

PACS: 76.30.-v 76.30.Mi 76.30.Rn 87.64.kh 87.80.Lg

PAYIZ YARPAQLARI EKSTRAKTINDAKI ANTOSİANİNLƏRİ ADSORBSİYA EDƏN İPƏK FİBROİNİN EPR ANALIZI

V.E.ATAYEVA

AMEA Şəki Regional Elmi Mərkəzi
Sheki AZ5500, L.Abdullayev küç., 24
AMEA-nın Biofizika İnstitutu
AZ1141, Bakı, Z.Xəlilov küç., 117
vefaatayeva81@gmail.com

Daxil olub: 07.01.2021
Çapa verilib: 25.02.2021

REFERAT

Bioaktiv xüsusiyyətlərinin yaxşılaşdırılması məqsədi ilə Sarağan bitkisinin (*Cotinus coccinifera* L.) payız yarpaqlarının suda ekstraktındakı antosianinlərinin ipək fibroinina (IF) adsorbsiyasından alınan biokompozit materiallar elektron paramaqnit spektroskopiyası (EPR) metodu ilə tədqiq edilmişdir. IF-nin payız yarpağı ekstraktındakı antosianinlər ilə modifikasiyasından alınan biokompozit materiallarda antosianinlərin IF tərəfindən maksimum adsorbsiyasının optimal şəraiti, sarağan bitkisinin payız yarpaqlarının - ekoloji təmiz olan təbii boyu və biotibbi cəhətdən fibroinin bioloji aktiv xüsusiyyətlərini yaxşılaşdırmaq üçün təbii antioksidant mənbəyi olduğu, 20 dəq. müddətində antosianinləri adsorbsiya etmək üçün biokompozitdə sərbəst radikalın intensivliyinin maksimum təşkil etdiyi və bu biokompozitin su, 95%-li etil spirti, 70%-li sirkə turşusu, 40°C temperaturda qarşı davamlılığın müəyyən edilmişdir. Alınan biokompozit materialların toxuma mühəndisliyində, regenerativ tibbdə və biotibbdə antioksidant, antimikrob, antiinflüv, antinflamator, antivirus, antikanser təsir göstərən əvəzlənməz biomateriallar kimi istifadəsi məqsədə uyğundur.

Açar sözlər: payız yarpaqları, antosianin, ipək fibroin, EPR-spektroskopiyası, sərbəst radikal

GİRİŞ

Yer kürəsi antioksidant, antibakterial, antifungal, antikanserogen və s. kimi xassələrə malik təbii mənşəli bioaktiv birləşmələrə zəngindir. Bəzi maddələr özində bir neçə xüsusiyyətləri birləşdirə bilər. Bu birləşmələrin aşkar edilməsinin, xüsusiyyətlərinin tədqiq edilməsinin və tətbiq sahələrinin araşdırılmasının mühüm elmi və praktiki əhəmiyyəti vardır. Son illərdə bitki mənşəli bioaktiv birləşmələrin əldə olunmasına və istehlakına tələbat artmaqdadır. Bu birləşmələr içərişində hazırda antosianin və biopolimer olan ipək fibroin ən çox istifadə olunan maddələrdəndir.

Böyük Qafqaz dağlarının cənub ətəklərində dəniz səviyyəsindən 700 metr yüksəklikdə Şəki

Zaqatala bölgəsinin yerləşməsi, yüksək dərəcə insolyasiya ilə aşağı temperaturun qarşılıqlı təsiri bir çox bitki yarpaqlarda antosianinlərin əmələ gəlməsi və tut ipək qurudunun yetişdirilməsi üçün əlverişli şərait yaradır [1,2].

İpək fibroin toxumalarda bioadaptasiyaya və bioloji proseslərdəki az iltihablı təsirinə görə bir neçə əsr əvvəldən cərrahi yara tikişlərində tətbiq olunur. Müasir dövrdə ipək fibroindən biotibbdə, toxuma mühəndisliyində, regenerativ tibbdə, nanohissəciklərin, smart materialların, təbii qələnlərin, nazik lentlərin hazırlanmasında istifadə edilir. Bundan başqa, ipək fibroinin su buxarı və oksigen keçiriciliyi, qana uyğunlaşa bilmək, kollagen əmələ gəlməsini sürətləndirmək və insanın dəri fibroblastlarını çoxaltmaq və yan təsirlərlə struktur

qurluşunu asanlıqla idarə etmək kimi spesifik xüsusiyyətləri var [3,4].

İpək fibroin H-L kompleksini təşkil edən, kütlələri təqribi 26 kDa olan yüngül (L) və təqribi 350kDa olan ağır (H) polipeptid zəncirdən ibarətdir. Ağır və yüngül polipeptid zəncirlər bir-birinə bir distülfid rabitəsi ilə bağlanırlar. İpək fibroinin çox hissəsini təşkil edən ağır zəncirin amin turşusu tərkibində qlisin, alanin, serin, tirozin və valin üstünlük təşkil edir. Fibroin zəncirinin başlanğıcını və sonunu əmələ gətirən hidrofob hissədən və antiparalel β təbəqəsinin əmələ gəlməsində iştirak edən Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Val və s. təkrarlanan ardıcılıqla düzülmiş hidrofob hissədən ibarətdir [5-7]. Fibroinin ümumi quruluşu hər bir β təbəqənin polipeptidlərdəki bütün peptid olaqları arasında geniş hidrogen rabitəsi və təbəqələr arasındakı van-der-Waals qüvvəsinin qarşılıqlı təsirlərinin optimallaşdırılması ilə sabitlənir. İpəyin uzunmüddətli qabiliyyəti yoxdur, çünki β quruluşu ipəyin ən yüksək genişlənmiş formasıdır. Bununla belə, β quruluşu çəvikdir, çünki təbəqələr çoxsaylı zəif qarşılıqlı olaqlarla birləşir [8].

Payız yarpaqları fenolik tərkibinə görə antosianinlərlə zəngin, təbii antioksidant mənbələrdən biridir. Antosianinlər mühtüm pH-na, temperatura, işığa, oksigenə və metal ionlarına qarşı həssas maddələrdir [9]. Görünən işıq şüası diapazonunda onların udma maksimumu 465nm ilə 550nm arasında, UB-ışıq şüası diapazonunda isə 270 ilə 280nm arasında [10]. Bir sıra tədqiqatlar antosianinlərin tərkibinin və müvafiq antioksidant aktivliyinin meyvə və tərəvəzlərdə degenerativ proseslərə və insanlarda bəzi xroniki xəstəliklərə qarşı qoruyucu təsir göstərdiyi müəyyən olunmuşdur [11,12].

Bağcı D. və digər tədqiqatçılar antosianidinlər və antosianinlərin C və E vitaminlərinə nisbətən daha yüksək antioksidant aktivliyinə malik olduqlarını göstərirlər [13]. Bu birləşmələrdə fenolik hidrogen atomları donor xüsusiyyətinə malik olmaqla sərbəst radikalı tuta bilər ki, bu da onun antioksidant olduğunu təsdiqləyir [14]. Kamei H. və digərləri müəyyən etmişlər ki, antosianinlərin hüceyrə böyüməsini ləngitmək qabiliyyəti flavonoidlərə nisbətən daha aktivdir [15].

Antosianinlərin biotik ekstraktının tərkibində ayrılması üçün bir çox biopolimer adsorbent-

lərdən istifadə etməklə tədqiqat işləri görülmüş, biopolimer və antosianinlərin arasında qarşılıqlı təsir əlaqələri geniş araşdırılmışdır [16]. Müxtəlif funksional xüsusiyyətlərə malik olan ipək fibroin zülal bioaktiv maddələri sabitləşdirən və blokladıcı hesab olunur. Fibroin-antosianin kompleks birləşmələrinin istiliyə davamlılığı fibroindən çox antosianinlərin istilik sabitliyinə daha yaxşı qoruyucu təsir göstərir [17].

Antosianinlərin oksidləşmə prosesini ləngitmək qabiliyyəti onların mənbəyindən, təbii təsirdən, temperatur şəraitindən, pH-dan və haldedici sisteminin növündən asılı olaraq iki mexanizm üzrə hidrogen atomunun transferi (HAT) və tərk elektron transferi (TET) ilə izah edilir. EPR-nin ən vacib cəhətlərindən biri, xüsusilə bioloji sistemlərdə, radikal növlərin konsentrasiyasını təyin etməkdir [18]. EPR metodu biomaterialların, biopolimerlərin, toxumaların, hüceyrələrin, dərmanların tədqiqi üçün səmərəli üsullardandır. Bioloji və ya farmakoloji obyektlərə işıq, oksigen, temperatur, qıyma şüalanması haqqında vacib məlumatları onların udma siqnalının təhlilindən əldə etmək olar [19].

Tədqim olunan məqalədə sarağan bitkisinin payız yarpaqlarının suda ekstraktı əsasında antosianinlərin ipək fibroinə adsorbsiyasının zamanından asılılığı, antosianinləri EPR metodu ilə adsorbsiya etmiş fibroin nümunələrində sərbəst radikalın intensivliyini araşdırılması, ipək fibroin antosianinlərin adsorbsiyasının optimal şəraiti müəyyən edilmiş və suya, spirtə, temperatura, sirkə turşusuna qarşı davamlılığın öyrənilmişdir.

TƏDQIQAT OBYEKTİ VƏ METODU

Tədqiqat işində AMEA ŞREM-in "İpəkçilik" şöbəsində yetişdirilən yerli *Bombix mori* ailəsindən olan ŞZEM-4 tut ipək qurdu cinsinin baramasından və təbii boyaq maddələri kimi, antosianin maddələri ilə zəngin olan sarağan bitkisinin qırmızı-bənövşəyi payız yarpaqlarından istifadə olunmuşdur [20]. Antosianinlərlə modifikasiya olunmuş fibroinlərdə sərbəst radikalın intensivliyini BRUKER ELEXXSYA 580 EPR spektrometri vasitəsi ilə müəyyən edilmişdir.

Xam ipəkdən serisinin təmizlənməsi. Tut ipəkdə baramasından alınan xam ipək 0,02M Na₂CO₃ məhlulunda iki dəfə olmaqla 30 dəqiqə

müddətində 100°C temperaturda qaynadılaraq fibroin serisindən təmizlənilib. Axar suda yuyularaq otaq temperaturunda qurudulub [21].

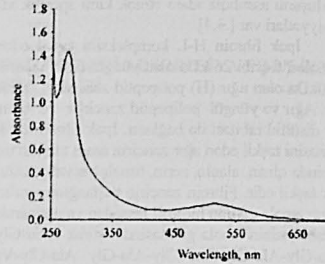
Boyağın alınması, adsorbsiya prosesi və EPR-də ölçülməsi. Yeni toplanmış qırmızı payız yarpaqları 40°C temperaturda sabit kütlə alana qədər qurudulur və 20q quru payız yarpağı götürülüb toz halına gətirilir. Material tam hazır olduqdan sonra üzərinə 80ml distillə edilmiş su əlavə edib, 55-60°C temperaturda 3-4 saat saxlanılır. Çöktürülmüş hissə ilə boyaq məhlul hissəsi bir-birindən tamamilə ayrılır.

Bərabər çəkiyə malik olan beş ədəd fibroin liflərdən biri nümunə kimi saxlanılır. Digər dörd fibroin lifləri 4 kimyəvi stəkana yerləşdirib, hər birinin üzərinə eyni konsentrasiyaya malik 15ml antosianin boyaq məhlulundan əlavə edilib, 80°C temperaturda adsorbsiya prosesi 10 dəq., 20 dəq., 30 dəq. və 40 dəq. müddətlərində aparılıb və otaq şəraitində qurudulub. Nümunəyə və qurudulmuş rəngli fibroin nümunələrinə EPR spektrometrin sınaq şüşəsinə yerləşdirilərək ölçmələr aparılmışdır. Nümunə fibroinin və antosianinlərin modifikasiya edilmiş fibroinlərin spekstrlərinin müqayisəsinə nəzər saldıqda 20 dəq. müddətində adsorbsiya olunan fibroində sərbəst radikalın intensivliyi maksimum, 40 dəq. müddətində adsorbsiya olunan fibroində isə sərbəst radikalın intensivliyi minimum olduğu müəyyən olunmuşdur.

Nümunələrdən götürülmüş hissələr otaq temperaturunda su, etil spirti və sirkə turşusuna olan sınaq şüşələrində 3-4 saat saxlanılıb, daha sonra süzülüb, qurudulmuşdur. Nümunələrin digər hissələri isə 40°C-ə temperatura qədər qızdırılıb termosatda 6 saat saxlanılıb və bütün təcrübə nümunələri fenoloji müqayisə edilmişdir. Nəticədə 20 dəq. müddətində antosianinləri adsorbsiya etmiş fibroin daha dayanıqlılıq göstərmişdir.

NƏTİCƏLƏR VƏ MÜZAKİRƏLƏR

Əldə olunan antosianin ekstraktının mühitini pH=4.5 olduqda UV-vis spektri Şəkil 1-də göstərilmişdir. Optik sıxlığın 520nm qiymətindən istifadə etməklə antosianin ekstraktının qatılığı 135µM uyğun gəlmiş müəyyən olunmuşdur. Bu məhluldan fibroin zülalını modifikasiya etmək üçün istifadə edilmiş və EPR metodu ilə sərbəst radikalın proseslər tədqiq olunmuşdur.



Şəkil 1

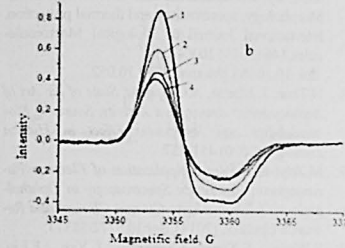
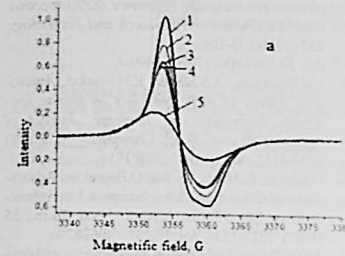
Sarağın bir kisinin payız yarpaqlarından alınan antosianinlərin UV-vis spektri, pH=4,5

EPR metodu ilə təbii ipək fibroində sərbəst radikalın mövcudluğu müəyyən edilmişdir. Şəkil 2(a)-da modifikasiya olunmayan fibroin (5) və modifikasiya olunmuş fibroinlərin (1,2,3,4) EPR spekstrləri göstərilmişdir. Şəkildən aydın görünür ki, Şəkil 2(b)-də isə modifikasiya olunmuş fibroinlərin spekstrindən modifikasiya olunmayan fibroinin EPR spektri çıxılıb və qalıq antosianinlərin spekstrləri göstərilmişdir. Spektrlərdən görüldüyü kimi, modifikasiya edilməmiş fibroinin sərbəst radikalının intensivliyi, modifikasiya edilmiş fibroinlərin hər birinin sərbəst radikalının intensivliyindən aşağıdır. İlk 10 və 20-ci dəqiqələrdə fibroin tərəfindən adsorbsiya prosesi gedir və udulan antosianinlərin miqdarından asılı olaraq spekstrlərin intensivliyi çox olur, adsorbsiya-desorbsiya prosesləri dövrə prosesi olduğundan, 30 və 40-cı dəqiqələrdə isə prosenin əksi olaraq desorbsiya prosesi baş verir, nəticədə intensivlik spekstrlərində azalma müşahidə olunur. Adsorbsiya prosesi Gibbs enerjisi ilə izah edilir və səthi sərbəst enerjinin azalması ilə gedir: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, ΔG -Gibbs enerjisi, ΔH -entalpiya, $T\Delta S$ -entropiya. Bu da adsorbsiya prosesinin ekzotermik, desorbsiya prosesinin isə endotermik olmasının nəticəsidir. Adsorbsiya prosesində fiziki və kimyəvi qüvvələr iştirak etdiyindən mahiyyətə fiziki-kimyəvi prosesdir [22]. Buradan aydın görünür ki, antosianinlər biokativ xüsusiyyətlərə malik fibroinin xassələrini yaxşılaşdırır və biotibbdə antioksidant, mikrob və iltihab öleyhinə təbii qaynaq imkanı verir.

NƏTİCƏ

Bu tədqiqat işində serisindən təmizlənməmiş fibroin liflərinin adsorbsiya prosesi pH=4-5 müddətində, saracağın payız yarpağından alınmış C=135µM konsentrasiyalı antosianin boyağında, 4 müxtəlif zaman intervalında, 80°C temperaturda aparılıb və aşağıdakı nəticələr əldə edilmişdir:

- Sarağın payız yarpaqları ekoloji cəhətdən təmiz olan təbii boya, həmçinin biotibbi cəhətdən fibroinin bioloji aktiv xüsusiyyətlərini yaxşılaşdırmaq üçün təbii mənbədir.
- EPR spektrlərindən görüldüyü kimi, 20dəq. müddətində fibroinə adsorbsiya olunmuş sərbəst radikalın intensivliyi maksimum, 40dəq. müddətində fibroinə adsorbsiya olunmuş sərbəst radikalın intensivliyi isə minimum təşkil edir.
- 20dəq. müddətində antosianinləri adsorbsiya etmiş fibroin digər zamanlarda adsorbsiya etmiş fibroin nümunələrinə nəzərən suya, 95%-li etil spirtinə, 40°C temperatura, 70%-li sirkə turşusuna qarşı daha davamlılıq göstərdi.



Şəkil 2

a) Müxtəlif zaman intervalında antosianinləri adsorbsiya etmiş fibroinlərin EPR spekstrləri: 1 - 20dəq., 2 - 30dəq., 3 - 10dəq., 4 - 40dəq. müddətində adsorbsiya olunmuş rəngli fibroinlər, 5 - modifikasiya edilməmiş fibroin; b) modifikasiya edilməmiş fibroinin spekstrini verilməmiş çıxıldıqdan sonra müxtəlif zaman intervalında adsorbsiya olunmuş antosianinlərin EPR spekstrləri: 1 - 20dəq., 2 - 30dəq., 3 - 10dəq., 4 - 40dəq.

1. <https://az.wikipedia.org/wiki/%C5%9F%C9%99ki>
2. T.Qaziyev. *Bitki fiziologiyası*, Bakı: Maarif, (1974) 316.
3. M.U.G.Thejas, K.Byrappa, R.Somashekar. *Preparation and Characterization of Mulberry Silk Fibroin Films*, *International Annals of Advance Scientific Research*, (2014) 1-7.
4. S.Das, U.Bora, B.B.Borthakur. *Applications of silk biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine*, *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (2014) 41-77, doi: 10.1533/9780857097064.1.41
5. K.Yamaguchi, Y.Kikuchi, T.Takagi, A.Kikuchi, F.Oyama, K.Shimura, S.Mizuno. *Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis*, *J. Mol. Biol.*, **210** (1989) 127-39, doi: 10.1016/0022-2836(89)90295-7.
6. T.Asakura, A.Aoki, K.Komatsu, Ch. Suzuki, N.Ikue, H.Kaji. *A Lamellar Structure in Alanine-Glycine Copolypeptides Studied by Solid-State NMR Spectroscopy: A Model for the Crystalline of Bombyx mori Silk Fibroin in Silk II Form*, *Biomacromolecules*, **21** (2020) 3102-3111, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00486.

7. O.K.Gasymov, Ch.Botta, L.Ragona, A.J.Guliyeva, H.Molinari. *Silk Fibroin-Based Films Enhance Rhodamine 6G Emission in the Solid State: A Chemical-Physical Analysis of their Interactions for the Design of Highly Emissive Biomaterials*, *Macromolecular Chemistry and Physics*, (2019) 1800460, doi: 10.1002/macp.201800460.
8. D.L.Nelson, M.M.Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition 4th edition*, (2004) Hardcover.
9. I.Verbeyst, I.Oey, I.Van der Plancken, M.Hendrickx. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries, *Food Chem.*, **123** (2010) 269-274, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.027.
10. [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S09609822\(12\)00022-X.pdf](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S09609822(12)00022-X.pdf)
11. I.R.Record, I.E.Dreosti, J.K.McInerney. *Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture*, *British Journal of Nutrition*, **85** (2001) 459-464, doi: 10.1079/BJN2000292.
12. I.M.Heinonen, A.S.Meyer, E.N.Frankel. *Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low Density Lipoprotein and Liposome Oxidation*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** (1998) 4107-4112, doi: 10.1021/jf980181c.
13. D.Bagchi, A.Garg, R.L.Krohn, M.Bagchi, D.J.Bagchi, J.Balmoori, S.J.Stohs. *Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice*, *General Pharmacology*, **30** (1998) 771-776, doi: 10.1016/s0306-3623(97)00332-7.
14. C.Osorio, J.G. Carriazo, O.Almanza. *Antioxidant activity of corozo (Bactris guineensis) fruit by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy*, *European Food Research and Technology*, **233** (2011)103-108, doi: 10.1007/s00217-011-1499-4.
15. I.M.Heinonen, A.S.Meyer, E.N.Frankel. *Antioxidant activity of berry phenolics on human low density lipoprotein and liposome*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** (1998) 4107-4112, doi: 10.1021/jf980181c.
16. D.Bayçin, E.Altok, S.Ülkü, O.Bayraktar. *Adsorption of Olive Leaf (Olea europaea L.) Antioxidants on Silk Fibroin*, *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007) 1227-1236, doi: 10.1021/jf062829o.
17. Z.Ma, P.Jing. *Stabilization of black rice anthocyanins by self-assembled silk fibroin nanofibrils: Morphology, spectroscopy and thermal protection*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **146** (2019) 1030-1039, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.052.
18. N.Tena, J.Martin, A.G.Asuero. *State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability and Therapeutic Effect in Human Health*, **9** (2020) 451-457.
19. M.Zdybel, B.Pilawa. *Application of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy in Ophthalmology*, *Ophthalmology: Current Clinical and Research Updates*, (2014), doi:10.5772/58313.
20. F.Wang, S.Xing, J.Yapking, L.Yan, F.Liu, Y.Dong, J.Wang. *Leaf structural reddening in smoke tree and its significance*, *Urban Forestry & Urban Greening*, **14**(1) (2015) 80-88, doi:10.1016/j.ufug.2014.12.001.
21. O.K.Gasymov, A.Aydemirova, O.Alekperov, R.B.Aslanov, K.Khalilova, N.Gasimov, N.Mamedov, I.Mamedova, N.Gasanov. *IR ellipsometry of silk fibroin films on Al nanoislands*, *Physica Status Solidi (c)*, **12** (2015) 628-630.
22. T.E.Ədalbəyli-Ağdamski. *Fiziki və kolloid kimya*, *Bakı*, (2017) 271-280.

EPR ANALYSIS OF SILK FIBROIN ADSORBING ANTHOCYANINS IN AUTUMN LEAVES EXTRACT

V.E.ATAYEVA

The results of a study of biocomposite materials obtained by adsorption of anthocyanins from an aqueous extract of autumn leaves of the Scumphia plant (*Cotinus coggygia* L.) on Silk fibroin by EPR spectroscopy in order to improve the bioactive properties of FS have been presented. The optimal conditions for maximum adsorption of anthocyanins have been determined. It has been shown that the maximum intensity of free radicals was observed in the biocomposite adsorbed by anthocyanins for 20 minutes, as well as resistance to water, 95% ethanol, 70% acetic acid and a temperature of 40°C. The obtained biocomposite materials can be applied in regenerative medicine, biomedicine, and tissue engineering.

ЭПР АНАЛИЗ ШЕЛКОГОГО ФИБРОИНА, АДОРБИРУЮЩЕГО
АНТОЦИАНИНЫ ИЗ ЭКСТРАКТА ОСЕННИХ ЛИСТЬЕВ

В.Э.АТАЕВА

Представлены результаты ЭПР спектроскопии исследования биокomпозитных материалов, полученных адсорбцией антоцианинов из водного экстракта осенних листьев растения Скумпия (*Cotinus coggygia* L.) на фиброин шелка, с целью улучшения биоактивных свойств ФШ. Определены оптимальные условия максимальной адсорбции антоцианов. Показано, что максимальная интенсивность свободных радикалов наблюдается в биокomпозите, адсорбированного антоцианинами в течение 20 мин., а также устойчивость к воде, 95%-ому этиловому спирту, 70%-ой уксусной кислоте и температуре 40°C. Применение полученных биокomпозитных материалов целесообразно в регенеративной медицине, биомедицине и тканевой инженерии.