез калибровъчна крива, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори на кверце-

тин и е представена като mM еквиваленти кверцетин (QE). Измерванията са извършени на спектрофотометър M 501.

Антиоксидантната активност (АОА) е определяна чрез АВТС [2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал обезцветяващ метод (16). Методът се основава на консумацията на преформирания в присъствието на калиев персулфат АВТС радикал (АВТС·+), чийто абсорбционен максимум е при  $\lambda=734$  nm. В присъствие на антиоксиданти, АВТС·+ се редуцира до АВТС. По намалението на абсорбцията на реакционната смес в присъствието на гасители на АВТС·+ се съди за антиоксидантната активност на изследваните извлекци. Към 1000 $\mu$ l разтвор на АВТС·+ във фосфатен буфер (PBS) (pH 7.4) се прибавят 10 $\mu$ l екстракт. Абсорбцията на разтвора предварително се довежда до стойности от  $0.700\pm 0.02$  и се отчита непосредствено преди (0 min) и 6 min след прибавяне на екстракта. За празна проба служи натриево-фосфатен буфер (PBS) (pH 7.4).

Абсорбцията на пробите се изчислява по следната формула:

$$A = (A_{\text{проба 0min}} - A_{\text{проба 6min}}) - (A_{\text{празна проба 0min}} - A_{\text{празна проба 6min}})$$

АОА е определена чрез калибровъчната крива, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори на пикочна киселина. Данните за АОА са пред-

ставени като mM еквиваленти пикочна киселина (mM UAE). Измерванията са извършени на спектрофотометър M 501.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

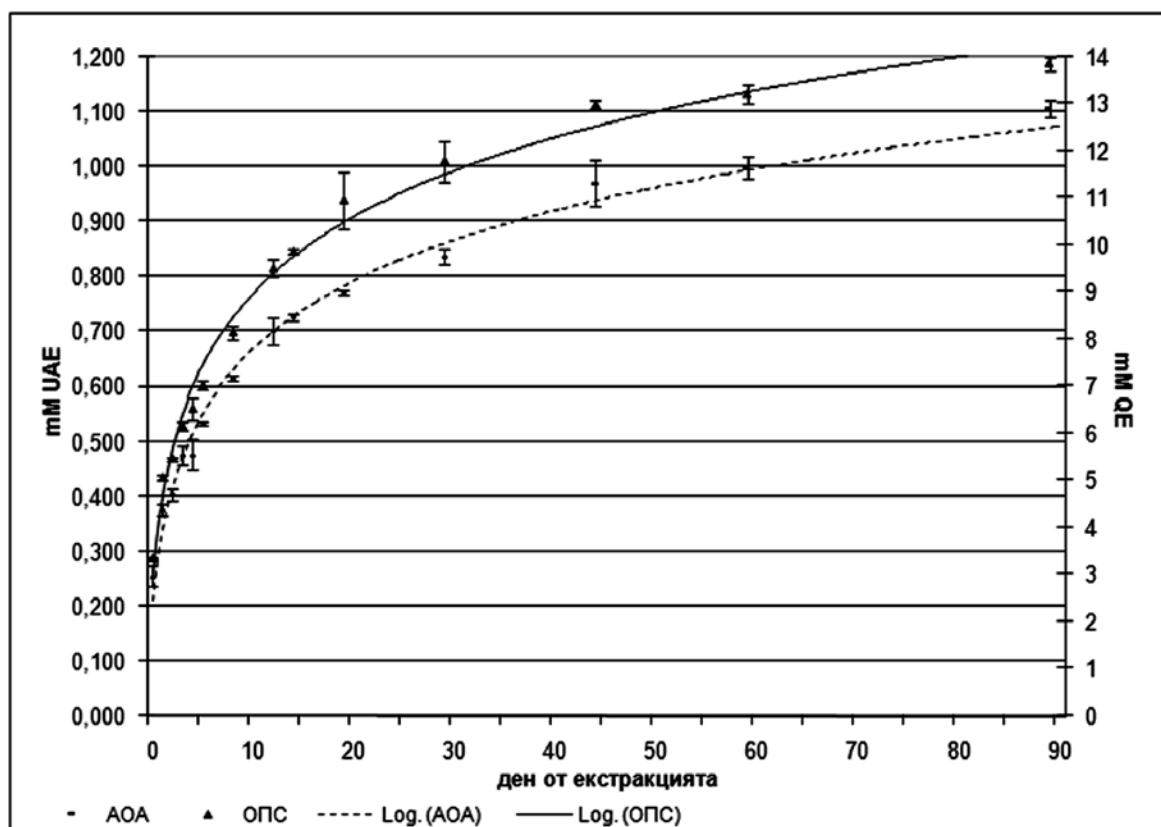
Обобщение на резултатите от измерването на общото полифенолно съдържание и антиоксидантна активност на изследваните извлекци е представено в таблица 1.

Получените резултати съответстват на известните в научната литература данни за високата *in vitro* антиоксидантна активност на водно-алкохолния извлек от листата на смрадлика (13,14), която най-вероятно се дължи на неговите съставки (главно фенолни съединения). От изследваните три водни извлекци (1%, 2% и 4%), най-близък до традиционната рецепта срещу язва на стомаха (4), е еднопроцентният извлек от листа. Интерес представлява фактът, че именно този извлек е сравним с 40% водно-алкохолния извлек от дървесина по съдържание на полифеноли в грам растителна маса.

Проследяването на изменението в ОПС и АОА на водно-алкохолния извлек от дървесина в зависимост от времето, подобно на традиционното отлежаване на домашната ракия, оцветена с дървесина от смрадлика, показва, че линейното нарастване на ОПС и съответстващата му АОА спира след 20 дни (фиг. 1). Наличието

Таблица 1. Обобщение на резултатите от измерването на ОПС и АОА на изследваните извлекци

Извлек	Общо полифенолно съдържание (ОПС) mM QE		Антиоксидантна активност (АОА) mM UAE	
<b>Воден извлек от листа на <i>C. coggyria</i></b>				
1%	71.99 $\pm$ 2.67	CV%=3.71	17.84 $\pm$ 0.11	CV%=0.62
2%	143.19 $\pm$ 2.04	CV%=1.42	33.22 $\pm$ 0.18	CV%=0.55
4%	231.28 $\pm$ 1.87	CV%=0.81	53.49 $\pm$ 0.29	CV%=0.54
<b>Водно-алкохолен извлек от дървесина на <i>C. coggyria</i> на 20 ден</b>				
40%	10.96 $\pm$ 0.59	CV%=5.35	0.77 $\pm$ 0.01	CV%=0.71



Фигура 1. Сравнение в изменението на антиоксидантната активност (АОА) и общото полифенолно съдържание (ОПС) на 40% водно-алкохолен извлек от дървесина на смрадлика (*Cotinus coggygria*)

на изключително висока корелация между АОА и ОПС ( $r=0.99$ ) показва, че именно полифенолите са основните съединения, които допринасят за АОА активност на извлеките. Такава висока зависимост за водно-алкохолни екстракти от български лечебни растения е установена и от други автори (13,14). Изхождайки от по-ниските стойности на корелационния коефициент  $r$ , някои автори (17) считат, че АОА на растителните екстракти се дължи не само и единствено на фенолните съединения, а също така и на други вторични метаболити, притежаващи АОА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Водните извлекци от листа и водно-алкохолния извлек от дървесина на *C. coggygria* имат високо съдържание на фенолни съединения, на които се дължи и високата им залавяща и обезвреждаща *in*

*vitro* антиоксидантна активност по отношение на азинобис-етилбензотиазолин-сулфоновите радикали. За първи път в световната изследователска работа е измерено общото полифенолно съдържание и антиоксидантната активност на 40% водно-алкохолен извлек от дървесина на *C. coggygria*, които са в изключително силна зависимост предвид установената висока положителна корелация. Високата антиоксидантна активност дава основание водният извлек от листата и водно-алкохолният извлек от дървесина на смрадлика да се изследват в *in vivo* модели с опитни животни, в т.ч. и за токсичност.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ploetz K. An ethnobotanical study of wild herb use in Bulgaria. MSc Thesis, Michigan Technological University, 2000.

2. Ламбев И, Н. Бояджиева, ред. Фармакология. София, Арсо, 2009.
3. Воденичаров Д, А. Петров. Отровни растения и отравяния с тях. София, Пенсофт, 2001.
4. Ланджев И. Енциклопедия на лечебните растения в България. София, Изд Къща Труд, 2010.
5. Николов С, отг. ред. Специализирана енциклопедия на лечебните растения в България. София, Изд Къща Труд, 2007.
6. Tanchev S, C. Timberlake. Anthocyanins in leaves of *Cotinus coggygia*. *Phytochem* 1969; 2367-2369.
7. Oren-Shamir M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Sci* 2009; 177: 310-316.
8. Milosevic T, N. Niciforovic, V. Mihailovic, S. Solujic, N. Vukovic. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of flowers, leaves and stems of *Cotinus coggygia*. *Planta Med* 2008; 74 (9): 1194-1195.
9. Novakovic M, I. Vuckovic, P. Janackovic, M. Sokolovic, A. Filipovic, V. Tesevic, S. Milosavljevic. Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygia* from Serbia. *J Serbian Chem Soc* 2007; 72 (11): 1045-1051.
10. Antal D, S. Schwaiger, E. Ellmerer-Muller, H. Stuppner. *Cotinus coggygia* Wood: Novel Flavanone Dimer and Development of an HPLC/UV/MS Method for the Simultaneous Determination of Fourteen Phenolic Constituents. *Planta Med* 2010; 76: 1-8.
11. Valianou L, K. Stathopoulou, I. Karapanagiotis, P. Magiatis, E. Pavlidou, A. Skaltsounis, Y. Chryssoulakis. Phytochemical analysis of young fustic (*Cotinus coggygia*) heartwood and identification of isolated colourants in historical textiles. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 871-882.
12. Mantzouris D, I. Karapanagiotis, L. Valianou, C. Panayiotou. HPLC-DAD-MS analysis of dyes identified in textiles from Mount Athos. *Anal Bioanal Chem* 2011; 399: 3065-3079.
13. Ivanova D, D. Gerova, T. Chervenkov, T. Yankova. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 96 (1-2): 145-150.
14. Киселова-Кънева Й. Проучване на антиоксидантната активност на български лечебни растения. Автореф Дисерт ОНС Доктор, МУ-Варна, 2011.
15. Singleton, VL, R. Orthofer, R. Lamuela-Raventos. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299: 152-178.
16. Re R, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999; 26: 1231-1237.
17. Javanmardi J, C. Stushnoff, E. Locke, J. Vivanco. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem* 2003; 83: 547-550.

**Адрес за кореспонденция:**

ас. Данаил Павлов,  
Катедра по биохимия, молекулна  
медицина и нутригеномика  
Медицински университет  
„Проф. Д-р Параскев Стоянов“ –  
Варна  
ул. „Марин Дринов“ № 55, Варна 9002  
e-mail: danailpavlov@gmail.com