

УДК 615.322:615.27

## ОТХОДЫ ОТ ПЕРЕРАБОТКИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ДИКОРОСОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПИЩЕВЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

© 2010 В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова, С.Е. Фоменко

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, г. Владивосток

Поступила в редакцию 14.04.2010

Исследованы содержание полифенольных соединений и их антирадикальная активность в отходах от переработки винограда амурского (*Vitis amurensis*) и калины Саржента (*Viburnum sargentii*). Показано, что содержание полифенольных соединений в экстрактах из отжимов винограда амурского и калины саржента составляет 10% от суммы экстрактивных веществ. Антирадикальная активность выделенных полифенольных комплексов в модельных системах с АВТS<sup>+</sup> и ОН радикалами превышает таковую у коммерческого полифенольного антиоксиданта – пикногена. Исследованные виды отходов могут служить перспективным источником для получения пищевых антиоксидантов проявляющих электронофорную и протонифорную активность.

Ключевые слова: полифенольные соединения, антирадикальная активность, пикноген, растительные отходы

Биологические ресурсы традиционно представляют собой важнейший фактор социально-экономического развития страны, поэтому разработка фундаментальных основ рационального управления биоресурсами является одним из приоритетов отечественной биологической науки. Рациональным подходом к использованию биоресурсов и в частности растительного сырья является создание лечебно-профилактических средств на основе экстрактов растений, обладающих различными видами фармакологической активности, в том числе антиоксидантным действием. При этом перспективными источниками, на наш взгляд, являются природные комплексы биологически активных веществ, выделенные из отходов переработки дикорастущих видов Дальневосточной тайги имеющих пищевое назначение, таких как виноград амурский (*Vitis amurensis*) и калина Саржента (*Viburnum sargentii*). Такой подход позволяет внедрить процесс безотходной переработки ценного растительного сырья и наряду с выработкой традиционных продуктов, таких как соки и сиропы, получать биологически активные препараты с низким уровнем токсичности. Преимущество использования именно пищевых видов растительного сырья определяется эволюционной адаптацией организма человека к вторичным метаболитам растений, традиционно употребляемым им в пищу. Одним из наиболее важных классов вторичных растительных метаболитов являются полифенольные (ПФ) соединения, которые обладают высокой антиоксидантной и антирадикальной активностью (АА) [13]. При этом известно, что применение

различных ПФ антиоксидантов, способных инaktivировать свободные радикалы, имеет целый ряд положительных эффектов на здоровье человека [10]. Ранее было показано, что растительные препараты, полученные нами из гребней (кисти, освобожденные от ягод) калины (*Viburnum sargentii*) и гребней винограда Амурского (*Vitis amurensis*), зарегистрированные соответственно под торговыми марками «Калифен» и «Диприм», обладают ярко выраженными гепатозащитными свойствами [1, 2] и содержат в своем составе многокомпонентный ПФ комплекс. В связи с тем, что в реализации биологической активности ПФ соединениями, включая гепатопротекторную [8], ведущую роль играет АА [16], целью данной работы явилась ее оценка у препаратов, полученных из отжима калины (гребни, косточки, кожица ягод) (ЭОК) и отжима винограда Амурского (ЭОВ). Косточки и кожица ягод были нами добавлены в состав экстрагируемого сырья, так как ранее было показано, что косточки и кожица ягод винограда характеризуются высоким содержанием ПФ [9].

**Методы исследования.** Экстракты из растительного сырья готовили на 40% этиловом спирте методом реперколяции. Выход препаратов составлял 1 л на 1 кг сырья. В полученных экстрактах определяли содержание экстрактивных веществ. Для выделения ПФ фракции 10 мл исходного экстракта упаривали на ротаторном испарителе ( $t < 35^{\circ}\text{C}$ ), для удаления спирта и разводили дистиллированной водой до исходного объема. Затем образец наносили на экстракционную колонку ENVI C18 (Waters, USA) содержащую 10 г сорбента. Экстракционную колонку после нанесения образца элюировали 50 мл воды ( $\text{pH}=7$ ) для удаления углеводов, органических кислот и других соединений, не сорбиравшихся на колонке. После просушивания колонки в токе азота, ПФ фракцию 20 мл этанола и использовали при дальнейшей работе. Суммарное содержание ПФ соединений в исходных экстрактах и выделенных фракциях определяли с помощью реактива Фолина-Чикалтео [3], используя в качестве стандарта галловую ки-

Спрыгин Владимир Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: vsprygin@poi.dvo.ru

Кушнерова Наталья Федоровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии. E-mail: natasha50@mail.ru

Фоменко Светлана Евгеньевна кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

слоту (ГК). Количественно содержание ПФ соединений выражали в мг-экв ГК.

Уровень АА полученных препаратов и их фракций оценивали:

1) по способности восстанавливать органический катион радикал АВТС<sup>+</sup> (2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) [11]. АА оценивали по снижению величины абсорбции при длине волны 734 нм на спектрофотометре Unico 2800 (Unico, USA). Перед определением исходный раствор АВТС<sup>+</sup> разводили этанолом до величины абсорбции  $0,9 \pm 0,02$ . Реакцию проводили непосредственно в кювете объемом 1 мл, куда помещали 1 мл разведенного раствора АВТС<sup>+</sup> и измеряли величину поглощения  $A_{734}$ . После этого в кювету добавляли 10 мкл раствора растительного образца или модельного антиоксиданта сравнения (тролокса) в этаноле, тщательно перемешивали и измеряли поглощение ровно через 3 мин. Реакцию проводили при комнатной температуре  $\approx 20^\circ\text{C}$ . Каждое измерение проводили не менее 3 раз.

2) по способности предотвращать окислительную модификацию салициловой кислоты под действием гидроксил радикалов (ОН<sup>•</sup>) [4] генерируемых в железо/аскорбатной модели [12]. Вкратце, реакционную смесь (200  $\mu\text{M}$  аскорбиновой кислоты, 4  $\mu\text{M}$  ЕДТА, 350  $\mu\text{M}$  салициловой кислоты, 2  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ , 100  $\mu\text{l}$  образца) объемом 1 мл инкубировали в течение 60 мин при  $35^\circ\text{C}$ . Через 60 мин в инкубационной среде анализировали продукты окислительной модификации салициловой кислоты (2,3- и 2,5-дигидроксibenзойные кислоты). Для этого аликвоту реакционной смеси объемом 100 мкл, помещали в бутылочку для автоматического устройства для ввода проб и анализировали методом ВЭЖХ [14]. Для анализа использовали колонку Сферисорб RP18 (150 x 3 мм), которую элюировали в изократном режиме. Подвижная фаза: 0,03 М лимонной кислоты и 0,03 М уксусной кислоты (рН=3,6); скорость элюирования 1,5 мл/мин.

АА оценивали по уменьшению площади пика, соответствующего дигидроксibenзойным кислотам по сравнению с контролем, когда вместо образца в реакционную смесь добавляли 0,1 мл дистиллированной воды. За единицу АА принимали такое количество антиоксиданта, которое вызывало изменение оптической плотности  $A_{734}$  или уменьшение площади пика, соответствующего продуктам окисления салициловой кислоты, равное таковому при действии 1  $\mu\text{M}$  тролокса ( $\pm$ -6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксильная кислота) (Sigma-Aldrich, USA), который представляет собой водорастворимый аналог витамина Е и является общепринятым модельным антиоксидантом. Для расчета величин АА в  $\mu\text{M}$ -тролокса полученных фракций строили калибровочный график в диапазоне от 1,25-40 нМ тролокса для метода № 1 и от 1,25-20 нМ тролокса для метода №2. Значения величин  $\Delta A_{734}$  и  $\Delta S$  в указанных диапазонах концентраций имели линейную зависимость от концентрации тролокса.

В качестве препарата сравнения был использован пикногенол (Stryka Botanicals, Switzerland), представляющий собой ПФ комплекс, выделенный из коры французской морской сосны (*Pinus Maritima*). Принимая во внимание паспортные данные о 95% содержании ПФ соединений, мы готовили раствор пикногена с концентрацией 20 мг/мл, что примерно соответствовало содержанию суммарной полифенольной фракции в экстракте отжима калины и использовали его в качестве модельного комплекса полифенолов. Все измерения проводили не менее трех раз. Результаты выражали в виде  $M \pm SEM$ .

**Результаты и обсуждение.** Максимальное количество полифенольных соединений (19,4 мг/мл) содержал ЭОК. Для ЭОВ этот показатель составил 16,58 мг/мл (табл. 1). Из полученных результатов следует, что от 91 до 95% хромофора, образующегося в реакции Фолина-Чикалтео, обусловлено ПФ соединениями. Из соединений нефенольной природы, способных вызывать восстановление иона молибдата, наиболее вероятным представляется наличие аскорбиновой кислоты, присутствующей, как правило, в большинстве растительных препаратов. Принимая во внимание наличие одной активной гидроксильной группы в молекуле аскорбиновой кислоты с молекулярной величиной абсорбции равной 17,500, ее содержание в исходных растительных экстрактах можно оценить в пределах от 40 до 250 мкг/мл.

Таким образом, метод определения общих ПФ с реактивом Фолина-Чикалтео является достаточно точным для изучаемых экстрактов и, принимая во внимание низкое содержание сопутствующих реакционно-активных соединений (образование хромофора менее 10%), может применяться без дополнительной очистки экстрактов. Содержание суммарной ПФ фракции в изученных препаратах достигает 10,1-10,2% от суммы экстрактивных веществ (табл. 1), что является достаточно высоким показателем. Количественные характеристики пикногена соответствуют паспортным данным (95% полифенолов).

Для оценки АА исходных экстрактов и выделенных из них ПФ фракций, были выбраны две модельные системы, позволяющие судить как об электронофорной (АВТС<sup>+</sup>), так и о протонофорной (ОН<sup>•</sup>) активности исследуемых антиоксидантов. Из табл. 2 следует, что наибольшей активностью восстанавливать катион радикал АВТС<sup>+</sup> обладает ЭОК, при этом более 91% активности ассоциировано с ПФ фракцией. Сходная картина наблюдается и с ЭОВ. Более 90% АА по отношению к катион-радикалу АВТС<sup>+</sup> связано с ПФ фракцией. Следует отметить, что удельная АА (на 1 мг ПФ фракции) ЭОК по отношению к АВТС<sup>+</sup> была на 15% выше, чем у ЭОВ. Можно предположить, что данный феномен может быть результатом различий в химическом строении отдельных соединений входящих в ПФ комплекс, которые у ЭОК вероятно являются более оптимальными с точки зрения проявления электронофорной активности.

**Таблица 1.** Содержание общих полифенолов в водно-спиртовых экстрактах (в мг-экв галловой кислоты), (M±m)

| Название препарата | Содержание экстрактивных веществ в экстракте, мг/мл | Содержание суммарного полифенольного комплекса в исходном экстракте, мг/мл, (А) | Очищенная полифенольная фракция, мл/мл (В) | А/В  |
|--------------------|---|---|--|------|
| ЭОВ                | 166±2,5   | 18,2±0,23   | 16,58±0,26                                 | 0,91 |
| ЭОК                | 193±8   | 20,6±0,9  | 19,4±0,85                                  | 0,94 |
| Пикногенол         | 20  | 19,29±0,95  | 18,34±0,2                                  | 0,95 |

Примечание: содержание различных веществ в мг/мл экстракта эквивалентно содержанию в мг на 1 г исходного сырья. ЭОВ – экстракт отжима винограда Амурского; ЭОК – экстракт отжима калины

Данные, полученные для пикногена, показали, что 97% АА по отношению АВТС<sup>+</sup> ассоциированы с ПФ фракцией. Удельная антирадикальная активность ПФ фракции пикногена в первой модельной системе (АВТС<sup>+</sup>) составила 84% и 73% от таковой у ЭОВ и ЭОК соответственно. Полученные нами величины АА исследованных ПФ комплексов для системы с радикалом АВТС<sup>+</sup> сравнимы с опубликованными данными других авторов для ПФ комплексов из винограда [15].

Гидроксильный радикал (ГР) является самым реакционным и токсичным из всех активных форм кислорода, образующихся в организме человека [6]. Благодаря своей экстремально высокой реакционной способности и малому размеру, ГР способен передвигаться в среде с достаточно высокой скоростью и атаковать практически любую молекулу в любой части ее углеродного скелета

[5]. Атакуя молекулы липидов, ГР инициирует ПОЛ, вызывая массивное повреждение биологических мембран [5] и окислительную модификацию ЛПНП, являющуюся одним из основных факторов развития склеротических процессов в сосудах [7]. В связи со сказанным, способность антиоксиданта инактивировать ГР, является одним из важнейших показателей его активности. Активность ЭОК и ЭОВ инактивировать ГР была практически равной, при этом с ПФ фракцией было ассоциировано 88 и 76% АА, соответственно. Более высокая активность ПФ комплекса из ЭОК на 1 мл экстракта, очевидно, обусловлена большим содержанием ПФ. Удельная АА на 1 мг ПФ фракции в ЭОК и ЭОВ была выше, чем таковая у пикногена и составила соответственно 121 и 113%.

**Таблица 2.** Антирадикальная активность изученных препаратов в модельных системах в  $\mu\text{M}$  тролокса (M±m)

| Название фракции                          | Препарат   |            |            |
|---|------------|------------|------------|
|   | ЭОК        | ЭОВ        | Пикногенол |
| Система №1 (АВТС <sup>+</sup> )           |            |            |            |
| Исходный экстракт (на 1 мл)               | 63,26±3,52 | 47,54±3,21 | 44,67±2,84 |
| ПФ фракция (на 1 мл исходного экстракта)  | 57,81±2,56 | 43,11±2,14 | 43,54±0,95 |
| ПФ фракция (на 1 мг) (расчетная величина) | 2,98       | 2,60       | 2,18       |
| Система №2 (ОН)                           |            |            |            |
| Исходный экстракт (на 1 мл)               | 39,68±2,18 | 36,25±2,34 | 32,57±1,85 |
| ПФ фракция (на 1 мл исходного экстракта)  | 34,85±1,98 | 27,69±1,82 | 29,88±2,16 |
| ПФ фракция (на 1 мг) (расчетная величина) | 1,80       | 1,67       | 1,49       |

Примечание: ЭОВ – экстракт отжима винограда Амурского; ЭОК – экстракт отжима калины Саржента; ПФ – полифенольная.

**Выводы:** продукты переработки Дальневосточных дикороссов пищевого назначения, такие как виноград амурский (*Vitis amurensis*) и калина Саржента (*Viburnum sargentii*) могут служить перспективным источником сырья для получения растительных фитопрепаратов, содержащих ПФ комплексы с высокой антиоксидантной активностью. Полученные препараты обладают как протонофорной, так и электронофорной активностью и способны инактивировать свободные радикалы, несущие как положительный заряд, так и неспаренный электрон. При этом уровень АА у ЭОК и ЭОВ в обеих

моделях пропорционален содержанию в препаратах ПФ фракции, с которой ассоциировано от 76 до 90% АА. Удельная АА у ПФ фракции ЭОВ и ЭОК превышает таковую у пикногена – коммерчески реализуемого антиоксиданта ПФ природы. Это позволяют обосновать возможность создания безотходной технологии, повышающей рациональность использования растительного сырья, путем использования отходов переработки калины и винограда для получения высокоактивных препаратов, обладающих высокой антиоксидантной активностью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Кушнерова, Н.Ф. Эффективность применения растительного препарата диприм для восстановления функционального состояния печени после поражения этиловым спиртом / Н.Ф. Кушнерова, В.Г. Спрыгин, С.Е. Фоменко и др. // Гигиена и санитария. – 2002. - № 1. – С. 56-59.
2. Спрыгин, В.Г. Влияние комплексного полифенольного препарата "калифен" на процессы восстановления биохимических показателей печени после поражения этиловым спиртом / В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2002. - № 4. – С. 22-26.
3. Ainsworth, E.A. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent / E.A. Ainsworth, K.M. Gillespie // Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2, N 4. – P. 875-877.
4. Coudray, C. High-performance liquid chromatography-electrochemical determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo marker of oxidative stress / C. Coudray, M. Talla, S. Martin et al. // Anal. Biochem. – 1995. – Vol. 227, N 1. – P. 101-111.
5. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease // Annu. Rev. Nutr. – 1996. – Vol. 16. №1. – P. 33-50.
6. Halliwell, B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease / B. Halliwell, J.M. Gutteridge // Biochem. J. – 1984. – Vol. 219, N 1. – P. 1-14.
7. Jessup, W. The role of oxidative modification and antioxidants in LDL metabolism and atherosclerosis / W. Jessup, R.T. Dean, C.V. de Whalley et al. // Adv. Exp. Med. Biol. – 1990. – Vol. 264. – P. 139-142.
8. Liu, T.T. Effects of long-term tea polyphenols consumption on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes and liver function in Wistar rats / T.T. Liu, N.S. Liang, Y. Li et al. // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9, N 12. – P. 2742-2744.
9. Mattivi, F. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties / F. Mattivi, U. Vrhovsek, D. Masuero, D. Trainotti // Australian Journal of Grape and Wine Research. – 2009. – Vol. 15, N 1. – P. 27-35.
10. Pandey, K.B. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease / K.B. Pandey, S.I. Rizvi // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2009. – Vol. 2, N 5. – P. 270-278.
11. Re, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente et al. // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 26, N 9-10. – P. 1231-1237.
12. Regoli, F. Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite, Peroxyl Radicals, and Hydroxyl Radicals / F. Regoli, G.W. Winston // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1999. – Vol. 156, N 2. – P. 96-105.
13. Scalbert, A. Polyphenols: antioxidants and beyond / A. Scalbert, I.T. Johnson, M. Saltmarsh // Am. J. Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 81, N 1 – P. 215S-217S.
14. Shen, Y. Na<sup>+</sup>, R<sup>+</sup> - ATPase, Glutathione, and Hydroxyl Free Radicals in Cadmium Chloride-Induced Testicular Toxicity in Mice / Y. Shen, S. Sangiah // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 1995. – Vol. 29, N 2. – P. 1774-1179.
15. Villano, D. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro / D. Villano, M.S. Fernandez-Pachon, A.M. Troncoso, M.C. Garcia-Parrilla // Analytica Chimica Acta. – 2005. – Vol. 538, N 1-2. – P. 391-398.
16. Zhao, B.L. The health effects of tea polyphenols and their antioxidant mechanism // J. Clin. Biochem. Nutr. – 2006. – Vol. 38, N 2. – P. 59-68.

## WASTE FROM PROCESSING THE FAR-EAST WILD-GROWING PLANTS – PERSPECTIVE SOURCES OF NUTRITIONAL ANTIOXIDANTS

© 2010 V.G. Sprygin, N.F. Kushnerova, S.E. Fomenko

Pacific Oceanological Institute named after V.I. Ilyichev FEB RAS, Vladivostok

The maintenance of polyphenolic compounds and their antiradical activity in waste from processing grapes Amur (*Vitis amurensis*) and guelder-roses Sargent (*Viburnum sargentii*) are researched. It is shown, that the maintenance of polyphenolic compounds in extracts from extractions of grapes Amur and guelder-roses Sargent makes 10 % from the sum of extractive substances. Antiradical activity of the allocated polyphenolic complexes in modelling systems with ABTS + and OH-radicals exceeds those at commercial polyphenolic antioxidant - pycnogenol. The researched kinds of waste can be a perspective source for reception the nutritional antioxidants showing electronophore and protonophore activity.

Key words: *polyphenolic compounds, antiradical activity, pycnogenol, plant waste*

Vladimir Sprygin, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: vsprygin@poi.dvo.ru  
Nataliya Kushnerova, Doctor of Biology, Professor, Chief of The Biochemistry Laboratory. E-mail: natasha50@mail.ru  
Svatlana Fomenko, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru