

А. Г. Лапинский, В. В. Горбачев

## АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ НЕКОТОРЫХ ДИКОРОСОВ СЕВЕРНОГО ОХОТОМОРЬЯ

Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан

Методом обесцвечивания стабильного свободного радикала N,N-дифенил-N'-пикрилгидразила исследовалась антирадикальная активность водно-спиртовых вытяжек из некоторых дикоросов, произрастающих в регионе северного Охотоморья. Показана существенно более высокая активность в сравнении с официальным препаратом плодов черники, которая сохранялась у некоторых дикоросов даже после высокотемпературной сушки, что позволяет рекомендовать последнюю для продукции, подлежащей длительному хранению.

Свободные радикалы, которые непрерывно генерируются в онтогенезе всех живых организмов, потенциально опасны вследствие своей высокой реакционной способности, а их продукция возрастает при ряде патологических состояний [1]. Вещества с антирадикальной активностью традиционно используются в лечении и профилактике т.н. свободнорадикальных патологий. Наряду с традиционно используемыми липофильными антиоксидантами, важнейшим из которых является  $\alpha$ -токоферол, защищающими основной субстрат атаки свободных радикалов — липидный матрикс клеточных мембран, в последнее время в медицине используются структурно близкие токоферолам вещества растительного происхождения, объединяемые под названием биофлавоноиды, основными из которых являются водорастворимые солеподобные пигменты — антоцианы и их агликоны антоцианидины. Так, содержащие их плоды черники являются официальным препаратом и рекомендуются, в том числе, при нарушениях зрения, связанных с функцией хрусталика и сетчатки [2], а также в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Антирадикальной активностью также обладает ряд других веществ растительного происхождения — оксикислоты, каротиноиды и др.

Большинство регионов обладают достаточной сырьевой базой, способной обеспечить потребности местного населения веществами с антирадикальной активностью, не прибегая к импортным. Это является наиболее актуальным для отдаленных северных территорий, где доступность фармацевтической помощи ограничена высокими транспортными расходами, а вероятность развития свободнорадикальных патологий выше, как вследствие преобладания в рационе рафинированных продуктов, так и из-за напряжения адаптационных механизмов, активирующего генерацию свободных радикалов.

Целью настоящей работы было определение антирадикальной активности в дикоросах северного Приохотоморья, традиционно употребляемых в пищу.

### Материалы и методы

Плоды и ягоды дикоросов собраны в период созревания (цветки иван-чая — в период цветения) частью

— в пятикилометровой прибрежной зоне Большого Магадана, частью — в континентальной (пос. Сеймчан). Исследованные виды перечислены в табл. 1. Для сравнения был взят официальный препарат “Черники плоды” (*Fructus Myrtilli*) производства ЗАО “ИВАН-ЧАЙ” (Москва), сбора 2003 г. Содержание сухого вещества в образцах определялось методом высушивания при 100 °С до постоянного веса. Для определения антирадикальной активности в экстрактах из высушенного сырья последнее сушили при 60 и 100 °С в течение 48 ч.

Для экстракции и приготовления рабочих растворов использовался водный спирт этиловый, приготовленный смешением двух объемов 96° этилового спирта-ректификата и одного объема дистиллированной воды. Растительное сырье гомогенизировали и экстрагировали водным спиртом при соотношении сырье — экстрагент 1:100 настаиванием в течение недели при периодическом встряхивании. Экстракт отделяли фильтрованием или центрифугированием. Для определения антирадикальной активности экстрактов использовалась реакция обесцвечивания стабильного свободного радикала N,N-дифенил-N'-пикрилгидразила (ДФПГ, фирмы Koch-Light, Англия), рабочий раствор которого содержал 4 мг вещества в 100 мл водного спирта. (Точнее, концентрация ДФПГ доводилась до такого значения, чтобы при смешивании 2 мл его раствора и 1,5 мл водного спирта, экстинкция при 517 нм находилась в пределах 0,45 – 0,50, что позволяет использовать такие разведения экстрактов сырья, поглощение 1 мл которых в смеси с 2,5 мл водного спирта при 517 нм достоверно не отличается от поглощения водного спирта). Степень обесцвечивания ДФПГ с разными разведениями экстрактов определяли методом спектрофотометрии при 517 нм с использованием 0,1 % раствора аскорбиновой кислоты в качестве положительного контроля. Каждая проба содержала 0,5 мл водного спирта (кроме проб положительного контроля), 1 мл разведенного экстракта и 2 мл раствора ДФПГ. Пробы инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего к пробам положительного контроля добавляли 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты. Определяли разность значений экстинкций

Таблица 1  
**Антирадикальная активность (АРА) экстрактов из дикоросов и плодов черники.**

Вид сырья	АРА (мэкв/мг)
Плоды черники <i>Fructus Myrtilli</i>	1,15*
Жимолость <i>Lonicera edulis</i>	10,63 ± 0,12
Смородина красная <i>Ribes acidum</i>	4,74 ± 0,26
Шикша <i>Empetrum sibiricum</i>	10,29 ± 0,15
Княженика <i>Rubus arcticus</i>	3,05 ± 0,17
Смородина черная <i>Ribes fragrans</i>	2,58 ± 0,17
Голубика <i>Vaccinium uliginosum</i>	7,20 ± 0,66
Рябина бузиннолистная <i>Sorbus sambuci-folia</i> , красноплодная	4,22 ± 0,07
Рябина бузиннолистная <i>Sorbus sambuci-folia</i> , желтоплодная	8,03 ± 0,77
Морошка <i>Rubus chamaemorus</i>	2,67 ± 0,09
Иван-чай <i>Chamaenerion angustifolium</i>	13,31 ± 0,75
Брусника <i>Rhodococcum vitis-idaea</i>	2,25 ± 0,12
Шиповник <i>Rosa acicularis</i>	13,75*

\* Анализировался единичный образец. Среднеквадратичное отклонение не приведено, поскольку, при измерении в трипликате, ниже абсолютной погрешности спектрофотометра (± 0,5 %). Остальные дикоросы анализировались по три образца каждого вида в трипликате.

проб с экстрактом с пробой, содержащей вместо экстракта 1 мл водного спирта.

Исследовали по три образца каждого вида, преимущественно из разных условий произрастания; графически определяли количество сухого вещества, взятого на экстракцию, приводящее к 50 % снижению содержания в пробе ДПФГ. Затем, с учетом коэффициента, соответствующего экстинкции 2,2 см<sup>-1</sup>/мэкв антирадикальной активности [3], определяли антирадикальную

Таблица 2  
**Антирадикальная активность (АРА) некоторых видов сырья, подвергнутого высокотемпературной сушке**

Вид сырья	Температура сушки, °С	АРА, мэкв/мг
Голубика	60	2,42 ± 0,12
	100	2,59 ± 0,10
Жимолость	100	1,00 ± 0,03
Иван-чай	100	12,08 ± 1,08
Княженика	100	2,57 ± 0,15
Смородина красная	100	0,28 ± 0,07
Рябина красноплодная	60	3,38 ± 0,31
	100	2,17 ± 0,19
Рябина желтоплодная	60	3,26 ± 0,27
	100	3,43 ± 0,22
Брусника	60	1,54 ± 0,13
	100	1,60 ± 0,13
Шиповник	60	4,78*
	100	2,64*

\* Анализировался единичный образец. Среднеквадратичное отклонение не приведено, поскольку, при измерении в трипликате, ниже абсолютной погрешности спектрофотометра (± 0,5 %). Остальные дикоросы анализировались по три образца каждого вида в трипликате.

активность (АРА) в мэкв на 1 мг сухого вещества образца, взятого на экстракцию.

### Результаты и их обсуждение

ДФПГ осуществляет дегидрирование активированных гидроксидов фенолов и оксикислот растительного сырья. Также нельзя исключать его взаимодействия с конъюгированными полиенами, что заставляет четко стандартизировать время реакции с экстрактами из желто- и желто-красно-окрашенных ягод (рябина и шиповник). Действительно, в этих случаях наблюдалось продолжение обесцвечивания ДФПГ в течение еще около 30 мин после установленного времени. Интересно, что при сравнении экстрактов из свежих плодов шиповника и высушенного при 60 и 100 °С, степень обесцвечивания в течение дополнительного времени была наибольшей у образца, прогретого при 60 °С, что можно объяснить активацией каротиноидов при частичном окислении, тогда как при нагревании до 100 °С происходит уже осмоление (данные не приведены). Мы также отмечали снижение степени обесцвечивания ДФПГ с экстрактом шиповника, если из инкубационной смеси кислород воздуха был предварительно вытеснен барботированием аргона.

Из табл. 1 видно, что по содержанию на сухое вещество, взятое для экстракции, экстракты из всех изученных свежих образцов обладают существенно большей антирадикальной активностью, чем плоды черники, а в случае иван-чая, шикши, жимолости и шиповника — даже на порядок.

Таблица 3  
**pH Водно-спиртовых вытяжек некоторых видов сырья (1:100, вес/объем)**

Образец	Температура сушки, °С	pH
Иван-чай	–	4,67
	100	4,90
Голубика	–	2,89
	60	3,15
	100	3,44
Смородина красная	–	2,44
	100	2,75
Рябина красноплодная	–	2,88
	60	3,08
	100	3,27
Рябина желтоплодная	–	3,03
	60	3,03
	100	3,38
Шиповник	–	4,45
	60	4,71
	100	4,52
Черника (аптечный препарат)	–	2,75
Черника	100	3,14

**Примечания:** измерение при 25 °С; для анализа свежего и высушенного сырья использовался образец от одного и того же растения каждого вида; среднеквадратичное отклонение не указано, поскольку при измерении в трипликате, ниже погрешности прибора (± 0,1 ед. pH).

Традиционные пресервы и консервы на основе растительного сырья малопригодны для длительного хранения и транспортировки вследствие высокого содержания воды. То же можно сказать и о щадящих методах сушки растительного сырья, поскольку при существующих способах хранения и транспортировки высока вероятность порчи продукции. Поэтому представляется важной оценка антирадикальной активности в сырье, подвергнутом высокотемпературной сушке (60 и 100 °С, исследовались некоторые виды дикоросов, табл. 2).

Существенное снижение антирадикальной активности у прогретых образцов было наименьшим у иван-чая. Представляется возможным связать это снижение с деградацией кислотных функций, в том числе обладающих антирадикальной активностью, поскольку рН водноспиртовых вытяжек из прогретых образцов был стабильно выше, чем у свежих ягод и возрастал с увеличением температуры сушки (табл. 3). К тому же, устойчивая пирилевая форма пигментов также стабилизируется кислотами. О росте рН косвенно свидетельствует и изменение цвета ягод, высушенных при высокой температуре, поскольку растительные пигменты являются кислотно-основными индикаторами. Так, подкисление экстракта из плодов черники, высушенных при 100 °С, 0,01 н хлористоводородной кислотой приводило к появлению окраски, характерной для экстракта из ягод, высушенных в более мягких условиях. Интересно, что при этом отмечалось и некоторое (в пределах 5 %) увеличение антира-

дикальной активности, вероятно, вследствие подавления диссоциации фенольных гидроксидов.

Тем не менее остаточная антирадикальная активность у некоторых видов сырья, будучи достаточно высокой, позволяет рекомендовать высокотемпературную сушку для продукции, подлежащей длительному хранению. Также интересно, что у некоторых видов (рябина бузиннолистная желтоплодная, брусника, голубика) антирадикальная активность экстрактов образцов, прогретых до 100 °С, была несколько выше, чем у экстрактов проб, высушенных при 60 °С. Подобный эффект описан для гибискуса *Hibiscus syriacus* и приписывается разрушению гликозидов, что делает доступными часть фенольных гидроксидов [4]. Однако насколько этот факт сказывается на биодоступности, пока неизвестно. Представляется возможным предложить тест, позволяющий определять вклад в антирадикальную активность пигментов, по разности антирадикальной активности свежих образцов и высушенных при 60 и 100 °С.

## ЛИТЕРАТУРА

1. C. A. Rice-Evans and A. T. Diplock, *Free Rad. Biol. Med.*, **15**, 77 – 96 (1993).
2. Т. В. Ставицкая, *КОФ, Интернет-издание “Русский медицинский журнал”*, **3(2)**, (2002).
3. L. Glavind, *Acta Chem. Scand.*, **17(6)**, 1655 – 1659 (1963).
4. S. W. Kwon, S. S. Hong, J. I. Kim, and I. H. Ahn, *Изв. АН, Сер. биол.*, № 1, 20 – 21 (2003).

Поступила 28.10.04

## THE ANTIRADICAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM SOME WILD-GROWING PLANTS OF THE OKHOTSK SEA NORTHERN COASTAL REGION

A. G. Lapinskii and V. V. Gorbachev

Institute for Biological Problems of Northern Regions, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

The antiradical activity of aqueous ethanol extracts from some edible plants and berries of the Okhotsk Sea northern coastal region was assessed using the method of quenching of stable free radicals of N,N-diphenyl-N'-picrylhydrazyl. Some of the obtained extract showed significantly higher activity as compared to that of the available preparation from dried bilberry fruits. The high activity was retained even after drying the initial material at high temperatures, which makes it possible to recommend such drying in the technology of products subject to long-term storage.