Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine

J Chem Good Trad Med, Volume 5, Issue 1, 2026 Traditional Medicine

O‘SIMLIKLAR ANTIRADIKAL FAOLLIGINI BAHOLASH UCHUN DPPH-USULINI OPTIMALLASHTIRISH

Akmaljon Nodirbek o'g'li Asqarov
Andijon davlat tibbiyot instituti “Farmatsevtik kimyo va farmakognoziya” mutaxassisligi bo‘yicha magistratura 2-bosqich talabasi
https://orcid.org/0009-0001-4654-1094
E-mail: asqarov2541@gmail.com

DOI: https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol5.iss1.2026.604

Kalit so'zlar: DPPH-testi, antioksidant faollik, dastarbosh (*Tanacetum vulgare L.*), dala qirqbo‘g‘ini (*Equisetum arvense L.*), metodika validatsiyasi, ultratovushli ekstraksiya, spektrofotometriya, erkin radikallar, flavonoidlar, fenol birikmalar

Annotatsiya

Ushbu tadqiqot o‘simlik kompozitsiyalarining antiradikal faolligini baholash uchun DPPH-usulini maqbullashtirish va tasdiqlashga bag‘ishlangan. Tadqiqot davomida DPPH eritmasining optimal konsentratsiyasi, inkubatsiya vaqti, o‘lchash to‘lqin uzunligi hamda ekstrakt hajmining diapazoni aniqlangan. Shuningdek, metodikaning asosiy validatsion ko‘rsatkichlari — chiziqlilik, sezgirlik, takrorlanuvchanlik va o‘ziga xoslik baholangan. Olingan natijalar DPPH-usuli o‘simlik ekstraktlarining antiradikal faolligini aniqlashda ishonchli, takrorlanuvchan va amaliy qo‘llash uchun mos ekanligini ko‘rsatdi. Taklif etilgan yondashuv fitokompozitsiyalarni standartlashtirish va tabiiy antioksidantlarni skrining qilishda qo‘llanishi mumkin.

Havola uchun

Asqarov, A. N. o'g'li. O‘SIMLIKLARANTIRADIKAL FAOLLIGINI BAHOLASH UCHUN DPPH-USULINI OPTIMALLASHTIRISH. Tovarlar Kimyosi Va Xalq Tabobati Jurnali, 5(1). https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol5.iss1.2026.604

Oksidlovchi stress faol kislorod shakllari (FKS) hosil bo‘lishi bilan biologik tizimlarning ularni neytrallash va shikastlanishlarni bartaraf etish qobiliyati o‘rtasidagi nomutanosiblik holatini ifodalaydi. Fiziologik sharoitda FKS muhim signal funksiyalarini bajaradi va organizmning himoya mexanizmlarida ishtirok etadi. Ammo erkin radikal jarayonlarning haddan tashqari faollashuvi yoki antioksidant himoyaning yetishmovchiligi natijasida oksidlovchi stress rivojlanadi, u ko‘plab kasalliklarning universal patogenetik mexanizmi sifatida qaraladi [Halliwell, 2007].

Erkin radikallar, jumladan superoksid anion-radikali ($O_2^{\bullet -}$), gidroksil radikali (•OH), vodorod peroksid (H_2O_2) va boshqalar, hujayra membranalari lipidlarini, oqsillarni, nuklein kislotalarni va boshqa makromolekulalarni shikastlash qobiliyatiga ega. Bu esa hujayralar, to‘qimalar va organlarning tuzilishi hamda funksiyasining buzilishiga olib keladi. Oksidlovchi stress ateroskleroz, yurak ishemik kasalligi, arterial gipertenziya, qandli diabet, neyrodegenerativ kasalliklar (Altsgeymer, Parkinson), onkologik kasalliklar hamda erta qarish jarayonlari patogenezida muhim rol o‘ynaydi [Lobo va boshq., 2010].

Shu munosabat bilan samarali va xavfsiz tabiiy antioksidantlarni izlash zamonaviy farmatsiya, tibbiyot va oziq-ovqat sanoatining ustuvor vazifalaridan biri hisoblanadi. O‘simliklar antioksidant xususiyatlarga ega biologik faol birikmalarning noyob manbai sanaladi. Evolyutsiya jarayonida o‘simliklar oksidlovchi stressga qarshi murakkab himoya mexanizmlarini ishlab chiqqan bo‘lib, erkin radikallarni neytrallashga qodir keng ko‘lamli ikkilamchi metabolitlarni sintez qiladi. Bunday birikmalar qatoriga fenol kislotalar, flavonoidlar, dubil moddalar, karotinoidlar, vitaminlar va boshqa komponentlar kiradi hamda ular dori vositalari, biologik faol qo‘shimchalar va funksional oziq-ovqat mahsulotlarini yaratishda qo‘llanilishi mumkin [Pisoschi va boshq., 2016]. Dastarbosh (Tanacetum vulgare L.) Asteraceae

(Murakkabguldoshlar) oilasiga mansub ko‘p yillik o‘tsimon o‘simlik bo‘lib, Yevrosiyoning mo‘tadil iqlim mintaqasida keng tarqalgan. O‘zbekistonda tog‘ oldi va tog‘li hududlarda, daryolar va kanallar bo‘yida, o‘tloqlarda hamda yo‘l chetlarida begona o‘t sifatida uchraydi. O‘simlikning bo‘yi 50–150 sm gacha yetadi, yorqin sariq rangli qalqonsimon to‘pgullarga va patsimon chuqur kesilgan barglarga ega. Iyul–avgust oylarida gullaydi, mevalari avgust–sentyabr oylarida pishadi [Xodjimatov, 1989].

Dastarboshning kimyoviy tarkibi boy va xilma-xildir. Asosiy biologik faol birikmalar guruhlari quyidagilar: Flavonoidlar — luteolin, apigenin, kversetin, kemferol va ularning glikozidlari. Ushbu birikmalar kuchli antioksidant faollikka ega bo‘lib, o‘zgaruvchan valentli metall ionlarini bog‘lash hamda erkin radikal jarayonlarda ishtirok etuvchi fermentlarni ingibitsiya qilish qobiliyatiga ega [Williams va boshq., 2004]. Fenolkarbon kislotalar — xlorogen, kofein, ferul, protokatex kislotalari. Mazkur birikmalar erkin radikallarni samarali tutib qoladi va flavonoidlar bilan sinergetik ta’sir ko‘rsatadi [Rice-Evans va boshq., 1996]. Efiri moy (1,5–2%) — tarkibida tuyon (70% gacha), kamfora, borneol, pinen, limonen mavjud. Efiri moy komponentlari ham antioksidant xususiyatga ega bo‘lsa-da, ularning asosiy biologik faolligi mikroblarga qarshi va yallig‘lanishga qarshi ta’sir bilan bog‘liq [Bail va boshq., 2008]. Seskviterpen laktonlar — tanatsetin, artabsin, tavulin. Ushbu birikmalar o‘simlikning achchiq ta’mini belgilaydi va yallig‘lanishga qarshi faollik namoyon etadi. Dubil moddalar (8% gacha) — tortuvchi va antioksidant xususiyatga ega. Karotinoidlar va askorbin kislota — o‘simlikning umumiy antioksidant salohiyatini oshiradi.

Dastarbosh (*Tanacetum vulgare L.*) qadimdan xalq va rasmiy tibbiyotda o‘t haydovchi, yallig‘lanishga qarshi, spazmolitik, gijjalarga qarshi va yara bitkazuvchi vosita sifatida qo‘llanib kelinadi. Dastarbosh preparatlari jigar va o‘t yo‘llari kasalliklarida, past kislotalilik bilan kechuvchi gastritlarda, enterokolitlarda, shuningdek tashqi qo‘llashda yiringli yaralar va yaralarni davolashda qo‘llaniladi [SSSR Davlat farmakopeyasi, 1990]. Dastarboshning antioksidant faolligi bir qator tadqiqotlarda o‘rganilgan. Ivănescu va boshq. (2018) dastarbosh ekstraktlari DPPH-radikalni samarali ingibitsiya qilish xususiyatiga ega ekanligini ko‘rsatgan, bu esa fenol birikmalarining yuqori miqdori bilan bog‘liqligini aniqlagan. Bubenchikova va boshq. (2019) tadqiqotlari dastarboshning yer ustki qismida flavonoidlar va fenolkarbon kislotalarning sezilarli miqdorda mavjudligini tasdiqlab, uning antiradikal xususiyatlarini asoslab bergan.

Dala qirqbo‘g‘ini (*Equisetum arvense L.*) — qirqbo‘g‘indoshlar (Equisetaceae) oilasiga mansub ko‘p yillik sporali o‘tsimon o‘simlik bo‘lib, kosmopolit tarqalishga ega. O‘zbekistonda daryo qayirlarida, nam o‘tloqlarda, ariq bo‘ylarida, dalalarda va begona o‘t sifatida uchraydi. Qirqbo‘g‘inning ajralib turuvchi belgisi — ikki xil novdaga ega ekanligidir: bahorgi (spora hosil qiluvchi) va yozgi (vegetativ), tibbiy maqsadlarda aynan yozgi novdalaridan foydalaniladi [Xodjimatov, 1989].

Dala qirqbo‘g‘inining kimyoviy tarkibi biologik faol birikmalarning o‘ziga xos uyg‘unligi bilan tavsiflanadi. Kremniy birikmalari (quruq modda hisobida 10% gacha) asosan suvda eruvchan kremniy kislotasi va kremniy-organik birikmalar shaklida bo‘ladi. Kremniy biriktiruvchi to‘qima metabolizmida muhim rol o‘ynaydi, kollagen va elastin sintezini rag‘batlantiradi hamda mineral almashinuvda ishtirok etadi [Holzapfel va boshq., 2009]. Flavonoidlar — izokversitrin, kemferol-3-soforozid, luteolin-7-glikozid, apigenin-5-glikozid, ekvizetrin. Qirqbo‘g‘in flavonoidlari kuchli antioksidant, yallig‘lanishga qarshi va kapillyarlarni himoya qiluvchi faollikka ega [Mimica-Dukić va boshq., 2008]. Fenolkarbon kislotalar — kofein, ferul, xlorogen, vanilin kislotalari. Ushbu birikmalar o‘simlikning antioksidant salohiyatini kuchaytiradi va flavonoidlar bilan sinergetik ta’sir ko‘rsatadi. Saponinlar (5% gacha) — ekvizetonin va boshqa triterpen saponinlar bo‘lib, siydik haydovchi va yallig‘lanishga qarshi ta’sirga ega. Alkaloidlar (kam miqdorda) — nikotin, palyustrin, ekvizetin. Organik kislotalar — olma, limon, shovul (oksalat), akonit kislotalari. Mineral moddalar — kremniydan tashqari kaliy, kalsiy, magniy, temir, marganets, rux va misni ham o‘z ichiga oladi.

Dala qirqbo‘g‘ini rasmiy va xalq tabobatida siydik haydovchi, qon to‘xtatuvchi, yallig‘lanishga qarshi va umumiy quvvatlantiruvchi vosita sifatida keng qo‘llaniladi. Qirqbo‘g‘in preparatlari yurak va buyrak kelib chiqishli shishlarda, sistit va uretritlarda, o‘pka sili kasalligida, shuningdek tashqi qo‘llashda yaralar va yaralarni davolashda ishlatiladi [SSSR Davlat farmakopeyasi, 1990].

Dala qirqbo‘g‘inining (*Equisetum arvense L.*) antioksidant faolligi ko‘plab tadqiqotlar bilan tasdiqlangan. Stajner va boshq. (2009) qirqbo‘g‘in ekstraktlari DPPH-radikalni samarali ingibitsiya qilishini va metall ionlariga nisbatan xelatlovchi xususiyatga ega ekanligini ko‘rsatgan. Nagai va boshq. (2005) qirqbo‘g‘inning antioksidant xususiyatlarini flavonoidlar va fenol kislotalarning yuqori miqdori bilan bog‘lagan. Kanarskaya va boshq. (2017) tadqiqotlarida fenol birikmalarining umumiy miqdori bilan dala qirqbo‘g‘ini ekstraktlarining antiradikal faolligi o‘rtasida korrelyatsiya aniqlangan.

Oddiy dastarbosh (*Tanacetum vulgare L.*) va dala qirqbo‘g‘ini (*Equisetum arvense L.*)ni tadqiqot obyekti sifatida tanlash quyidagi omillar bilan izohlanadi:

Antioksidant birikmalarning mavjudligi — har ikkala o‘simlik flavonoidlar va fenol kislotalarning sezilarli miqdorini o‘z ichiga oladi, ular erkin radikallarni samarali tutib qoluvchi birikmalar hisoblanadi. Dastarboshda fenol birikmalarining umumiy miqdori 8–10% gacha, qirqbo‘g‘inda esa 5–7% gacha yetadi [Ivănescu va boshq., 2018; Stajner va boshq., 2009].

O‘zaro to‘ldiruvchi kimyoviy tarkib — dastarbosh flavonoidlar (luteolin, apigenin) va efir moylariga boy, qirqbo‘g‘in esa kremniy birikmalari va o‘ziga xos flavonoidlarga (izokversitrin, ekvizetrin) boy. Ushbu o‘simliklar kombinatsiyasi biologik faol moddalarning turli guruhlari o‘zaro to‘ldiruvchi ta’siri hisobiga antioksidant samarani sinergetik kuchaytirishi mumkin.

Xomashyo bazasining mavjudligi — har ikkala o‘simlik O‘zbekiston hududida keng tarqalgan bo‘lib, bu amaliy foydalanish uchun xomashyo mavjudligini va sanoat miqyosida yig‘ib olish imkoniyatini ta’minlaydi.

Yetarli darajada o‘rganilmaganligi — dastarbosh va qirqbo‘g‘in kompozitsiyalarining antioksidant xususiyatlari ilgari tizimli ravishda o‘rganilmagan. Adabiyotlarda komponentlar nisbatining antiradikal faollikka ta’siri, ekstraktlarning erkin radikallar bilan o‘zaro ta’sir kinetikasi haqida ma’lumotlar yetarli emas, bu esa mazkur ishning ilmiy yangiligini belgilaydi.

An’anaviy qo‘llanilishi — har ikkala o‘simlik qadimdan xalq tabobatida qo‘llanib kelinadi, bu ularning xavfsizligi va samaradorligi haqida bilvosita dalil bo‘la oladi. Ushbu o‘simliklarning antioksidant xususiyatlarini o‘rganish ularni rasmiy tibbiyotda qo‘llash doirasini kengaytirish uchun ilmiy asos bo‘lishi mumkin.

Antioksidant faollikni 2,2-difenil-1-pikrilgidrazil (DPPH) barqaror radikali yordamida baholash usuli ilk bor 1958-yilda Marshall Blois tomonidan taklif etilgan [Blois, 1958]. O‘zining asosiy ishida Blois DPPH• barqaror erkin radikal ekanligini va u aminokislotalar, vitaminlar hamda fenol birikmalar kabi turli moddalarning antioksidant xususiyatlarini o‘rganishda qo‘llanishi mumkinligini ko‘rsatgan. Shundan buyon usul ko‘plab modifikatsiyalarga uchragan bo‘lsa-da, soddaligi, ishonchliligi va informativligi sababli o‘z ommabopligini saqlab qolgan.

Usulning mohiyati antioksidantlarning DPPH• barqaror radikalini qaytarish qobiliyatiga asoslanadi. Oksidlangan shaklda DPPH• 517 nm to‘lqin uzunligida yutilish maksimumiga ega bo‘lgan to‘q binafsha rangga ega. Vodorod atomi yoki elektron bera oladigan birikmalar (antioksidantlar) bilan o‘zaro ta’sirlashganda DPPH• difenilpikrilgidrazingacha qaytariladi va eritma sariq rangga kiradi. Eritmaning rangsizlanish darajasi spektrofotometrik usulda qayd etilib, u tadqiq qilinayotgan namunadagi antioksidantlarning miqdori va faolligiga proporsional bo‘ladi [Molyneux, 2004].

DPPH• va antioksidant (AH) o‘rtasidagi reaksiya quyidagi tenglama bilan ifodalanishi mumkin:

$$\text{DPPH}\bullet\ (\text{binafsha}) + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H}\ (\text{sariq}) + \text{A}\bullet$$

bu yerda AH — vodorod atomini bera oladigan antioksidant molekulasidir. Hosil bo‘ladigan A• radikali rezonans tuzilmalar hisobiga barqarorlashadi va keyingi zanjir reaksiyalarini boshlab bermaydi. O‘simlik ekstraktlarining asosiy antioksidantlari hisoblangan fenol birikmalar holatida reaksiya mexanizmi fenolning gidroksil guruhidan vodorod atomining DPPH• ga o‘tishi orqali semixinon radikal hosil bo‘lishini o‘z ichiga oladi, u keyinchalik dimerlanadi yoki boshqa radikallar bilan o‘zaro ta’sirlashadi [Prior va boshq., 2005].

DPPH-testning asosiy afzalliklari quyidagilardan iborat: bajarishning soddaligi — usul murakkab jihozlar va uzoq davom etadigan namunani tayyorlash jarayonini talab qilmaydi; tahlilning tezligi — bitta o‘lchov 30–60 daqiqa davom etadi; yuqori takrorlanuvchanlik — sharoitlar standartlashtirilganda natijalar turli laboratoriyalarda yaxshi qayta tiklanadi; reaktivning barqarorligi — DPPH saqlash sharoitlariga rioya qilinganda eritmada barqaror; universalligi — usul gidrofil hamda lipofil antioksidantlarni tahlil qilishda qo‘llanilishi mumkin; iqtisodiyligi — qimmat reaktiv va sarf materiallarini talab qilmaydi; avtomatlashtirish imkoniyati — usul yuqori unumli skrining uchun oson moslashtiriladi [Sharma va Bhat, 2009].

DPPH-test natijalarini talqin qilishda uning cheklovlarini ham hisobga olish zarur: usul faqat birikmalarning vodorod atomi yoki elektron berish qobiliyatini o‘lchaydi, bu esa murakkab biologik tizimlardagi umumiy antioksidant salohiyatni to‘liq aks ettirmaydi; o‘simlik ekstraktlarining rangli komponentlari 517 nm da yutilishga hissa qo‘shishi mumkin, bu nazorat o‘lchovlarini o‘tkazishni talab qiladi; natijalar tahlil sharoitlariga (DPPH konsentratsiyasi, inkubatsiya vaqti, erituvchi turi, muhit pH ko‘rsatkichi) bog‘liq bo‘lishi mumkin, bu metodikani standartlashtirish zarurligini ta’kidlaydi; usul antioksidant faollik uchun mas’ul bo‘lgan aniq birikmalarni aniqlab bermaydi; ayrim antioksidantlar DPPH• bilan sekin reaksiyaga kirishadi, bu inkubatsiya vaqtini uzaytirishni talab qiladi [Prior va boshq., 2005].

Mazkur ishning maqsadi — turli nisbatlardagi *Tanacetum vulgare L.* (oddiy dastarbosh) va *Equisetum arvense L.* (dala qirqbo‘g‘ini) aralashmalarining spirtli va suvli ekstraktlari uchun DPPH-test sharoitlarini optimallashtirish hamda ishlab chiqilgan metodikani validatsiya qilishdan iborat.

Qo‘yilgan maqsadga erishish uchun quyidagi vazifalar hal qilindi:

Antioksidant faollikka ega birikmalarni maksimal darajada ajratib olishni ta’minlaydigan o‘simlik xomashyosini ekstraksiya qilishning optimal parametrlarini (ekstragent turi, ekstraksiya usuli, davomiyligi) tanlash.

DPPH-testni o‘tkazishning optimal sharoitlarini aniqlash (ishchi eritma konsentratsiyasi, to‘lqin uzunligi, inkubatsiya vaqti, o‘lchash intervallari, ekstrakt hajmlari diapazoni).

Ishlab chiqilgan metodikaning validatsion ko‘rsatkichlarini baholash: chiziqlilik, sezgirlik, takrorlanuvchanlik (pretsizionlik) va spetsifiklik.

Tadqiq etilayotgan o‘simliklarning spirtli va suvli ekstraktlarining antioksidant faolligini taqqoslash orqali eng samarali ekstragent turini aniqlash.

Dastarbosh va qirqbo‘g‘in kompozitsiyalarining antioksidant xususiyatlarini keyinchalik tizimli o‘rganish uchun yaroqli bo‘lgan standartlashtirilgan DPPH-test protokolini ishlab chiqish.

Tadqiqot obyekti sifatida oddiy dastarbosh (*Tanacetum vulgare L.*) va dala qirqbo‘g‘ini (*Equisetum arvense L.*)ning yer ustki qismlari olindi. Xomashyo o‘simliklarning gullash davrida (2024-yil iyul–avgust oylarida) O‘zbekiston Respublikasi Toshkent viloyati Bo‘stonliq tumanida (koordinatalar: 41°45' shimoliy kenglik, 70°05' sharqiy uzunlik, dengiz sathidan 1100–1200 m balandlikda) yig‘ib olindi. Yig‘im hududi tog‘ oldi relyefi va mo‘tadil kontinental iqlim bilan tavsiflanadi.

Oddiy dastarbosh (*Tanacetum vulgare L.*) uchun gullashning boshlanish fazasida gul savatchalari yig‘ib olindi, ular yuqori qismidan 20–25 sm masofada kesib olindi. Dala qirqbo‘g‘ini (*Equisetum arvense L.*) uchun yashil rangli yozgi vegetativ novdalar yig‘ildi. Yig‘im ishlari quruq ob-havoda, ertalab shudring qurigandan keyin amalga oshirildi.Yig‘ilgan xomashyo begona aralashmalar, shikastlangan qismlar va boshqa o‘simlik qoldiqlaridan tozalandi. Quritish havo-soya usulida, to‘g‘ridan-to‘g‘ri quyosh nurlaridan himoyalangan, yaxshi shamollatiladigan xonada 25–30°C haroratda olib borildi. Xomashyo qog‘oz ustiga yupqa qatlam qilib yoyildi va bir tekis qurishi uchun vaqti-vaqti bilan aralashtirib turildi. Quritish davomiyligi 7–10 kunni tashkil etdi va havo-quruq holatga (qoldiq namlik 10–12% dan oshmagan) yetguncha davom ettirildi.

Quritilgan xomashyo laboratoriya tegirmonida 2–3 mm o‘lchamdagi zarrachalargacha maydalandi. Maydalangan xomashyo qog‘oz paketlarga joylanib, tahlil o‘tkazilgunga qadar quruq, yorug‘likdan himoyalangan joyda, xona haroratida saqlandi. Saqlash muddati 3 oydan oshmadi. Tadqiqot uchun

dastarbosh va qirqbo‘g‘in aralashmalari quyidagi massa nisbatlarida tayyorlandi: 1:1 (teng qismlar); 1:3 (bir qism dastarbosh va uch qism qirqbo‘g‘in); 3:1 (uch qism dastarbosh va bir qism qirqbo‘g‘in). Aralashmalar komponentlarning bir tekis taqsimlanishini ta’minlash uchun puxta gomogenlashtirildi.

Ishda quyidagi reaktivlardan foydalanildi: 2,2-difenil-1-pikrilgidrazil (DPPH), tozaligi ≥95%, ishlab chiqaruvchi “Sigma-Aldrich” (AQSH); etanol 96% (ch.d.a.), ishlab chiqaruvchi “Toshkent kimyo reaktivlari zavodi” (O‘zbekiston); distillangan suv, DE-4 apparatida (Rossiya) olingan. Barcha reaktivlar qo‘shimcha tozalashsiz ishlatildi. Ishda quyidagi asbob-uskunalar qo‘llanildi: YOKE K7000 spektrofotometri (Xitoy), to‘lqin uzunligi diapazoni 190–1100 nm; “Sapphire” ultratovush vannasi (Xitoy), ishchi chastotasi 35 kHz, quvvati 100 W; “Shimadzu AUX-220” analitik tarozisi (Yaponiya), aniqligi 0,0001 g; 0,45 mkm g‘ovak diametrli shprits filtrlari (Xitoy); optik yo‘l uzunligi 10 mm va hajmi 4 ml bo‘lgan kvarts kyuvetalar; 100 ml hajmli A klass o‘lchov kolbalari; o‘zgaruvchan hajmli pipetkalar (10–100 mkl va 100–1000 mkl); “IKA A11 basic” laboratoriya tegirmoni (Germaniya); membranali vakuum nasosi.

Ekstraktlarni tayyorlash uchun o‘simlik aralashmasidan aniq tortma (1,0000 ± 0,0005 g) olinib, 100 ml hajmli konussimon kolbaga joylashtirildi. Ekstragent sifatida quyidagilar ishlatildi: 96% etanol (spirtli ekstraktlar olish uchun) va distillangan suv (suvli ekstraktlar olish uchun). Ekstragentlarni tanlash qutbli (suv) va kamroq qutbli (etanol) erituvchilar yordamida antioksidant birikmalarni ajratib olish samaradorligini qiyosiy baholash zarurati bilan asoslandi. Tortma solingan kolbaga 25 ml mos ekstragent qo‘shildi. Xomashyo : ekstragent nisbati 1 : 25 (massa/hajm) ni tashkil etdi. Ekstraksiya xona haroratida ultratovush vannasida olib borildi. Ultratovush bilan ishlov berish kavitatsiya effektlari hisobiga hujayra devorlarini yemiradi va biologik faol birikmalarni to‘liqroq ajratib olishga yordam beradi [Vinatoru, 2001].

Ultratovush bilan ishlov berish davomiyligi 20 daqiqani tashkil etdi. Dastlabki tajribalar ekstraksiya vaqtini 20 daqiqadan ortiq oshirish ekstraktiv moddalar chiqishini sezilarli darajada ko‘paytirmasligini ko‘rsatdi. Ekstraksiya yakunlangach, olingan ekstraktlar 0,45 mkm g‘ovak diametrli shprits filtri orqali suspenziya zarrachalarini olib tashlash va sterillikni ta’minlash maqsadida filtrlab olindi. Filtratlar germetik qopqoqli toza shisha probirkalarga yig‘ildi. Dastlabki tajribalar shuni ko‘rsatdiki, tadqiq etilayotgan o‘simliklarning spirtli ekstraktlari yuqori antioksidant faollikka ega bo‘lib, 100 mkl hajmda qo‘shilganda DPPH eritmasining deyarli to‘liq rangsizlanishiga olib keladi, bu esa usulning chiziqli diapazonidan tashqariga chiqadi. Shu sababli spirtli ekstraktlar tahlil oldidan 96% etanol bilan 10 marta suyultirildi. Suvli ekstraktlar esa suyultirilmasdan tahlil qilindi.

DPPH tortmasi quyidagi formula asosida hisoblandi:

$$m = C \times M \times V$$

bu yerda m — tortma massasi (g), C — zarur konsentratsiya (mol/l), M — DPPH ning molyar massasi (394,32 g/mol), V — eritma hajmi (l).

100 ml 7,92 mM DPPH eritmasini tayyorlash uchun quyidagicha hisoblandi:

m = 0,00792 mol/l × 394,32 g/mol × 0,1 l = 0,3123 g

DPPH ishchi eritmasining konsentratsiyasi etanolda 7,92 mM ni tashkil etdi. Ushbu konsentratsiya adabiyot ma’lumotlari asosida tanlandi [Gulcin va boshq., 2005; Asqarov va boshq., 2024] va 517 nm to‘lqin uzunligida optimal optik zichlik qiymatlarini (0,8–1,2 birlik) ta’minlaydi. DPPH ning aniq tortmasi (taxminan 0,3123 g) 100 ml hajmli o‘lchov kolbasiga miqdoriy ko‘chirildi, oz miqdordagi etanolda eritildi, so‘ngra etanol bilan belgi chizig‘igacha yetkazildi va to‘liq eriguncha yaxshilab aralashtirildi.

Tayyorlangan DPPH eritmasi yorug‘likdan himoya qilish maqsadida alyuminiy folga bilan o‘raldi va xona haroratida qorong‘ilikda 30 daqiqa davomida radikalning barqarorlashuvi va muvozanat konsentratsiyasi o‘rnatilishi uchun saqlandi. Ishchi eritmaning barqarorligini nazorat qilish uchun nazorat namunasining (3 ml DPPH + 100 mkl etanol) optik zichligi 517 nm da har bir o‘lchov seriyasining boshida va oxirida o‘lchandi. Agar tahlil davomida optik zichlik o‘zgarishi 5% dan oshmasa, eritma barqaror deb hisoblandi.

4 ml hajmli kvarts kyuvetaga 3 ml DPPH ishchi eritmasi va 100 mkl mos ekstragent (spirtli ekstraktlar uchun 96% etanol, suvli ekstraktlar uchun distillangan suv) qo‘shildi. Kyuveta tarkibi yaxshilab aralashtirildi va spektrofotometrga joylashtirildi. Optik zichlik 517 nm to‘lqin uzunligida har 5 daqiqada 30 daqiqa davomida dinamik tarzda o‘lchandi. Nazorat namunasi hisob-kitoblarda foydalaniladigan boshlang‘ich optik zichlik D_1 ni aniqlash uchun xizmat qildi.

Tajribada 4 ml hajmli kvarts kyuvetaga 3 ml DPPH ishchi eritmasi va 25, 50, 75 yoki 100 mkl tekshirilayotgan ekstrakt (spirtli yoki suvli, turi va suyultirilganligiga qarab) qo‘shildi. Reaksiya aralashmasining umumiy hajmi mos ekstragent qo‘shish orqali 3,1 ml ga yetkazildi. Kyuveta tarkibi yaxshilab aralashtirildi va o‘lchash darhol boshlandi.

Reaksiya aralashmasi butun o‘lchash davomida xona haroratida (20–22°C) qorong‘ilikda inkubatsiya qilindi. Yorug‘likdan himoya qilish DPPH ning fotolizini va yon fotokimyoviy reaksiyalarni oldini olish uchun zarur. Optik zichlik YOKE K7000 spektrofotometrida 517 nm da ekstrakt qo‘shilgandan so‘ng darhol (0 daqiqa) va keyin har 5 daqiqada 30 daqiqa davomida (5, 10, 15, 20, 25 va 30 daqiqalarda) o‘lchandi. Har bir o‘lchov uch marta takrorlandi (n = 3).

Antioksidant faollik (AOF%) quyidagi formula bo‘yicha hisoblandi:

$$AOF\% = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 100\%$$

bu yerda: D_1 — tegishli vaqt nuqtasida nazorat namunasi (3 ml DPPH + 100 mkl ekstragent) ning optik zichligi; D_2 — tegishli vaqt nuqtasida tajriba namunasi (3 ml DPPH + ekstrakt) ning optik zichligi. Hisob-kitob har bir vaqt nuqtasi uchun alohida amalga oshirildi.

Ishlab chiqilgan metodika validatsiyasi ICH (International Conference on Harmonization) ning analitik metodikalarni validatsiya qilish bo‘yicha tavsiyalariga muvofiq o‘tkazildi [ICH Q2(R1), 2005]. Chiziqlilikni baholash uchun har bir vaqt nuqtasida qo‘shilgan ekstrakt hajmiga nisbatan AOF% bog‘liqligi bo‘yicha kalibrlash grafigi tuzildi. Chiziqlilik determinatsiya koeffitsienti (R^2) qiymati orqali baholandi, u kamida 0,98 bo‘lishi kerak. Chiziqli regressiya tenglamasi eng kichik kvadratlar usuli bilan hisoblandi.

Metodikaning sezgirligi AOF% ning nol qiymatdan ishonchli (statistik jihatdan ahamiyatli) farqi kuzatiladigan minimal ekstrakt hajmi orqali baholandi. Mezon sifatida signal/shovqin nisbati > 3 qabul qilindi. Takrorlanuvchanlik har bir namuna va har bir hajm uchun uchta parallel o‘lchov natijalari asosida baholandi. AOF% ning o‘rtacha qiymati, standart og‘ish (SD) va nisbiy standart og‘ish hisoblandi. Metodikaning spetsifikligi ekstraktlarning 517 nm to‘lqin uzunligida DPPH qo‘shilmagan holdagi o‘z yutilishini o‘lchash orqali baholandi. Buning uchun kyuvetaga 3 ml mos ekstragent va 25–100 mkl ekstrakt qo‘shilib, optik zichlik o‘lchandi. Agar o‘z yutilish hissasi nazorat namunasi D_1 optik zichligining 5% dan oshmasa, u ahamiyatsiz deb hisoblandi.

Barcha tajribalar uch marta takrorlandi (n = 3). Natijalar o‘rtacha arifmetik qiymat ± standart og‘ish (mean ± SD) ko‘rinishida keltirildi. Statistik ishlov berish Microsoft Excel 2019 va OriginPro 2021 dasturlari yordamida amalga oshirildi. Grafiklar va kalibrlash chiziqlari OriginPro 2021 dasturida tuzildi. Oddiy dastarbosh (*Tanacetum vulgare L.*) ning quritilgan va maydalangan xomashyosi sariq-yashil rangli, o‘ziga xos kamfora hidiga ega zarrachalardan iborat edi. Etanol bilan ekstraksiyada ekstraktiv moddalar chiqishi 18,3 ± 1,2% ni, suv bilan ekstraksiyada esa 15,7 ± 1,1% ni tashkil etdi.

Dala qirqbo‘g‘ini (*Equisetum arvense L.*) xomashyosi kulrang-yashil rangli, hidsiz zarrachalardan iborat edi. Etanol bilan ekstraksiyada ekstraktiv moddalar chiqishi 12,5 ± 0,9%, suv bilan ekstraksiyada esa 16,8 ± 1,3% ni tashkil etdi. Tadqiq qilingan barcha namunalar uchun spirtli ekstraktlar suvli ekstraktlarga nisbatan yanada to‘q yashil-sariq rangga ega bo‘ldi, suvli ekstraktlar esa och sariq rangli edi. Bu etanol pigmentlar va fenol birikmalarni yanada to‘liqroq ajratib olishini bilvosita ko‘rsatadi.

Spirtli va suvli ekstraktlarni qiyosiy tahlili shuni ko‘rsatdiki, spirtli ekstraktlar ancha yuqori antioksidant faollikka ega. Masalan, 3:1 nisbatdagi aralashmaning suyultirilmagan spirtli ekstraktidan 100 mkl qo‘shilganda 30 daqiqadan so‘ng AOF% 92,4 ± 3,8% ni tashkil etdi, bu DPPH eritmasining deyarli to‘liq rangsizlanishiga olib keldi va chiziqli diapazondan tashqariga chiqdi. Shu sababli barcha spirtli

ekstraktlar to‘g‘ri o‘lchash uchun 10 marta suyultirildi. Suvli ekstraktlar esa xuddi shu hajmda (100 mkl, suyultirilmagan) AOF% ning 11–15% oralig‘idagi qiymatlarini ko‘rsatdi, bu chiziqli diapazonga yaxshi mos keldi.

Dastlabki tajribalar ultratovush bilan ishlov berish vaqtini 10 daqiqadan 20 daqiqagacha oshirish barcha namunalarda AOF% ni 12–15% ga oshirishini ko‘rsatdi. Ekstraksiya vaqtini 30 daqiqagacha uzaytirish esa antioksidant faollikning statistik jihatdan ahamiyatli oshishiga olib kelmadi ($p > 0,05$). Shu bois 20 daqiqa ekstraksiya vaqti antioksidant birikmalarni maksimal ajratib olishni ta’minlovchi optimal vaqt sifatida tanlandi.

Jadval 1. Nazorat namunasi D_1 ning 517 nm da optik zichligi dinamikada (mean ± SD, n=3)

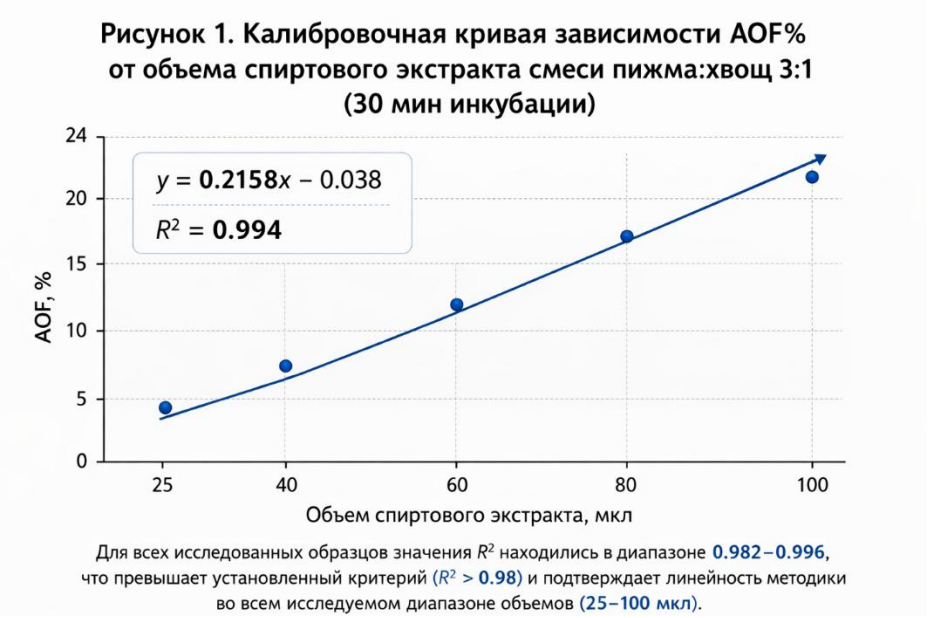
Время, мин	**Оптическая плотность (D_1)**	**Отклонение от исходной, %**
0	1.055 ± 0.008	0.00
5	1.052 ± 0.009	-0.28
10	1.048 ± 0.007	-0.66
15	1.045 ± 0.008	-0.95
20	1.041 ± 0.009	-1.33
25	1.037 ± 0.010	-1.71
30	1.032 ± 0.009	-2.18

Keltirilgan ma’lumotlardan ko‘rinib turibdiki, nazorat namunasining optik zichligi 30 daqiqa inkubatsiya davomida biroz kamaygan. 30-daqiqaga kelib umumiy kamayish 2,18% ni tashkil etdi, bu 5% dan oshmaydi va tajriba sharoitida DPPH ishchi eritmasining yetarli darajada barqarorligini ko‘rsatadi. Optik zichlikning kichik darajada kamayishi yorug‘lik ta’sirida (folga bilan himoyalangan bo‘lishiga qaramay) DPPH ning qisman degradatsiyasi yoki erituvchidagi suv izlari bilan o‘zaro ta’siri bilan bog‘liq bo‘lishi mumkin.

Metodikaning chiziqliligi har bir ekstrakt turi va komponentlar nisbatlari uchun qo‘shilgan ekstrakt hajmiga nisbatan AOF% bog‘liqligi bo‘yicha kalibrlash egri chiziqlarini tuzish orqali baholandi.

Jadval 2. Oddiy dastarbosh:dala qirqbo‘g‘ini 3:1 aralashmasining spirtli ekstrakti uchun turli hajmlarda AOF% qiymatlari (30 daqiqa inkubatsiya, mean ± SD, n=3)

Объем экстракта, мкл	**AOF%, %**
25	5.31 ± 0.21
50	10.52 ± 0.35
75	16.59 ± 0.48
100	21.33 ± 0.62



AOF% ning nol qiymatdan ishonchli farqi (signal/shovqin > 3) kuzatilgan minimal aniqlanadigan ekstrakt hajmi 25 mkl ni tashkil etdi. Ushbu hajmda barcha namunalarda AOF% qiymatlari 2% dan yuqori bo‘lib, bu shovqin darajasidan ancha yuqori ekanligini ko‘rsatdi.

Jadval 3. Turli ekstraktlar uchun minimal hajmda (25 mkl) AOF% qiymatlari (30 daqiqa inkubatsiya)

Экстракт	AOF% при 25 мкл, %
1:1 спиртовой	3.79 ± 0.18
1:3 спиртовой	3.51 ± 0.15
3:1 спиртовой	5.31 ± 0.21
1:1 водный	3.13 ± 0.14
1:3 водный	2.46 ± 0.12
3:1 водный	3.41 ± 0.16

Takrorlanuvchanlik har bir namuna uchun uchta parallel o‘lchov natijalari asosida baholandi. Namuna sifatida 3:1 nisbatdagi oddiy dastarbosh:dala qirqbo‘g‘ini aralashmasining spirtli ekstrakti ma’lumotlari keltirildi.

Jadval 4. Oddiy dastarbosh:dala qirqbo‘g‘ini 3:1 aralashmasining spirtli ekstrakti uchun AOF% ning uchta parallel o‘lchov natijalari (30 daqiqa inkubatsiya)

Объем, мкл	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3	Среднее	SD	RSD, %
25	май.31	май.48	май.15	май.31	0.17	мар.20
50	окт.52	окт.81	окт.23	окт.52	0.29	фев.76
75	16.59	16.98	16.20	16.59	0.39	фев.35
100	21.33	21.78	20.89	21.33	0.45	02.ноя

Jadvaldan ko‘rinib turibdiki, barcha hajmlar uchun RSD qiymatlari 5% dan oshmadi, bu ishlab chiqilgan metodikaning yaxshi takrorlanuvchanligini ko‘rsatadi. Shunga o‘xshash natijalar barcha tadqiq etilgan namunalarda ham olindi.

XULOSA. O‘tkazilgan tadqiqotlar natijasida oddiy dastarbosh (*Tanacetum vulgare L.*) va dala qirqbo‘g‘ini (*Equisetum arvense L.*) ning spirtli va suvli ekstraktlari antiradikal faolligini baholash uchun DPPH-test sharoitlari optimallashtirildi. Quyidagi optimal parametrlar aniqlandi: DPPH konsentratsiyasi

— etanolda 7,92 mM; to‘lqin uzunligi — 517 nm; inkubatsiya vaqti — 30 daqiqa (o‘lchash oralig‘i 5 daqiqa); ekstrakt hajmlari diapazoni — 25–100 mkl. Tadqiq etilayotgan diapazonda chiziqlilikni ta’minlash uchun spirtli ekstraktlarni oldindan 10 marta suyultirish zarurligi ko‘rsatildi. O‘simlik xomashyosini ekstraksiya qilishning optimal sharoitlari aniqlandi: xona haroratida 20 daqiqa davomida ultratovushli ekstraksiya, ikki turdagi ekstragent — 96% etanol va distillangan suvdan foydalanish. Spirtli ekstraktlar suvli ekstraktlarga nisbatan yuqori antioksidant faollikka ega ekanligi aniqlandi, bu etanolning fenol birikmalarni samaraliroq ajratib olish xususiyati bilan izohlanadi. Ishlab chiqilgan metodika chiziqlilik, sezgirlik, takrorlanuvchanlik va spetsifiklik ko‘rsatkichlari bo‘yicha validatsiya qilindi: **Chiziqlilik** barcha namunalarda determinatsiya koeffitsienti yuqori qiymatlari bilan tasdiqlandi ($R^2 > 0,98$). **Sezgirlik** past faollikka ega ekstraktlarni ham tahlil qilish uchun yetarli (minimal aniqlanadigan hajm — 25 mkl, AOF% > 2%). **Takrorlanuvchanlik** nisbiy standart og‘ishning past qiymatlari bilan tavsiflandi (RSD < 5%), bu protokolning ishonchliligini tasdiqlaydi. **Spetsifiklik** ekstraktlarning o‘z yutilish hissasi umumiy signalning 2,5% dan kam ekanligi bilan tasdiqlandi. Tajriba sharoitida DPPH ishchi eritmasining yuqori barqarorligi aniqlandi (30 daqiqa davomida optik zichlikning kamayishi 2,18% dan oshmadi), bu olingan natijalarning ishonchliligini ta’minlaydi. Ishlab chiqilgan va validatsiya qilingan DPPH-test metodikasi oddiy dastarbosh va dala qirqbo‘g‘ini kompozitsiyalarining antioksidant xususiyatlarini keyingi tizimli o‘rganish uchun metodologik asos yaratadi, jumladan: komponentlar nisbatiga bog‘liq faollik tahlili, spirtli va suvli ekstraktlarni qiyosiy o‘rganish, kinetik tahlil, IC_{50} hisoblash hamda amaliy tavsiyalar ishlab chiqish. Taklif etilgan protokol O‘zbekiston florasiga mansub boshqa dorivor o‘simliklarning antiradikal faolligini skrining baholash, shuningdek fitopreparatlar va biologik faol qo‘shimchalarni standartlashtirish hamda sifat nazorati uchun tavsiya etilishi mumkin.

Adabiyotlar

1. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 1958, 181, 1199–1200.
2. Gulcin, I., Beydemir, S., Sat, I.G., Kufrevioglu, O.I. Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (Cornus mas L.). Acta Alimentaria Hung, 2005, 34, 193–202.
3. Askarov I.R., Muminov M.M., Yusupov M.A. Study of antiradical properties of artichoke (Cynara scolymus L.) and milk thistle (Silybum marianum L.) vegetable oils. NamDU Ilmiy Axborotnomasi, 2024, 11, 173-177.
4. Askarov, I.R., Abdullaev, S.S., Mamatkulova, S.A., & Abdulloev, O.S. Antioxidant activity and elemental composition of mixtures of fig and common unabi fruits. Journal of Chemistry of Goods and Traditional Medicine, 2024, 3(3), 179–205. https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol3.iss3.2024.320
5. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transactions, 2007, 35(5), 1147-1150.
6. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews, 2010, 4(8), 118-126.
7. Pisoschi, A.M., Pop, A., Cimpeanu, C., Predoi, G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016, 9130976.
8. Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radical Biology and Medicine, 2004, 36(7), 838-849.
9. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 1996, 20(7), 933-956.
10. Bail, S., Buchbauer, G., Jirovetz, L., et al. Antimicrobial activities of essential oils of Tanacetum vulgare L. and their main constituents. Journal of Essential Oil Research, 2008, 20(4), 372-377.
11. Ivănescu, B., Tuchiluș, C., Corciovă, A., et al. Antioxidant and antimicrobial potential of Tanacetum vulgare L. extracts. Farmacia, 2018, 66(3), 456-461.
12. Бубенчикова, В.Н., Кондратова, Ю.А., Бубенчиков, Р.А. Изучение фенольных соединений пижмы обыкновенной. Химия растительного сырья, 2019, (3), 115-122.

13. Holzapfel, C.E., Lechte, M., Griessmeier, G. Silicon in plants: A review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2009, 172(4), 455-465.
14. Mimica-Dukić, N., Simin, N., Cvejić, J., et al. Phenolic compounds in Equisetum arvense L. and their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(15), 6630-6636.
15. Stajner, D., Popović, B.M., Čanadanović-Brunet, J., et al. Antioxidant and scavenging activities of Equisetum arvense L. extracts. Journal of the Serbian Chemical Society, 2009, 74(1), 21-31.
16. Nagai, T., Myoda, T., Nagashima, T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (Equisetum arvense L.). Food Chemistry, 2005, 91(3), 389-394.
17. Канарская, З.А., Канарский, А.В., Семакина, Н.В. Исследование антиоксидантной активности экстрактов хвоща полевого. Вестник Казанского технологического университета, 2017, 20(14), 151-154.
18. Ходжиматов, М. Дикорастущие лекарственные растения Узбекистана. Ташкент: Медицина, 1989, 256 с.
19. Государственная фармакопея СССР. XI издание, выпуск 2. М.: Медицина, 1990, 400 с.
20. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2004, 26(2), 211-219.
21. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10), 4290-4302.
22. Sharma, O.P., Bhat, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry, 2009, 113(4), 1202-1205.
23. Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry, 2012, 130(4), 1036-1043.
24. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation, 2005.
25. Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8(3), 303-313.
26. Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (αTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. Food Chemistry, 2011, 129(1), 139-148.